

4/21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**"PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LA
ENZIMA ISOMALTULOSA SINTASA DE
PROTAMINOBACTER rubrum."**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
LARIZA TINOCO VALDEZ**



MEXICO, D. F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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:

Presidente	Prof. LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES AGUSTÍN	<u>Agustín López Canel</u>
Vocal	Prof. AGUILAR CABALLERO RAUL	_____
Secretario	Prof. HERNANDEZ MONTELS HOMERO	_____
1er. Suplente	Prof. ESCUDERO GARCIA MA. ELSA	_____
2o. Suplente	Prof. GARZA VELASCO RAUL	_____

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Tecnología Enzimática. Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología. UNAM.

Laboratorio 314, Edificio E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema: Dr. Agustín López-Munguía Canel

Agustín López Canel

Supervisor Técnico: M. en B. Ma. Elena Rodríguez Alegria

Ma. Elena Rodríguez Alegria

Sustentante: Lariza Tinoco Valdez

[Firma]

DEDICATORIAS

A Dios. Por enseñarme lo que significa tener FE y no perderla aún en los momentos mas difíciles... Por permitirme ver el sol cada mañana.

A mis Padres. Por su comprensión y amor desinteresado... Por haberme dado la vida y el carácter para aprender a enfrentarla. Por todo lo que les debo.

A Sarola. Mi compañera de toda la vida; porque con nadie he tenido tan buenas peleas pero tampoco tan buenas pláticas. Por su especial forma de ver el amor... Por ser todo lo que yo no soy.

A mi Abuela. La cabeza de la familia, una mujer ejemplar, inigualable, símbolo de fortaleza y amor infinito a los suyos.

A Beto. Por tu interminable alegría, porque sin quererlo, te has convertido en el factor de unión en la familia. Por esa chispa especial que has inyectado en todos nosotros; porque para mí, siempre estarás vivo...

A la memoria de mi tío Alfredo y mis abuelos Jesús, Hermeinda y Francisco.

A mis mejores amigas: Isa, Coquina, Sandra, Blanca y Ami. Gracias por compartir juntas los buenos y malos momentos, por apoyarme y entenderme siempre. Por ser tan picudas!!

A TOOOOOOOODOS los cuates:

- ◆ **De la Ula:** Marco, Geo, Atala, Alberto, Efraín, Gabriel, Jan, y Andrés. Excelentes recuerdos...
- ◆ **De la Fac:** Mitzí, Helen, Pep (con todo y maridos), Chavez, Quique, Jasso, Niñodonte, Miguelín, Pablo y Mauricio. Gracias por enseñarme un nueva manera de ver la vida...
- ◆ **Del "E":** Otra vez a Sandra, la Dra. Naranjo, Lety, Juliet, Diana, Bety, Lucy y Fany. Gracias por hacer menos "tediosos" esos días...
- ◆ **Del Ibt:** Nuevamente a Male y Fer, Laura, Mariana, Monique, Came, Rose, Gabriel, Marisol, Lolita, Vanesa, Nadia, Aure, Ma. Paz, Vero, Barbus, Daniel, Pancho y Humberto. Gracias por hacer de mi estancia en el Ibt, toda una aventura...

Muy especialmente a **Toño, Vicky y Emilio;** por esa gran experiencia que compartimos juntos, que me hizo ver lo valiosos que son como colegas y amigos!

A Doña Lupe y Javier, por todo su cariño, por permitirme sentir parte de su familia! Los quiero muchísimo!!! GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM. Por permitirme formar parte de esta gran familia universitaria; por enseñarme lo maravillosa que es y por brindarme la oportunidad de lograr una gran meta.

A la Fundación UNAM. Por el apoyo económico otorgado durante el periodo Mayo 1996-Abril 1997 dentro del Programa de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación, para la realización de este trabajo.

Al Dr. Agustín López-Munguía C. Porque tuvo la confianza en mí al permitirme formar parte de su grupo. Mi agradecimiento, ya que sin sus consejos y observaciones no hubiera culminado este trabajo. Mi admiración, porque no conforme con ser un profesional excelente, es un ser humano aún mejor.

A M. en B. Ma. Elena Rodríguez A. y a T.L. Fernando González M. Que siempre están pendientes de todos nosotros: corrigiendo las burradas y celebrando los aciertos. Realmente son a los que más tengo que agradecer el apoyo que me brindaron para que estas 70 hojas resultaran... De manera especial, a Mate por haberme guiado desde el principio en el desarrollo del proyecto, revisado mi tesis y demás menesteres que esto implica. Y a Fer, por toda su ayuda en aquellos difíciles momentos de utilizar el HPLC, sin ti, no sé que hubiera hecho...

Al Dr. Eduardo Bárcana G. y a M. en C. Sandra Pérez M. Quienes tan amablemente me ayudaron en los últimos meses de mi trabajo experimental, asesorándome y dándome "asilo" en su laboratorio.

A los miembros del jurado por sus valiosas y afinadas observaciones que enriquecieron mi trabajo.

A aquellos *maestros* que sin duda alguna han dejado una huella en mí; quizá un consejo, una enseñanza, ese "algo" especial que inculcaron en mí: Paly y Raúl, Jorge Montaña, Yolanda González, Andoni Gamiz, Adela Castillejos, Fanny Iturbe y Raúl Garza... ¡G R A C I A S !

Al resto de personas que conforman mi vida: Tíos, primos, sobrinos, amigos, no se me ofendan porque los "aglutino" en este párrafo, pero son tantos que jamás terminaría!!! Sepan que así de grande es mi cariño por ustedes.

Y...finalmente, creo que es el agradecimiento más difícil de escribir, mas no de sentir, porque en pocas líneas debo decirte T O O O O D O lo que siento y agregarle lo que no conforme con quererme, me ayudaste en esto de la tesis, en lo que va de la master, y en todo lo que hemos vivido juntos hace poco mas de 1 año. *GUS:* Gracias por ayudarme, por darme todo tu tiempo y atención...pero sobretodo, gracias por amarme tal como soy.

Todos los elementos químicos más pesados que el Helio, se formaron alguna vez en el interior de una estrella.

Así, el Oxígeno y Nitrógeno que respiramos, el Carbono de nuestros tejidos, el Calcio y Fósforo de nuestros huesos, todos los elementos que nos componen, fueron alguna vez parte de una estrella.

De esta manera, somos una componente orgánica de la evolución del universo... y puede decirse, sin exageración alguna, que somos descendientes de las estrellas!!!

"... The world today is made, it is powered by science; and for any man to abdicate an interest in science is to walk with open eyes towards slavery..."

J. Bronowski *in Science and Human Values.*

ÍNDICE GENERAL

	PAGINAS
ÍNDICE DE TABLAS.	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.	V
I.- INTRODUCCIÓN.	1
II.- OBJETIVOS.	
2.1. Objetivo general.	3
2.2. Objetivos específicos.	3
III.- ANTECEDENTES.	
3.1. La sacarosa como materia prima.	4
3.2. La isomaltulosa.	6
3.2.1. Procesos de producción.	6
3.2.2. Características fisicoquímicas.	8
3.3. La enzima isomaltulosa sintasa.	12
3.3.1. Características generales.	12
3.3.2. Microorganismos productores de isomaltulosa.	14
3.3.3. Mecanismos de reacción.	18
3.3.4. Obtención de la enzima.	21
3.3.5. Especificidad de la enzima.	22

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Reactivos y equipos utilizados.	24
4.1.1. Reactivos.	24
4.1.2. Equipos.	24
4.2. Técnicas analíticas empleadas.	25
4.2.1. Cuantificación de isomaltulosa por el método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).	25
4.2.2. Determinación de actividad isomaltulosa sintasa por el método de DNS.	26
4.2.3. Determinación de proteína total por el método de Lowry	27
4.2.4. Identificación de productos por Cromatografía en Capa Fina (CCF).	28
4.2.5. Identificación y cuantificación de productos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).	28
4.3. Procedimiento experimental.	29
4.3.1. Producción de la enzima	29
4.3.1.1. Almacenamiento de la cepa productora de isomaltulosa sintasa	29
4.3.1.2. Fermentación.	30
4.3.1.3. Obtención de celulas y extracto enzimático.	31
4.3.2. Caracterización de la enzima.	32
4.3.2.1. Perfil de temperatura.	32
4.3.2.2. Perfil de pH.	32
4.3.2.3. Estudio de estabilidad a diferentes temperaturas.	32
4.3.2.4. Determinación de las constantes cinéticas.	32
4.3.3. Especificidad de la enzima.	33
4.3.3.1. Reacciones de aceptor.	33
4.3.3.2. Reacciones con diferentes sustratos.	33
4.3.3.3. Reacciones en presencia de tetraborato de sodio.	34
4.3.4. Reacciones de síntesis de isomaltulosa.	34

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
5.1. Producción de la enzima.	35
5.1.1. Selección del microorganismo.	35
5.1.2. Almacenamiento de la cepa.	35
5.1.3. Fermentación.	36
5.2. Caracterización de la enzima.	37
5.2.1. Efecto de la temperatura en la actividad de la isomaltulosa sintasa.	38
5.2.1.1. Determinación de la energía de activación (Ea).	38
5.2.2. Efecto del pH en la actividad de la isomaltulosa sintasa.	40
5.2.3. Estabilidad de la enzima a la temperatura.	41
5.2.4. Constantes cinéticas.	45
5.3. Especificidad de la enzima.	48
5.3.1. Reacciones de aceptor.	49
5.3.2. Reacciones con oligosacáridos.	51
5.3.3. Reacciones en presencia de tetraborato de sodio.	51
5.4. Reacciones de síntesis de isomaltulosa.	52
5.4.1. Modelos cinéticos de predicción para las reacciones.	56
VI.- CONCLUSIONES.	59
VII.- RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS.	61
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PAGINAS
I	Edulcorantes alternativos a la sacarosa	5
II	Propiedades físicas de la isomaltulosa	10
III	Características operacionales de células inmovilizadas en alginatos para diferentes microorganismos	15
IV	Microorganismos productores de isomaltulosa	15
V	Resumen de las características generales de las isomaltulosa sintasa de los principales microorganismos productores de isomaltulosa	17
VI	Extracción de la enzima soluble de <i>E. rhaipontici</i> (NCPB 1578)	21
VII	Composición del medio de cultivo para el crecimiento de <i>Prolaminobacter rubrum</i> .	30
VIII	Composición de la mezcla de oligosacáridos empleada en reacciones de especificidad de la isomaltulosa sintasa	34
IX	Balance general de la fermentación	37
X	Estabilidad de la isomaltulosa sintasa de <i>P. rubrum</i> a diferentes temperaturas	42
XI	Valores reportados de Km para la enzima isomaltulosa sintasa de diferentes microorganismos	46
XII	Resumen de las características fisicoquímicas y cinéticas de la isomaltulosa sintasa	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PAGINAS
1	Estructuras químicas de la sacarosa, trehalulosa e isomaltulosa	9
2	Mecanismos propuestos para la formación de isomaltulosa y trehalulosa a partir de sacarosa	20
3	Curva estándar de isomaltulosa empleando el método de DNS	26
4	Curva estándar de proteína según el método de Lowry	28
5	Cinética de una fermentación típica de <i>Protaminobacter rubrum</i> y producción de la enzima isomaltulosa sintasa	36
6	Perfil de temperatura para la isomaltulosa sintasa de <i>Protaminobacter rubrum</i>	38
7	Representación gráfica de la forma logarítmica de la ecuación de Arrhenius	39
8	Perfil de pH para la isomaltulosa sintasa de <i>Protaminobacter rubrum</i>	40
9	Curva de desactivación de la isomaltulosa sintasa a 50°C	42
10	Estabilidad de la isomaltulosa sintasa a diferentes temperaturas	44
11	Efecto de la concentración de sustrato en la V_i de la reacción catalizada por la isomaltulosa sintasa de <i>P. rubrum</i>	45
12	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de K_m utilizando sacarosa como sustrato	46
13	Efecto de la concentración de metanol en la V_i de la reacción	50
14	Cromatograma de una reacción de síntesis de isomaltulosa en presencia de metanol 20% y sacarosa 10%	50
15	Cinética de producción de isomaltulosa a partir de sacarosa al 10% y 40%	52

Índice general

16	Cromatograma de una cinética típica catalizada por la isomaltulosa sintasa de <i>Protaminobacter rubrum</i> utilizando sacarosa al 10% como sustrato	54
17	Cromatografía en capa fina de una cinética típica de síntesis de isomaltulosa catalizada por la isomaltulosa sintasa de <i>Protaminobacter rubrum</i>	55
18	Relación de productos obtenida por HPLC	56
19	Cinética de producción de isomaltulosa empleando 10% de sacarosa y 7.2 U de isomaltulosa sintasa/mL de reacción	57
20	Cinética de producción de isomaltulosa empleando 40% de sacarosa y 4.8 U de isomaltulosa sintasa/mL de reacción	58

I.- INTRODUCCIÓN.

La reducción de la cantidad de agua disponible en los alimentos hasta el punto de crear condiciones antimicrobianas, es un medio efectivo para la preservación de alimentos. Desde un punto de vista histórico, esta tecnología ha sido empleada con éxito en la preservación de frutas, salchichas, jamones, algunos productos de panificación, leche condensada y una larga lista de productos de gran aceptabilidad. Una de las técnicas más simples de aplicar a la preservación de los alimentos es la adición de sacarosa, la cual, dada su alta solubilidad, permite reducir la actividad acuosa hasta niveles que impiden el crecimiento de microorganismos y las reacciones de deterioro. Sin embargo, esta técnica es de aplicación limitada fundamentalmente por el alto poder edulcorante de la sacarosa. Como consecuencia, los productos así conservados, no son consumidos en mayores cantidades a las actuales por el efecto hostigante que causa un consumo excesivo de sacarosa.

Desarrollos tecnológicos recientes, específicamente relacionados con la biotecnología, han permitido disponer de nuevos azúcares. Existe la alternativa de producir un disacárido conocido como isomaltulosa, empleando la enzima *isomaltulosa sintasa* (IS), producida por diversos microorganismos, (Cheetham, 1987; Mc Allister, 1990; Cheetham, 1984).

La isomaltulosa (conocida también como palatinosa o tilosa) es una 6- α -D-glucopiranosil-D-fructofuranosa (Collins, 1987; Cheetham, 1987), que se encuentra en pequeñas cantidades en la miel; presenta un comportamiento fisicoquímico muy similar al de la sacarosa, con tan solo un 30% de su poder edulcorante y 60% del poder reductor de la glucosa (Cheetham, 1987; Mc Allister, 1990; Cheetham, 1984). Es por lo tanto, una opción de interés en la producción de alimentos de humedad intermedia. Dentro de otras ventajas, destacan: su aplicación ya conocida en alimentos para diabéticos y deportistas, por la lenta liberación de glucosa; su carácter no cariogénico; su mayor

resistencia a la hidrólisis ácida y enzimática (invertasa) que la sacarosa; ser un excelente excipiente para tabletas y la capacidad de ser fermentado por las bifidobacterias y no por las enterobacterias, haciendo desfavorable el desarrollo de los microorganismos de la putrefacción que muestran una tendencia a causar diarrea (Cheretham, 1987; Takazoe, 1989; Low et al., 1988).

Por otro lado, la sacarosa es la materia prima para la elaboración de la isomaltulosa. Hoy en día, la industria de la caña de azúcar se ve seriamente afectada por los edulcorantes competitivos, tanto calóricos (jarabes fructosados), como los no calóricos (aspartamo, sacarina, acesulfame K, etc.) así como los precios internacionales. Ante esta situación, es prioritario encontrar vías alternativas de valoración de la sacarosa, para países productores de azúcar de caña, como es el caso de México.

Desde el punto de vista del funcionamiento de la enzima, existe igual interés para estudiar la especificidad de la reacción y explorar con profundidad el comportamiento de la enzima como glucosiltransferasa. Estos aspectos son de interés básico y aplicado dado el auge de la glicobiotecnología, y en general, de la aplicación de este tipo de enzimas en la síntesis de oligosacáridos como son los fructooligosacáridos (neoazúcares).

Considerando lo antes expuesto, resulta de interés diseñar un proceso integrado que incluya la producción fermentativa de la isomaltulosa sintasa, el estudio de sus propiedades con el fin de explorar aquellas que pudieran resultar en la producción de compuestos de interés además de la isomaltulosa, el diseño de un biocatalizador y de un reactor enzimático para la producción de isomaltulosa y la separación y cristalización de este azúcar.

II.- OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL:

- ◆ Estudiar el comportamiento de la enzima isomaltulosa sintasa con el fin de explorar la posibilidad de desarrollar un proceso enzimático para la síntesis de isomaltulosa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ◆ Seleccionar un microorganismo con la capacidad de producir la enzima isomaltulosa sintasa.
- ◆ Producir la enzima por fermentación en cultivo sumergido.
- ◆ Estudiar las características cinéticas y fisicoquímicas de la enzima, así como algunas características de su especificidad.
- ◆ Explorar el comportamiento de la enzima como glucosiltransferasa.

III. - ANTECEDENTES.

3.1. La sacarosa como materia prima.

La sacarosa, es sin lugar a dudas el edulcorante de mayor consumo mundial. Este importante producto proviene de la caña de azúcar o de la remolacha y representa una de las más importantes fuentes calóricas. Por diversas causas, dentro de las que destacan la sobreproducción agrícola y la producción biotecnológica de productos alternativos como lo son los jarabes con alto contenido de fructosa (JACF) y nuevos edulcorantes sintéticos no calóricos, el precio internacional de la sacarosa ha ido disminuyendo.

Otro factor importante a considerar es el evidente estancamiento que ha sufrido la demanda debido a que existe una tendencia mundial a disminuir el consumo de edulcorantes calóricos en favor de los sintéticos no calóricos (Jacobsson et al., 1986). Por otro lado, dentro de los edulcorantes calóricos, la sacarosa ha venido perdiendo mercado ante el avance de los jarabes fructosados, al grado de haber alcanzado éstos últimos, una producción mundial de casi 8 millones de toneladas, sustituyendo totalmente a la sacarosa en la elaboración de bebidas carbonatadas en los Estados Unidos de Norteamérica (USDA).

En relación con los edulcorantes no calóricos, cuyo consumo se ha incrementado considerablemente en los últimos años, podemos afirmar que el aumento en la demanda responde a la necesidad de disminuir el consumo de edulcorantes calóricos, sacarosa principalmente, por el uso de dietas controladas o bien por programas de prevención, como serían el de la caries dental, de diversas enfermedades como la diabetes, demanda en productos farmacéuticos (como excipiente en tabletas), etcétera. La sacarina, era hasta finales de los setentas, el edulcorante más común, producido por síntesis química a partir de tolueno, con algunas excepciones (como los ciclamatos) era la única opción no calórica (Barry, 1987). Sin embargo, a partir de finales de la década de los 80's, esta fue desplazada casi totalmente por el aspartamo, otro producto de desarrollo de la biotecnología.

Antecedentes

En la Tabla I se presenta un resumen de diversos edulcorantes y su poder endulzante relativo a la sacarosa; al analizar la tabla, se puede apreciar que la influencia de los desarrollos biotecnológicos en este sector ha sido considerable.

Tabla I. Edulcorantes alternativos a la sacarosa.

PRODUCTO	PODER EDULCORANTE (Sacarosa=1)	ORIGEN (*)
Edulcorantes calóricos		
Azúcar invertido	1	Q, E
Fructosa	1.4	E
Jarabes Fructosados (55%)	1	E
Jarabes Fructosados (90%)	1.5	E
Jarabes Maltosados (45-60%)	0.4	E
Jarabes Maltosados (70-85%)	0.6	E
Sorbitol	0.6	Q
Xilitol	1	Q, E
Manitol	0.5	Q
Isomaltulosa	0.3	E
Palatinosa	0.5	EQ
Neozúcares	varios	E
Edulcorantes no calóricos		
Aspartamo	180	QE, FE
Alitamo	2160	QE, E
Acesulfame-K	200	Q
Sacarina	300	Q
Sucralosa	600	QE
Ciclamatos	30	Q
Dihidrochalconas	1800	Q
Monelina (proteína)	2500	N
Taumatina (proteína)	3000	N, F
Esteviosido	300	N
Glicirizina	50	N
Dulcina	200	Q
Miraculina (proteína)	1500	N
Hernandulina	1000	N

N=Natural, Q=Sintético vía química, E=Enzimático, F=Fermentativo o combinaciones de estos
Tomada de López-Munguía, 1993

Podemos entonces concluir que por razones de índole técnico-económico, la industria de la caña del azúcar se encuentra seriamente deteriorada, inclusive con riesgos de quiebra, siendo una de las causas, la producción de jarabes fructosados a partir de maíz en los países donde el cereal es abundante. Otra causa, es de índole social: la tendencia en el primer mundo a disminuir la ingesta de calorías, como consecuencia de excesos en la dieta que han repercutido en un serio problema de obesidad. Finalmente, otras causas resultan de recomendaciones de salud e higiene: está plenamente comprobado que la sacarosa es el inductor de la caries dental, al servir como sustrato a los microorganismos de la microflora salival, para la formación de la placa dental. Todo esto nos lleva a la urgente necesidad de encontrar alternativas agroindustriales para la revaloración de la sacarosa.

3.2.-La isomaltulosa.

3.2.1. Procesos de producción.

La síntesis química de la isomaltulosa resulta demasiado difícil y de costo elevado. Es por esto que los desarrollos biotecnológicos cobran importancia en la producción de isomaltulosa de origen microbiano, ya que se puede diseñar un método con posibilidades de fácil operación a nivel industrial y que nos proporcione un producto de alta pureza, de bajo costo y con buenos rendimientos.

En un principio, se aislaron células de la remolacha proveniente de refinерías, las cuales se crecían inicialmente en un medio con 5% de sacarosa y otros nutrientes; posteriormente, las células se incubaban con un jarabe de sacarosa 20% hasta lograr su conversión total en isomaltulosa (Cheetham, 1987).

Históricamente, el primer reporte que se tiene de la identificación de la isomaltulosa de origen microbiano es de Stodola et al. (1952), y Sharpe et al. (1954), quienes describen que ese compuesto es un subproducto de la formación de leucrosa (5-O- α -D-glucopiranosil-D-fructopiranososa) y dextrana con *Leuconostoc mesenteroides*; sin embargo, la formación de azúcares reductores por estos microorganismos y por *Streptococcus bovis* a partir de sacarosa, fue mencionado con anterioridad por Hehre (1951). Más tarde, Bailey & Bourne (1959), notaron que un disacárido reductor similar a la isomaltulosa era producido por *S. bovis*. Stodola et al (1956) y Sharpe et al. (1960), confirmaron la formación de isomaltulosa por enzimas derivadas de *L. mesenteroides*. Posteriormente, se encontró que una α -glucosidasa de *S. italicus* formaba isomaltulosa como producto de transglucosilación (Halvorsen, 1966). En datos más recientes, Fuji et al (1983), estudió la formación de oligosacáridos por la acción de *S. plymuthica* en sacarosa y encontraron que la isomaltulosa era el producto mayoritario, acompañada de otros azúcares.

En la industria, la isomaltulosa se obtiene vía enzimática empleando la enzima isomaltulosa sintasa y sacarosa como sustrato; generando un intermediario, que seguido de una hidrogenación alcalina con catalizadores Nickel/Raney, permite producir Palatinita®. En ambos casos se requiere de una purificación posterior, seguida de una cristalización, lo cual disminuye de manera importante el rendimiento de isomaltulosa (Cheetham, 1987; Irwin, 1990).

Igualmente, la producción de isomaltulosa se ha realizado por fermentación utilizando *S. plymuthica* (Mc Allister et al., 1990), *Protaminobacter rubrum* (Schiwek et al., 1974 y Takazoe, 1989) o empleando células inmovilizadas de *E. rhapsonticus* (Cheetham et al., 1982 y 1984). Se han encontrado pequeñas cantidades de isomaltulosa en fermentaciones realizadas en estado sólido (Cheetham, 1987).

3.2.2. Características fisicoquímicas.

La isomaltulosa es un disacrido que se encuentra en pequeñas cantidades en la miel (1%) y en el jugo de caña (Cheetham, 1984; 1987; Low & Sporns, 1988 y Takazoe, 1989). Se encontró por primera vez en el proceso de manufactura de la remolacha en 1957 por Weidennagen & Lorenz en la fábrica de una ciudad llamada Palatino, en Alemania, de ahí su nombre trivial de **Palatinosa®** (Takazoe, 1989). Es conocida también como licosa, de acuerdo con la nomenclatura química convencional es una 6- α -D-glucopiranosil-D-fructofuranosa (Cheetham et al., 1982 y Park et al., 1992). En la **Figura 1** se presenta un esquema con su estructura química, así como las de otros azúcares asociados

La isomaltulosa es un isómero funcional de la sacarosa (Mc Allister et al., 1990 y Cheetham, 1984), por lo que presenta un comportamiento fisicoquímico muy similar a ésta; posee tan solo un 30% de su poder edulcorante (Cheetham, 1987 y Mc Allister et al., 1990); es mucho más resistente a la hidrólisis ácida que la sacarosa, en un rango de pH normal de un alimento (2.5-6); por lo que al incorporarla en bebidas carbonatadas o alimentos acidificados con ácidos orgánicos o vitamina C, la proporción de azúcar invertido que se obtiene es considerablemente menor y por lo tanto, son más estables que aquellos que contienen sacarosa (Takazoe, 1989); igualmente, es más resistente a la hidrólisis enzimática (invertasa). Es un azúcar con el 60% del poder reductor de la glucosa, por lo tanto participa en reacciones de oscurecimiento en alimentos (Cheetham, 1984). En la **Tabla II**, se presentan las propiedades físicas de la isomaltulosa.

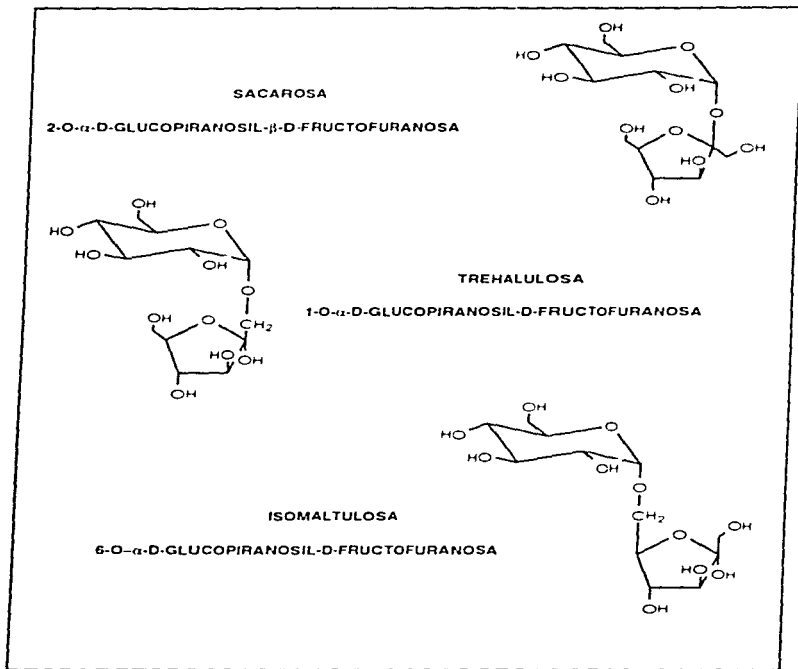


FIGURA 1. Estructuras químicas de la sacarosa, trehalulosa e isomaltulosa.

Tabla II. Propiedades físicas de la isomaltulosa.

Peso molecular (monohidratada)	360 g/mol
Punto de fusión	118 a 122 °C
Densidad absoluta	1.45 g/ml
Solubilidad	70 g /100mL a 30°C
Rotación específica	$[\alpha]_D^{20}$ es de 97.2°
Tipo de fluido	Newtoniano
Viscosidad de una solución	Ligeramente menor que una de sacarosa a la misma concentración
Cristales de la isomaltulosa monohidratada	Biancos y rómbicos

Tomada de Cheetham, 1987 y Tarazoe, 1989.

La estructura cristalina de la isomaltulosa está determinada por un enlace intramolecular entre los átomos de carbono 2 y 2' y varios puentes de hidrógeno intermoleculares. Los espectros de resonancia magnética nuclear, demuestran que existe una relación 1:4 de isómeros α/β a 34 °C, lo que es muy similar a los valores reportados para la fructosa (Cheetham, 1987).

La isomaltulosa tiene un perfil de dulzura, muy similar al de la sacarosa su dulzor inicial se percibe mas rápido que el de la sacarosa, hasta llegar a una gran intensidad y un dulzor final mas débil. Además, no se ha reportado que cambie con la temperatura. Se sabe que cuando se utiliza en alimentos como dulces y chocolates, no se percibe diferencia con la sacarosa en el perfil de dulzor (Tarazoe, 1989). Tiene aplicación potencial en alimentos de humedad intermedia al igual que la sacarosa pero sin llegar a una saturación por dulzor. Esta baja intensidad en su dulzor, permite que el sabor original de un alimento se vea menos enmascarado al emplear isomaltulosa en vez de sacarosa (Cheetham, 1987).

Antecedentes

Aparentemente, no es cariogénica: ello se debe a que las bacterias como *Streptomyces mutans* que forman la placa dental (compuesta por ácidos y polímeros de β -glucanos) no utilizan la isomaltulosa o la hacen en muy bajas cantidades, por lo que producen cantidades nulas o mínimas de lactato a partir de isomaltulosa. Además, inhibe la síntesis de poliglucano insoluble a partir de sacarosa porque funciona como un aceptor de glucosilos (Takazoe, 1989 y Cheetham et al., 1982).

Es metabolizada en forma muy similar a la sacarosa (Cheetham, 1987). Se sabe que es hidrolizada a glucosa y fructosa por la acción del complejo sacarasa-isomaltasa (que también hidroliza maltosa) que se encuentra en el intestino delgado (Takazoe, 1989). Posee el mismo valor calórico que la sacarosa, pero a diferencia de ésta, la velocidad de liberación de monosacáridos al torrente sanguíneo es menor; ésto provoca que los cambios de glucosa en sangre y el requerimiento de insulina sea menor que al metabolizar otros azúcares simples. Además, su absorción es más lenta que la de sacarosa, por lo que cabría la posibilidad de aplicar el uso de la isomaltulosa en alimentos y bebidas para diabéticos y deportistas (Cheetham, 1987 y Takazoe, 1989).

La mayoría de las bacterias entéricas pueden metabolizar muchos azúcares, la isomaltulosa únicamente puede ser utilizada por las bifidobacterias, por lo que favorece su crecimiento y disminuye el desarrollo de microorganismos con tendencia a causar diarrea. Por esta razón, se ha probado en alimentos, bebidas, bebidas fermentadas y fórmulas de medicamentos, especialmente en aquellos que contienen productos lácteos, manteniéndose el perfil de dulzor y sabor. Además, es un excelente excipiente en tabletas (Cheetham, 1987).

Otros estudios han demostrado que la isomaltulosa no produce efectos de mutagenicidad o toxicidad aguda o crónica (Takazoe, 1989).

La función que la isomaltulosa tiene en algunas bacterias como *Erwinia rhapontici* y su función adaptativa es aún incierto. De cualquier modo, esta bioconversión podría ser un método para secuestrar irreversiblemente la fuente de carbono y energía para hacerla menos accesible tanto para la planta que parasita como para otros organismos.

que pueden representar competencia por la sacarosa para *E. rhapsodicus* (Cheetham et al., 1982). Además, se mantiene un balance en el metabolismo ya que provee una reserva de energía a partir de isomaltulosa o trehalulosa (reservas metabólicas endógenas) antes de emplear la sacarosa almacenada o bien, cuando hay ausencia de nitrógeno u otros nutrientes (Cheetham, 1984).

3.3.- La enzima isomaltulosa sintasa.

En la última década, las enzimas han adquirido gran importancia en la industria de los carbohidratos, al encontrar infinidad de aplicaciones en la producción de azúcares y endulzantes. Indudablemente, el avance más significativo ha sido la producción de jarabes de maíz de alta fructosa empleando una enzima inmovilizada: la glucosa-isomerasa. Además, existen muchos otros ejemplos de aplicación de enzimas a nivel industrial; tal es el caso de la producción de jarabes maltosados, aspartame y ciclodextrinas (Cheetham, 1987). Gracias a los grandes desarrollos biotecnológicos recientes, existe la alternativa de producir el disacárido isomaltulosa, empleando la enzima isomaltulosa sintasa (Mc Allister et al., 1990 y Cheetham 1984).

3.3.1. Características generales.

La enzima responsable de la bioconversión de sacarosa en isomaltulosa se localiza en el espacio periplásmico de algunas bacterias como *E. rhapsodicus* (Cheetham, 1984 y 1985) o intracelularmente como en el caso de *S. plymuthica* y *Protaminobacter rubrum* (Cheetham, 1987). Es considerada como una α -glucosiltransferasa que no requiere de cofactores o iones en el mecanismo de acción; tampoco se ha observado que requiera de intermediarios de alta energía como UDP-glucosa o polisacáridos (Cheetham, 1984, 1987; Park et al., 1992 y Takazoe, 1989).

Antecedentes

La enzima forma simultáneamente isomaltulosa y trehalulosa (1- α -D-glucopiranosil- α -D-fructopiranosido). La trehalulosa es un disacárido no cariogénico y poco dulce, cuya solubilidad es mayor que la isomaltulosa y es parcialmente hidrolizada en el intestino delgado, por lo que puede utilizarse como azúcar bajo en calorías; los rendimientos que se obtienen son mucho menores que los de la isomaltulosa. La estructura química de la trehalulosa, se presenta en la **Figura 1** (Cheetham, 1985 y 87).

La isomaltulosa sintasa no es una enzima común, ya que la reacción que lleva a cabo semeja mas una catálisis química que una biocatálisis. La enzima produce simultáneamente isomaltulosa (el producto cinético) y trehalulosa (el producto termodinámico), mediante la hidrólisis de la sacarosa, seguida de la reacción de la glucosa con los carbonos 6 y 1 de la fructofuranosa. La explicación a este fenómeno, se explica en términos de un mecanismo de reacción cíclico que lleva a cabo *E. thapontici*, en donde después de un período prolongado de incubación, la concentración de isomaltulosa disminuye debido a que la enzima la convierte en trehalulosa, por lo que se pueden alcanzar relaciones de 1:15:1 (Cheetham, 1984, 1985 y 1987).

La enzima se ha denominado isomaltulosa sintasa y se ha propuesto incluirla dentro de diferentes grupos para su clasificación: primeramente, el grupo E.C. 5.4.99.- que comprende isomerasas que llevan a cabo transferencias intramoleculares de grupos diferentes a acilos, aminos o fosforilos, en cuyo caso, sería el primer ejemplo de una mutasa sobre azúcares. Alternativamente podría ser la primer glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.-) que posea un mecanismo intermolecular real y/o específicamente una E.C. 2.4.1.18 ya que se asemeja a las enzimas que ramifican la amilopeptina (Cheetham, 1984 y 1987).

Es una enzima inducible en condiciones aeróbicas en medios con sacarosa (Takaoe, 1989). Tiene una alta actividad en ambientes con bajo Aw, lo que permite emplearla exitosamente en procesos a gran escala (Cheetham, 1984);

3.3.2. Microorganismos productores de Isomaltulosa.

De acuerdo con Mc Allister et al., 1990, existen dos tipos de microorganismos productores de isomaltulosa

1. Los que producen isomaltulosa como subproducto en la formación de dextrana, por ejemplo: la dextranacaras de *L. mesenteroides*, y;
2. Aquellos que producen isomaltulosa como producto mayoritario a partir de sacarosa.

En la **Tabla IV** se presenta una lista de microorganismos productores de isomaltulosa sintasa, así como las proporciones de isomaltulosa y trehalulosa que sintetizan.

Cheetham (1987), reporta que tanto *S. plymuthica* como *Protaminobacter rubrum* poseen actividades iniciales más elevadas que *E. rhapsontici*; así mismo, un estudio de estabilidad bajo diferentes condiciones en el almacenamiento de dichos microorganismos, refleja que *S. plymuthica* posee un mayor tiempo de vida media que *Protaminobacter rubrum* y *E. rhapsontici*. Sin embargo, Cheetham seleccionó a *E. rhapsontici* como cepa productora debido a que presenta una mayor estabilidad operacional al emplear células inmovilizadas en alginato.

Por otro lado, se sabe que *E. rhapsontici* es una bacteria que causa podredumbre en el ruibarbo (Cheetham et al., 1982); que *S. plymuthica* es patógena, incluso para el humano (Bergey, 1988) y que *Protaminobacter rubrum* no es patógeno (Irwin, 1990).

Como se puede apreciar en la **Tabla III**, algunas cepas al ser inmovilizadas no producen isomaltulosa con rendimientos suficientes (*Protaminobacter rubrum*) o bien son potencialmente inseguros para utilizarse a gran escala (*S. plymuthica*). Aunque *S. plymuthica* y *Protaminobacter rubrum* posean velocidades altas de producción de isomaltulosa, algunas cepas de *E. rhapsontici* parecen ser más estables cuando las células se emplean en forma continua e inmovilizada (Cheetham et al., 1985).

Tabla III. Características operacionales de células inmovilizadas en alginatos para diferentes microorganismos*.

Microorganismo	Actividad inicial (g/g peso húmedo/hr)	Estabilidad (Vida media en hrs)	% Conversión (1)
<i>E. rhapontici</i> NCPPB 1578	0.441	1507	52
<i>E. rhapontici</i> NCPPB 139	0.39	1877	5.4
<i>E. rhapontici</i> NCPPB 1739	0.35	1840	52
<i>E. rhapontici</i> ATCC 29284	0.621	675	47
<i>S. marcescens</i> NCIB 8285	0.648	121	51
<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928	0.615	242	60.4
<i>P. rubrum</i> CB574 77	0.605	700	25
<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i> (P30/4)	0.12	975	87
<i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i> (P197/5)	0.042	900	31

(1) % Isomaltulosa obtenida a partir de una solución de sacarosa 25% p/p (Cheetham, 1984). *Tomada de Cheetham, et. al., 1985.

Tabla IV. Microorganismos productores de isomaltulosa.

Microorganismo	Isomaltulosa	Trehalulosa	Referencia
<i>E. rhapontici</i> NCPPB 1578	85%	SP	Cheetham 1982, 1984, 1987.
<i>E. rhapontici</i> ATCC 29284	PP	SP	Cheetham et al. 1985
<i>E. carotovora</i>	PP	SP	Cheetham et al. 1985
<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928	87%	SP	Mc Allister et al., 1990, Fuji et al., 1983 y Cheetham, 1984
<i>P. rubrum</i> NCIB2878.	85%	15%	Cheetham, 1984 y Takazoe, 1989.
<i>S. marcescens</i> NCIB 8285	P	NR	Cheetham et al. 1985
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F	SP	NR	Mc Allister et al., 1990 y Bourne et al., 1961
<i>Str. bovis</i> ATCC 33317	<1%	NR	Bourne et al., 1961
<i>S. bovis</i>	P	NR	Cheetham, 1984 y Bailey & Bourne, 1959
<i>S. italicus</i>	P	NR	Cheetham, 1984 y Halvorsen, 1966
<i>Klebsiella</i> sp. Aislada de mango	86%	SP	Takazoe, 1989
<i>Klebsiella planticola</i> MX-10	50%	50%	Nagai, 1994
<i>Ps. mesoacidophila</i> MX-45	9%	91%	Nagai, 1994
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	SP	PP	Nagai, 1994

PP=Produce; PP=Producto principal. SP=Produce como subproducto. NR=No se reporta si produce o no

En el caso de la enzima de *E. rhaipontici* se sabe que es específica tanto para el sustrato como para el aceptor, llevando a cabo un mecanismo intramolecular que únicamente utiliza glucosa y fructosa proveniente de sacarosa. Se reporta que la enzima de *Protaminobacter rubrum*, no es específica y que puede transferir glucosa proveniente de la sacarosa a la arabinosa o la xilosa [Cheetham, 1984 y 87].

La isomaltulosa sintasa es esencialmente irreversible ($K < 0.03M$ de sacarosa remanente, partiendo de $1.6M$), indicando una ΔG de -11.8 KJ/mol, comparada con una ΔG de -28 KJ/mol para la hidrólisis de sacarosa. Las enzimas que catalizan reacciones completamente irreversibles, como la mayoría de las enzimas con un papel regulador en el metabolismo se caracterizan por su valor relativamente grande de ΔG . Así, el bajo valor de ΔG calculado para la isomaltulosa sintasa (aproximadamente -12 KJ/mol) y el hecho de que las energías de hidrólisis de la sacarosa y de la isomaltulosa son pequeñas, (ya que los rendimientos no varían con la temperatura $4-65^{\circ}C$), solo puede atribuirse a que la isomaltulosa tiene una mayor entropía de hidrólisis que la sacarosa. Entonces, después de largos periodos de tiempo la enzima reprocesa lentamente la isomaltulosa y una parte la convierte en trehalulosa [Cheetham, 1984].

Una característica sorprendente es que la formación de ambos disacáridos a partir de sacarosa se da de forma simultánea y no consecutiva. La formación simultánea es una propiedad intrínseca de la enzima, ya que la relación de isomaltulosa y trehalulosa producidas es constante desde el principio de la reacción y bajo diferentes condiciones, mientras que la reacción consecutiva estaría indicada por una relación de concentraciones diferentes a lo largo de la reacción [Cheetham, 1984].

En la **Tabla V** se concentran las principales características para la isomaltulosa sintasa de diferentes microorganismos reportados en la literatura.

Tabla V. Resumen de las características generales de las isomaltulosa sintasa de los principales microorganismos productores de isomaltulosa.

Microorganismo	Forma estudiada	Características
<i>E. thapontici</i> (1)	Células inmovilizadas en alginatos	Km para sacarosa= 280 mM AG reacción= -11.8 KJ/mol AG hidrólisis sac= -28 KJ/mol Ea= 17 KJ/mol
<i>E. thapontici</i> (2)	Células inmovilizadas en alginatos	H de reacción= 14.5 KJ/mol Km para sacarosa= 350 mM a pH 7 y 30°C
<i>S. plymuthica</i> (3)	Enzima purificada	Act. específica= 1.285 U/mg P a pH 6 y 30°C Punto isoeléctrico= 9 PM= 79.500 Da Km para sacarosa= 65.3 mM
<i>S. plymuthica</i> (4)	Enzima inmovilizada en alginatos	Vida media a 25°C en reacciones en lote= 23 días
<i>Protaminobacter rubrum</i> (4 y 5)	Enzima inmovilizada en alginatos	Vida media a 25°C en reacciones en lote= 73 días pH óptimo= 5.5 Km para sacarosa= 140 mM Ki por producto= 310 mM T óptima= 25°C
<i>Protaminobacter rubrum</i> (3)	Células inmovilizadas en alginatos	pH óptimo= 5.5 Km para sacarosa= 140 mM
<i>Protaminobacter rubrum</i> (4)	Células completas	pH óptimo= 6.8 Km para sacarosa= 120 mM
<i>Klebsiella</i> sp. (6)	Enzima purificada	pH óptimo= 6-6.5 T de mayor actividad= 35°C Km para sacarosa= 120 mM Vmax= 110 µg de im/(mL reacc*min)
<i>Ps. mesoacidophila</i> (7)	Enzima purificada	pH óptimo= 5.5 - 6.5 T óptima= 20°C Produce principalmente trehalulosa Km para sacarosa= 19.2 mM Ki por producto= 170 mM

(1) Cheetham, 1984; (2) Cheetham, 1982; (3) Mc Allister et al., 1990; (4) Takazoe, 1989; (5) Cheetham, 1987; (6) Park et al., 1992; (7) Nagai, 1994.

3.3.3. Mecanismos de reacción.

De acuerdo con los estudios realizados por Cheetham (1984), la enzima de *E. rhapsodicus* convierte sacarosa (marcada) en isomaltulosa con un rendimiento aproximado del 85%. Se obtiene también trehalulosa (neologismo propuesto por la analogía con la lactosa/lactulosa respecto al enlace 1-1 que presenta este disacárido) y glucosa y fructosa libres en concentraciones 0.07 y 0.1M, respectivamente. No se reporta formación de oligosacáridos lo que muestra que el agua y los disacáridos obtenidos, son aceptores débiles. La isomaltulosa formada específicamente de sacarosa marcada radioactivamente, puede hidrolizarse por la acción de la isomaltulosa sintasa de *E. rhapsodicus* para dar glucosa y fructosa marcadas. La isomaltulosa y trehalulosa marcadas, también pueden purificarse por cromatografía. La isomaltulosa no puede ser convertida a trehalulosa empleando la isomaltulosa sintasa y/o viceversa y tanto la isomaltulosa como la trehalulosa no pueden ser convertidas a sacarosa al incubarlas con esta enzima. La trehalulosa obtenida, se encuentra presente 33% en forma de fructofuranosa y 66% como fructopiranososa.

En estudios hechos con enzima impura de *E. rhapsodicus* por Cheetham (1984), se ha encontrado que largos períodos de incubación causan la concentración de isomaltulosa hasta alcanzar su máximo y luego se transforma lentamente en trehalulosa. Esto se atribuye a la isomaltulosa sintasa y no a otras enzimas contaminantes, en 1964 se estudiaron células de *S. pyomuticus* y *Protaminobacter rubrum* con radioactividad y concluyeron que es la actividad glucosiltransferasa la responsable de este hecho.

Se ha propuesto un mecanismo de transglucosilación intramolecular que posee el mismo intermediario para ambos disacáridos formados que únicamente utiliza glucosa y fructosa proveniente de sacarosa. La reacción no es mediada por dos enzimas diferentes que se encuentren asociadas ni con una sola enzima que posea dos sitios activos con diferentes especificidades (Younis et al., 1970). Esto se comprueba al observar que los

monosacáridos exógenos marcados no se incorporan a ningún disacárido al adicionarlos solos o con sacarosa, y porque estos monosacáridos, no afectan la proporción de los productos formados, y el consumo de sacarosa. Se piensa que existe un intermediario enzima-glucosa, ya que si la glucosa estuviera libre, podrían formarse azúcares como trehalosa, isomaltosa, maltosa, maltulosa y/o maltotriosa (Cheetham, 1984).

Una lógica semejante implicaría la existencia de un complejo enzima-fructosa. Además, la especificidad absoluta al sustrato que posee la enzima y el hecho de que no reaccione y produzca monosacáridos, también implica que existan múltiples sitios de unión entre la sacarosa y la enzima (**Figura 2A**).

Este mecanismo se propone, considerando la unión de la sacarosa con la enzima, formando un "enlace o puente" entre ésta y su posterior hidrólisis (Cheetham, 1987), seguida de la reacción de transferencia de la glucosa a los grupos hidroxilo de los carbonos 6 y 1 de la fructofuranosa respectiva (**Figura 2A**) (Cheetham, 1984 y Mc Allister et al., 1990). Sorprendentemente, la formación de somaltulosa requiere que el residuo de fructosa rote aproximadamente 180°, mientras que la trehalulosa no necesita de una rotación tan grande y presumiblemente se forma antes de que el complejo enzima-fructosa pueda rotar.

Otra alternativa menos posible de mecanismo, es la propuesta que contempla únicamente la unión de la enzima con la glucosa, formando un complejo enzima-glucosa y entonces éste reaccionaría con la fructosa que quedaría libre ya sea en forma de piranosa o de furanosa. La isomerización de la furanosa a piranosa con la subsecuente reacción a trehalulosa (**Figura 2B**) no es muy factible, ya que la glucosilación puede ocurrir antes de la mutarrotación y se formarían disacáridos con uniones β , lo cual no se observa. Quizá la fructosa se mantiene en su configuración de furanosa debido a su asociación con aminoácidos reactivos en el sitio activo de la enzima. Una reacción vía fructosa de cadena abierta, no es factible, tal como lo demuestra la R.M.N., ya que las cantidades presentes son muy pequeñas y la reacción no se inhibe con xilitol o manitol, los cuales pueden formar complejos con la fructosa acíclica (Cheetham, 1984).

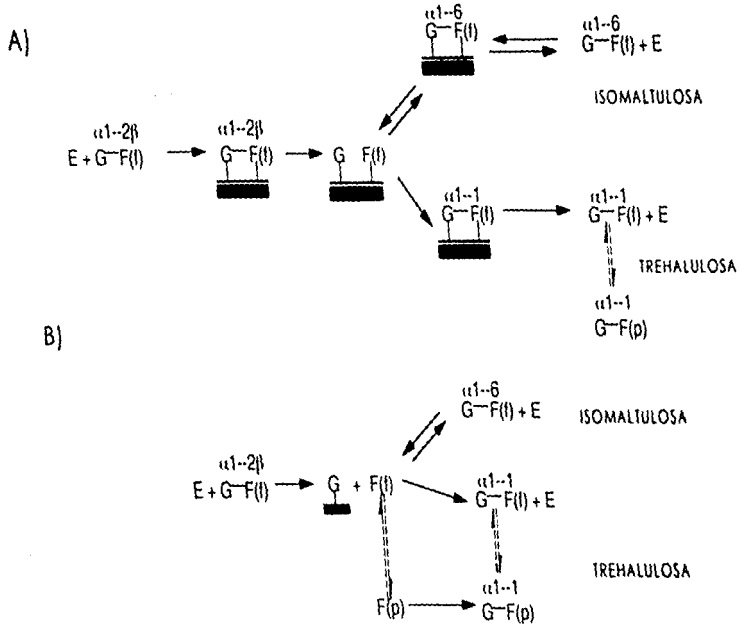


FIGURA 2. MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA FORMACION DE ISOMALTULOSA Y TREHALULOSA A PARTIR DE SACAROSA.

G Glucopiranos; F(I) Fructofuranosa; F(p) Fructopiranos;
 E y ■ Enzima.

3.3.4. Obtención de la enzima.

La enzima de *E. thapontici* que se encuentra en el espacio periplásmico de la célula, puede extraerse mediante un choque osmótico. Sin embargo, se obtiene acompañada de otras enzimas periplásmicas como la fosfatasa ácida y pequeñas cantidades de enzimas citoplasmáticas. Otros métodos que resultan menos exitosos para la extracción de la isomaltulosa sintasa en *E. thapontici* son: sonicación, lisis celular, tratamiento con detergentes y agitador de Mickle. La mayor parte de ellos tiene el inconveniente de afectar negativamente la actividad específica (Cheetham, 1984).

Conforme a lo reportado por Mc Allister et al (1990) la isomaltulosa sintasa de *S. plymuthica* posee una actividad específica de 1.285 U/mg prot. que es considerablemente menor a la que presenta Cheetham (1984) para un extracto enzimático crudo obtenido a partir de un choque osmótico. Una comparación de la eficiencia en el método de extracción para la isomaltulosa sintasa de *E. thapontici*, se concentra en la Tabla VI.

Tabla VI. Extracción de la enzima soluble de *E. thapontici* (NCPB 1578)*.

Tratamiento de las células empleadas	Actividad de los restos celulares (μmol/min*mg cell)	Actividad del extracto celular (μmol/min*ml extracto)	Proteína en el extracto celular (mg/ml)	Actividad específica (μmol/min*mg proteínal)	Número de células viables (colonias/peso húm células)
Intactas	59.54	---	---	---	2.2 x 10 ⁸
Agitador Mickle	27.63	4.58	32.6	0.14	6.6 x 10 ⁷
Choque osmótico	22.66	0.12	3.3	4.11	8.2 x 10 ⁸
Sonicador	56.53	1.12	14.9	0.14	N.D.
Detergentes	1.16	0.023	N.D.	N.D.	4.6 x 10 ⁸

N.D. = No determinado. *Tomada de Cheetham, 1984.

Empleando la información anterior, se observa que en los extractos intracelulares liberados no se detecta sacarosa o isomaltulosa, lo cual indica que la enzima que produce isomaltulosa no se localiza intracelularmente en el caso de *E. rhapontici*. El extracto soluble obtenido por choque osmótico, contiene 10 proteínas según el gel de poliacrilamida realizado por Cheetham, 1984. Esto implicaría una posible contaminación de dichas proteínas en aquellos experimentos en que se utilice extracto crudo. Sin embargo, tal y como lo explica el mismo autor, se tienen evidencias de que la actividad isomaltulosa sintasa se debe únicamente a la acción de ésta enzima y no de alguna otra proteína.

En el caso de las enzimas de *S. plymuthica* y *Protaminobacter rubrum* que son intracelulares, las células se rompen por sonicación y se obtiene el extracto enzimático intracelular, el cual se purifica y/o se inmoviliza para ser estudiado (Park et al., 1992 y Mc. Allister et al., 1990).

3.3.5. Especificidad de la enzima.

La enzima de *E. rhapontici* es específica para la sacarosa como sustrato, por lo que únicamente utiliza glucosa y fructosa proveniente de sacarosa. Se ensayó con una variedad de azúcares incluyendo maltosa, lactosa, rafinosa, galactosa, arabinosa y manosa tanto solas como con sacarosa, sin obtener reacción. Dicha especificidad absoluta por el sustrato, donador y aceptor es sorprendente porque la sacarosa es una molécula pequeña y porque la isomaltulosa sintasa de otros microorganismos utilizan bastante bien maltosa, arabinosa y glucosa como aceptores (Cheetham, 1984 y 1987).

Para *Protaminobacter rubrum* se sabe que la enzima puede transferir glucosa de la sacarosa a arabinosa o xilosa. Sin embargo, ni *Protaminobacter rubrum* ni *E. rhapontici* actúan en galacto-sacarosa, epímero en C-4 de la sacarosa (Cheetham, 1987).

Anlecedentes

La acción de las células de *S. plymuthica* sobre sacarosa en presencia de manosa o arabinosa, produce α -D-glucosil-manósido ó α -D-glucosil-arabinósido. En el análisis de especificidad respecto al sustrato para la enzima pura de *S. plymuthica* resultó negativo para todos los di y trisacáridos (maltosa, maltotriosa, lactosa, celobiosa, isomaltulosa, trehalosa, turanosa y rafinosa), excepto para sacarosa (Mc Allister et al., 1990).

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Reactivos y equipos utilizados.

4.1.1. Reactivos:

Los reactivos y medios de cultivo empleados en el presente trabajo fueron adquiridos en las siguientes casas distribidoras:

- Bioxon Becton Dickinson
- Difco Lab
- J.T. Baker
- Merck de Mexico, S.A. de C.V.
- Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.

4.1.2. Equipos:

Los equipos utilizados, se describen a continuación:

- Incubadora New Brunswick Scientific, Co. Inc. Serie 25.
- Espectrofotómetro Beckman DU 650
- Autoclave TOMY Seiko Co LTD SS-325E.
- pHmetro Corning 125.
- Centrifuga Beckman JH-25
- Sonificador Soniprep 150 MSE
- Microfuga Beckman 12.
- Baño de temperatura controlada Polytherm Science/Electronics, Inc.

4.2. Técnicas analíticas empleadas.

4.2.1. Cuantificación de Isomaltulosa por el método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).

a) Preparación de la solución patrón:

- Disolver en agua destilada 0.1 g de isomaltulosa y aforar a 10 mL

b) Técnica:

- Colocar alícuotas desde 0.1 hasta 4 mL de la solución patrón en diferentes tubos de ensaye.
- Aforar con agua destilada a 10 mL.
- Tomar 0.5 mL de cada solución y agregar 0.5 mL de DNS (se prepara disolviendo 300 gr. de tartrato de sodio y potasio, 16 gr. de NaOH y 10 gr. de ácido 3,5-dinitrosalicílico en agua destilada y posteriormente se afora a 1 Lt. (Sumner, & Howell, 1935).
- Poner a ebullición en un baño durante 5 minutos.
- Enfriar en un baño de hielo durante 5 minutos.
- Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada.
- Agitar los tubos.
- Leer a 540 nm contra un blanco (El blanco se prepara de la misma manera pero se emplea agua en lugar de muestra).

La curva estándar se presenta en la **Figura 3**. Por otro lado, para la toma de muestra, se procede de la siguiente forma:

- Tomar una alícuota de 0.5 mL.
- Agregar 0.5 mL de DNS.
- Proceder de la misma manera que con la curva patrón.

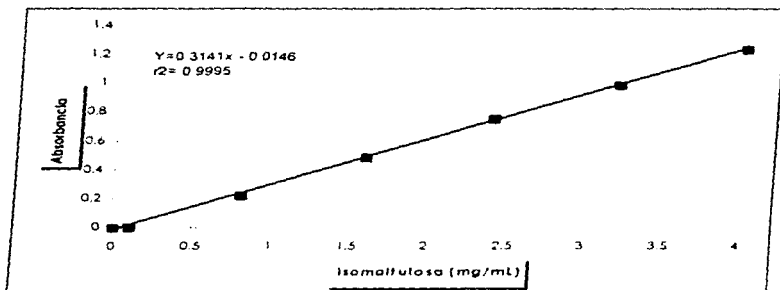


Figura 3. Curva estándar de isomaltulosa empleando el método de DNS. Se grafica la absorbancia a 540 nm vs. concentración de isomaltulosa (mg/mL).

4.2.2. Determinación de actividad isomaltulosa sintasa por el método DNS.

Para medir la actividad enzimática se utilizó como sustrato sacarosa, a concentración final de 10% p/v, la cantidad de enzima (ya sea como extracto enzimático o células completas) puede variar de 0.5 a 1 U/mL en amortiguador de fosfatos 0.1M pH=6, preincubando la mezcla sustrato-enzima por 5 minutos a una temperatura de 30°C. Se tomaron muestras durante los primeros 15 minutos de la reacción y se determinó la cantidad de isomaltulosa por el método de DNS, leyendo la absorbancia a 540 nm. Una **unidad de actividad isomaltulosa sintasa** se define como la cantidad de enzima que produce un μmol de isomaltulosa/min a pH=6 y 30°C y sacarosa 10%. La **actividad específica** se define como las unidades de isomaltulosa sintasa/mg. de proteína.

4.2.3. Determinación de proteína total por el método de Lowry (Adaptación). (Lowry et al., 1951).

Para esta determinación se emplearon las siguientes soluciones:

- A) Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1M.
- B) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%.
- C) Tartrato de sodio y potasio al 1%.
- D) Soluciones C + B en relación 1:1 v/v.
- E) Soluciones D + A en relación 1:49 v/v preparada el día del ensayo.
- F) Reactivo Folin-Ciocalteu y agua destilada en relación 1:2 preparado el día del ensayo.

La técnica se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

- Tomar 1 mL de muestra (diluída 1:10).
- Agregar 5 mL de reactivo E.
- Agitar y dejar en reposo 10 minutos.
- Agregar 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu.
- Agitar y dejar en reposo 30 minutos.
- Leer a 590 nm contra un blanco. El blanco se prepara de la misma manera pero se emplea agua en lugar de muestra.

Preparar una curva estándar con albúmina sérica bovina con concentraciones de 0 a 200 $\mu\text{g/mL}$. El resultado se presenta en la **Figura 4**.

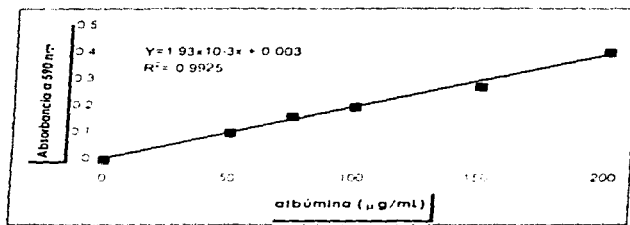


Figura 4. Curva estándar de proteína empleando albúmina sérica bovina como estándar, según el método de Lowry, y obteniendo absorbancia a 590 nm.

4.2.4. Identificación de productos por Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Se aplica 1 µL de cada muestra en una cromatoplaque de tipo HPL Silica Gel 60 A, 200 µm grosor Watman Inc la fase móvil empleada consiste en una mezcla de butanol:etanol:agua (3:5:2); la placa se rocía con una solución alcohólica de α -naftol al 2.5% y se reveló a 100°C (Joseph et al., 1986). Los R_f 's observados para los estándares de sacarosa e isomaltulosa resultaron ser de 0.59 y 0.52, respectivamente.

4.2.5. Identificación y cuantificación de productos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Se trabajó con un equipo de HPLC (Waters), compuesto de un sistema controlador (Waters 600 E), un inyector automático (Waters 717 plus) y un detector de índice de refracción (Waters 410).

Las condiciones de análisis consistieron en:

- Columna para carbohidratos aminada (Waters para HPLC de 4.6 x 250 mm. Sílica amorfa derivatizada con aminopropilmetilsilil. 60 Å, 4 μm .)
- Fase móvil: mezcla de Acetonitrilo Agua (80:20).
- Flujo de la fase móvil: 1.4 mL/min.
- Sensibilidad del detector: 16.
- Tiempo de corrida de cada muestra: entre 7.5 y 12 minutos.

Las muestras se preparan previamente diluyendo según sea necesario y centrifugando a 12.000 rpm/5 minutos. El volumen inyectado de cada muestra fue de 10 μL . Se obtuvieron curvas patrón aplicando 3, 6, 9, 12 y 15 μL de una solución estándar de fructosa 0.3%, glucosa 0.3%, sacarosa 0.6% e isomaltulosa 0.6%. Los tiempos de retención observados para los diferentes azúcares fueron: fructosa 4.3 minutos, glucosa 4.8 minutos, sacarosa 6.7 minutos, isomaltulosa 7.2 minutos y trehalulosa 8.1 minutos.

4.3. Procedimiento experimental.

4.3.1. Producción de la enzima.

4.3.1.1. Almacenamiento de la cepa productora de isomaltulosa sintasa.

Se partió de la cepa liofilizada de *Protaminobacter rubrum* NRRL B-2348, la cual, se creció en 3mL de agar nutritivo a 30°C/200 rpm/13 hrs. Posteriormente este preinóculo se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL del mismo medio, se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{540\text{nm}} = 0.7$. Una vez alcanzado este punto, se transfirieron 2 mL de cultivo a tubos de vidrio que contenían 2 mL de glicerol 60% (previamente esterilizado durante 15 minutos/121°C a una presión de 15 lb/in²). Se almacenan a 0°C y se emplean como inóculos para las fermentaciones posteriores.

4.3.1.2. Fermentación.

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de *P. rubrum* (Tabla I), se ajustó a un pH=7 con ácido ortofosfórico diluido 1:1 y se esterilizó. Es conveniente señalar que este medio, se utiliza en la producción de dextransacarasa de *L. mesenteroides* (Tsuchiya et al., 1952), difiere del empleado por Cheetham (1984) y Mc Allister et al. (1990) para la producción de isomaltulosa sintasa en diversas bacterias, entre ellas *P. rubrum*, y fue modificado debido a que el medio reportado en la literatura es indefinido, se compone únicamente de sacarosa, peptona y extracto de carne, lo que hace que no se tenga un control en los nutrientes presentes. El medio utilizado en el presente trabajo, es totalmente definido, la disponibilidad de sus componentes es mayor y el crecimiento de la bacteria, así como la producción de la isomaltulosa sintasa no se vieron afectados por este parámetro, obteniéndose resultados satisfactorios como se menciona posteriormente en el capítulo 5.

Tabla VII. Composición del medio de cultivo para el crecimiento de *Protaminobacter rubrum*.

Concentración (g/L)	Componente
20	Sacarosa
20	Extracto de levadura
20	K_2HPO_4
0.2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.05	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
0.01	$FeSO_4$
0.01	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$
0.01	NaCl

La sacarosa representa la fuente de carbono durante el crecimiento de la bacteria e induce la producción de la enzima isomaltulosa sintasa.

Se preparó un preinóculo, a partir del glicerol obtenido, inoculando 50 mL de medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL; se creció a 30°C/200 rpm hasta alcanzar una D.O. entre 3 y 3.5 y entonces se procedió a inocular un matraz Fernbach de 2400 mL conteniendo 450 mL de medio. La fermentación se dio por terminada cuando se alcanzó una D.O._{500 nm}=5.

Para confirmar la pureza de los cultivos, al concluir las fermentaciones se sembraron alícuotas de los mismos en placa y se incubaron por 24 horas, observándose crecimiento de colonias blancas que al microscopio dieron tinción de gram negativa y diplococos de tamaño pequeño (Green et al., 1982 y Urakami et al., 1981).

4.3.1.3. Obtención de células y extracto enzimático.

Al término de la fermentación, se centrifugó el contenido del matraz a 10,000 rpm/20 min (utilizando un rotor JA-14 Beckman, Serie 95-U 6657 y una centrifuga Beckmar Model J2-21); se decantó el sobrenadante y se lavaron las células con una solución de NaCl 0.8% (estéril). Se centrifugó nuevamente (en las mismas condiciones); se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH=6. En algunos casos se emplearon las células completas para ensayar la actividad isomaltulosa sintasa. Posteriormente, para obtener el extracto enzimático, se realizó la ruptura de las células mediante sonicación con amplitud de onda de 18 micras y con 5 pulsos de 5 segundos cada uno. Finalmente, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm/10 min para recuperar el extracto enzimático en el sobrenadante. Este extracto se utilizó para realizar tanto la caracterización de la enzima, como las reacciones descritas mas adelante.

4.3.2. Caracterización de la enzima

4.3.2.1. Perfil de temperatura

El perfil de temperatura de la isomaltulosa sintasa se determinó por midiendo la actividad en el extracto enzimático siguiendo el método descrito anteriormente, considerando la incubación a diferentes temperaturas: 10, 20, 27, 30, 35, 40, 45, 50 y 55°C. En este ensayo se empleó un amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 6.

4.3.2.2. Perfil de pH.

Para determinar el perfil de pH de la isomaltulosa sintasa se trabajó de manera similar, en esta ocasión, empleando amortiguadores de acetatos 0.1M para valores de pH de 4, 5, 6 y de fosfatos 0.1M para valores de pH de 6, 7, 8. Los ensayos se realizaron a una temperatura de 30°C.

4.3.2.3. Estudio de estabilidad a diferentes temperaturas.

El estudio de estabilidad de la isomaltulosa sintasa se realizó incubando muestras de extracto enzimático a las siguientes temperaturas: 0, 4, 10, 20, 30, 40, 50 y 55°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó la actividad enzimática.

4.3.2.4. Determinación de las constantes cinéticas

Para conocer el comportamiento cinético y el valor de los parámetros del modelo que los describe, se llevaron a cabo reacciones a diferentes concentraciones de sustrato, empleando extracto enzimático y midiendo la velocidad inicial de la reacción. Los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron de graficar los datos de actividad inicial a altas concentraciones de sustrato de la representación de Lineweaver-Burk y el valor de K_s por medición de la actividad inicial a altas concentraciones de sustrato de la gráfica $1/V$ vs S .

4.3.3. Especificidad de la enzima.

4.3.3.1. Reacciones de aceptor.

Se realizaron pruebas empleando fructosa, glucosa y maltosa como aceptores, en una relación sacarosa monosacárido 1:2. También se llevaron a cabo experimentos con sacarosa al 10% en presencia de etanol (20%) y metanol (20%). Con este último se midió adicionalmente la velocidad inicial de la reacción a concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 40% y se repitió una cinética empleando 9.6 U/ml de extracto enzimático, 10% de sacarosa y etanol 20%.

Las condiciones de trabajo fueron 30°C, empleando amortiguador de fosfatos 0.1M, pH=6. La reacción se siguió durante varias horas, tomando muestra a diferentes tiempos; a dichas muestras se les midió la cantidad de isomaltulosa producida por DNS y se identificaron los productos de reacción empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

4.3.3.2. Reacciones con diferentes sustratos.

Se llevaron a cabo reacciones empleando como sustrato una mezcla de oligosacáridos cuya composición se muestra en la **Tabla VIII**. Las condiciones de ensayo fueron: 30°C, empleando amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH=6 y 4.8 U/ml de extracto enzimático. La reacción se siguió durante varias horas, tomando muestra a diferentes tiempos; a dichas muestras se les midió la cantidad de isomaltulosa producida por DNS y se identificaron los productos de reacción empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Tabla VIII. Composición de la mezcla de oligosacáridos, empleada en reacciones de especificidad de la isomaltulosa sintasa.

Componente	Concentración (mg/g)
Agua	33.4
Glucosa	4.37
Fructosa	6.9
Sacarosa	7.43
Lactosa	372.64
Nistosa	486.2
Fructosil-nistosa	81.97
Difructosil-nistosa	5.38

4.3.3.3. Reacciones en presencia de tetraborato de sodio.

Para este ensayo se empleó tetraborato de sodio en relación molar 1:1 con el sustrato y empleando una concentración de ambos de 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.1 y 0.2 M. Las condiciones de trabajo fueron: 30°C, pH=6, y 4.8 U/mL de extracto enzimático. La reacción se siguió durante varias horas, tomando muestra a diferentes tiempos. A dichas muestras se les midió la cantidad de isomaltulosa producida por DNS y se identificaron los productos empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

4.3.4. Reacciones de síntesis de isomaltulosa.

Se llevaron a cabo en reactores de volumen agitado. Las condiciones manejadas, fueron las siguientes: concentración de sacarosa=10 y 40%, pH=6 con amortiguador de fosfatos al 0.1M, y 4.8 U/mL de extracto enzimático. La reacción se siguió durante varias horas, tomando muestra a diferentes tiempos, a dichas muestras se les midió isomaltulosa producida por DNS y se identificaron y cuantificaron los productos obtenidos empleando las técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía en Capa Fina (CCF).

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Producción de la enzima.

5.1.1. Selección del microorganismo.

Como se menciona en la sección de antecedentes, existen diferentes microorganismos que han sido reportados como productores de isomaltulosa, por lo que para fines del presente trabajo, se preseleccionaron 3 bacterias (*Erwinia rhapsodici*, *Serratia plymuthica* y *Protaminobacter rubrum*) con base en los siguientes criterios: capacidad de producción de isomaltulosa (aproximadamente 85:15 respecto a la trehalulosa); disponibilidad y estabilidad de las cepas. Finalmente, se seleccionó a *Protaminobacter rubrum* porque además de presentar dichas características es una bacteria no patógena, incluso para las plantas (Cheetham 1982 y 1987).

Además, la información existente en la literatura acerca de *Protaminobacter rubrum* y su enzima no es tan basta como en el caso de otras bacterias, por lo que constituye en sí, un interesante campo a explorar para la glucobiotecnología.

5.1.2. Almacenamiento de la cepa.

Durante el desarrollo de este trabajo, la cepa se almacenó en glicerol 60% y fue resembrada cada dos meses para mantener una adecuada conservación de la misma. De acuerdo con lo reportado por Cheetham, 1987, *Protaminobacter rubrum* almacenado en glicerol tiene una vida media de 1444 horas, aproximadamente dos meses. Se realizaron periódicamente observaciones al microscopio para asegurar que no existiera algún cambio morfológico en la bacteria. Así mismo, durante los experimentos realizados no se percibió alguna modificación en el comportamiento o viabilidad del microorganismo.

5.1.3. Fermentación

En la **Figura 5** se puede apreciar que el crecimiento de *Protaminobacter rubrum*, presenta un comportamiento clásico de cinética de crecimiento, una fase de adaptación, una fase exponencial y una fase estacionaria. En lo que se refiere a la síntesis de isomaltulosa sintasa se observa que tanto la actividad por volumen como la actividad específica se encuentran asociadas al crecimiento del microorganismo. De manera que el momento ideal para cosechar las células es al final de la fase exponencial alrededor de las 5 horas de fermentación cuando se ha alcanzado una $DO_{560nm} = 5$. En este punto, la actividad volumétrica fue de 1.43 U/mL de fermentación, equivalente a una actividad específica de la isomaltulosa sintasa fue de 1.14 U/mg de células, respectivamente. Después de las 5 horas de fermentación, al entrar en la fase estacionaria y sobrepasar una $DO_{560nm} = 6$ las células empiezan a lisarse, por lo que no es deseable cosechar las células en este período, ya que la estabilidad de las mismas disminuye considerablemente, al igual que la actividad isomaltulosa sintasa.

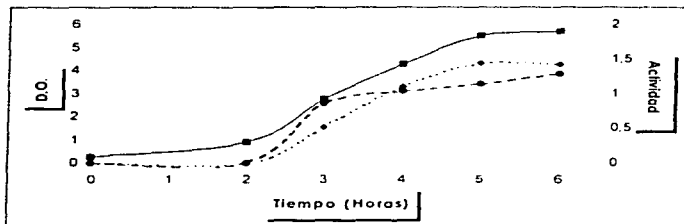


Figura 5. Cinética de una fermentación típica de *Protaminobacter rubrum* y producción de la isomaltulosa sintasa. ■ D.O. a 560 nm, ◆ Act. Vol. (U/mL de fermentación), ● Act. Celular (U/mg de células).

Los valores de actividad enzimática reportados por de *E. rhaponitic* tratadas de igual forma son: 1.12 U/ml y el extracto obtenido, y por Mc Allister et al. (1990), por *pymuthica* es de: actividad específica: 1.285 U/mg de proteína. En el resumen del balance general de la fermentación y por Al comparar estos datos con los reportados en la literatura, la actividad específica de la isomaltulosa sintasa es considerablemente mayor que en las otras dos bacterias, en las condiciones establecidas para llevar a cabo la fermentación, los resultados altamente satisfactorios.

Tabla IX. Balance general de la fermentación

	Volumen Total	U/ml	mg prot celular	U Totales	Proteína Total	P
Células Intactas	30	25.1578	15.56	754.734	466.8	1
Células rotas	30	24.8573	14.93	745.72	504.9	1
Sobrenadante	25	19.3219	12.95	483.05	323.75	1
Residuos celulares	10*	26.2	18.11	262.67	181.15	1

* Volumen en el que fueron resuspendidos los

5.2. Caracterización de la enzima.

En base a los resultados concentrados en la Tabla 5.1, se puede observar que la actividad enzimática cruda, obtenida por sonicación, para el análisis de actividad enzimática, representaría un riesgo potencial de interferencia o contaminación por las enzimas presentes en dicho extracto. Sin embargo, al comparar los resultados de la actividad de la isomaltulosa sintasa, esta sospecha se desechó, ya que los resultados son diferentes a los esperados, tampoco un mayor nivel de actividad enzimática, conversión de éste disacárido en isomaltulosa y trehalulosa a lo largo de éste capítulo y que también es reportado por

Donde:

k = es la constante de la velocidad de reacción.

A = es el factor de frecuencia o factor pre-exponencial.

De la Figura 7 se observa que la energía de activación es igual al producto de la pendiente por la constante general de los gases dada en KJ/(molK) cuyo valor es de 8.315×10^{-3} .

$$E_a = (4810.58) (8.315 \times 10^{-3}) = 40 \text{ KJ/mol.}$$

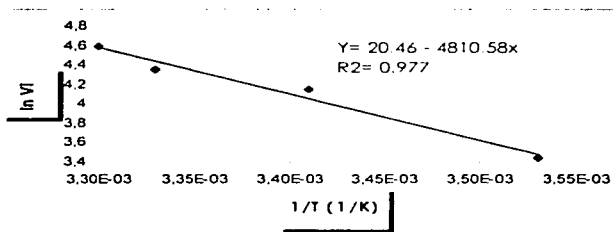


Figura 7. Representación gráfica de la forma logarítmica de la ecuación de Arrhenius para obtener la energía de activación para la isomaltulosa sintasa utilizando sacarosa como sustrato.

Cheetham (1984), reporta una E_a para la reacción catalizada con células inmovilizadas de *E. thapontici* de 17 KJ/mol, valor muy inferior al encontrado en el presente trabajo (40 KJ/mol). Esto puede deberse a que el mecanismo de reacción que se lleva a cabo en cada microorganismo, no necesariamente es el mismo.

5.2.2. Efecto del pH en la actividad isomaltulosa sintasa.

Se estudió el comportamiento de la isomaltulosa sintasa en un intervalo de pH de 4 a 8, manteniendo una temperatura constante de 30°C. En la **Figura 8** se muestra el perfil de actividad de la isomaltulosa sintasa en función del pH, utilizando sacarosa como sustrato. Se observa que el pH de mayor actividad resultó ser de 6. Estos resultados coinciden con lo reportado por Mc Allister et al. (1990), quien encuentra que el pH óptimo es de 6 empleando amortiguador de fosfatos 0.1 M, estudiando la enzima de *S. plymuthica*.

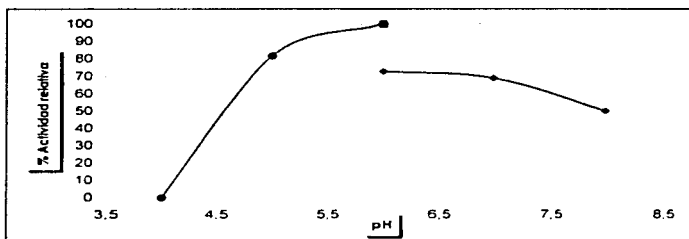


Figura 8. Perfil de pH para la isomaltulosa sintasa de *Profaminobacter rubrum*. Las condiciones de reacción fueron: sacarosa 10%, temperatura = 30°C y 200 μ l de extracto enzimático. Ambas soluciones amortiguadoras se prepararon a una concentración de 0.1M (▲ Acetatos y ● Fosfatos). Se midieron las VI por DNS para cada valor de pH y se expresan como % Actividad relativa.

Aparentemente el amortiguador de acetatos resultó ser mejor que el de fosfatos. Sin embargo, al realizar estudios de estabilidad a diferentes temperaturas y de almacenamiento de la enzima en ambos amortiguadores, se observó que en amortiguador de fosfatos, la enzima presentaba una mayor estabilidad que al encontrarse en amortiguador de acetatos. Probablemente, ésto se deba a que el calcio es secuestrado por los fosfatos y ella repercute en la actividad de la isomaltulosa sintasa, aunque no de manera significativa, como se puede apreciar en la **Figura 8**.

5.2.3. Estabilidad de la enzima a la temperatura.

El proceso de congelación-descongelación afectó drásticamente la actividad, una vez que la enzima se ha descongelado pierde un poco de actividad y no es conveniente volver a congelarla, ya que en algunos ensayos realizados, una segunda descongelación, ocasionó la pérdida total de la actividad. Por lo tanto, no se continuó estudiando la enzima a temperatura de descongelación.

La estabilidad de la enzima se evaluó a 0, 4, 30, 45 y 50°C, a valores de pH=6 y empleando amortiguador de fosfatos y acetatos 0.1 M (excepto para 0 y 4°C). En la **Figura 10** se presenta el comportamiento de la enzima en el extracto enzimático a diferentes temperaturas. Se aprecia que a 4°C se presenta la máxima estabilidad y que ésta disminuye conforme aumenta la temperatura, de manera que a 50°C la enzima sufre una desactivación drástica.

Los resultados son más claros al analizarlos en términos de la vida media de la enzima, considerando que la caída de actividad respecta al tiempo es de primer orden, como se ilustra en la **Figura 9** para una temperatura de 50°C en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH=6. La constante de desactivación de primer orden y el tiempo de vida media están relacionados de la siguiente forma:

$$A=A_0e^{-kt} \text{ cuando } A=1/2 A_0 \text{ se tiene que } t_{1/2} = \ln 2/k$$

Donde:

A= Actividad residual

A₀= Actividad inicial

k= Constante de desactivación; es igual al valor de la pendiente de la recta que se obtiene de graficar $\ln A$ vs. Tiempo (**Figura 9**).

t= tiempo.

t_{1/2}= tiempo de vida media.

Resultados y Discusión

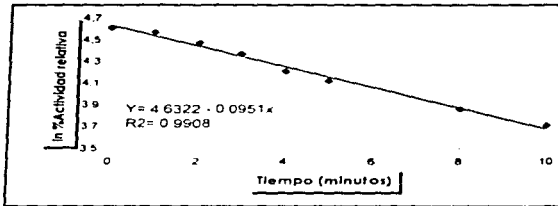


Figura 9. Curva de desactivación de la isomaltulosa sintasa en el extracto enzimático con respecto al tiempo, a una temperatura de 50°C y pH=6 empleando amortiguador de fosfatos 0.1 M.

Los tiempos de vida media para la isomaltulosa sintasa a diferentes condiciones de temperatura, se muestran en la Tabla X.

Tabla X. Estabilidad de la isomaltulosa sintasa de *P. rubrum* a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo de vida media
4	3.75 meses
30	38 días
45	4.26 horas
50	7.29 minutos

Extracto enzimático se incubó a la temperatura indicada en amortiguador de fosfatos 0.1 M a un pH=6

Algunas ocasiones en que se almacenó el extracto enzimático por períodos mas prolongados, se observó la aparición de un pigmento rosado característico de este género (Green et al., 1982 y Urakami et al., 1981); en ese momento, la actividad enzimática disminuía notoriamente y por lo tanto no se consideró adecuado seguir empleando la muestra para experimentos posteriores.

Estos resultados tienen implicaciones importantes en términos del desarrollo de un biocatalizador de isomaltulosa sintasa y de su aplicación, debido a que es fundamental seleccionar condiciones en las cuales, la enzima además de ser eficiente, sea estable. En éste caso, a la temperatura de operación (30°C) la enzima presenta un tiempo de vida media de 38 días, valor bastante aceptable comparado con otras enzimas que a la temperatura óptima de actividad, su estabilidad es del orden de minutos, tal es el caso de la dextranasa de *L. mesenteroides* (Kobayashi et al., 1976 y López-Munguía et al., 1993) y de la penicilina acilasa de *E. coli* (Rodríguez et al., 1994).

De igual forma, se realizaron ensayos utilizando células de los mismos cultivos, bajo las mismas condiciones de almacenamiento y en todos los casos la estabilidad de éstas con respecto a la isomaltulosa sintasa para cada una de las temperaturas estudiadas fue menor entre un 10 y 20% aproximadamente. Por lo tanto, en lo sucesivo la enzima se utilizó como extracto enzimático, en amortiguador de fosfatos. En la **Figura 10** se presentan los resultados de la estabilidad de la isomaltulosa sintasa en el extracto enzimático correspondientes a 4, 30 45 y 50°C.

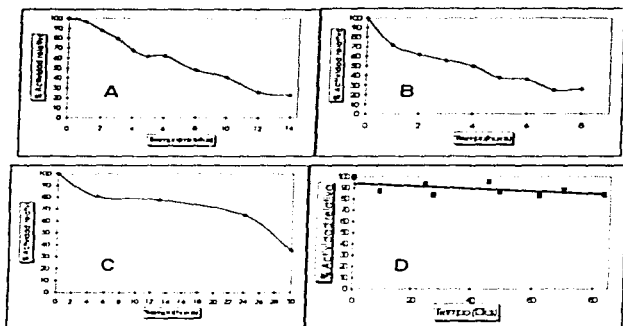


Figura 10. Estabilidad de la isomaltulosa sintasa en el extracto enzimático a diferentes temperaturas: A a 50°C; B a 45°C; C a 30°C; D a 4°C. El extracto enzimático se incubó a la temperatura y tiempo indicados y posteriormente se midieron las velocidades iniciadas por el método de DNS, obteniendo absorbancias a 540 nm. Los resultados se expresan como % de actividad relativa a la actividad inicial.

5.2.4. Constantes cinéticas.

Los resultados del estudio cinético para la isomaltulosa sintasa utilizando sacarosa como sustrato se presentan en la **Figura 11** y **Figura 12**: de donde se puede apreciar que el comportamiento cinético de la enzima es el descrito por Michaelis-Menten.

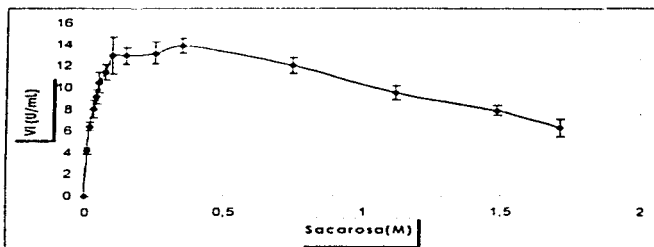


Figura 11. Efecto de la concentración de sustrato en la VI de la reacción catalizada por la isomaltulosa sintasa de *P. rubrum*. Se empleó la enzima en el extracto enzimático a 30°C y pH=6 empleando una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M.

Al graficar los datos de acuerdo con el modelo de Lineweaver-Burk (**Figura 12**), podemos obtener los valores de K_m y V_{max} para la isomaltulosa sintasa, los cuales fueron de 21 mM y 2.3831 U/mg de proteína, respectivamente. Al comparar estos valores con los de otros microorganismos (**Tabla XI**), encontramos que la enzima de *Protaminobacter rubrum* posee una de las K_m más bajas respecto a otros microorganismos similares, lo cual indica que existe una gran afinidad entre la enzima y el sustrato, o bien que en este caso, no existen problemas de difusión.

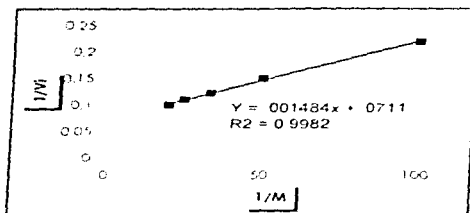


Figura 12. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de K_m utilizando sacarosa como sustrato.

Tabla XI. Valores reportados de K_m para la enzima isomaltulosa sintasa de diferentes microorganismos.

Microorganismo	Forma	K_m reportado	Referencia
<i>Erwinia thapsinica</i>	Células inmovilizadas	240 mM	Cheatham, 1982
<i>Serratia plymuthica</i>	Enzima purificada	45.3 mM	Mc Alister, 1990
<i>Protaminobacter rubrum</i>	Células completas	120 mM	Takazoe, 1989
<i>Protaminobacter rubrum</i>	Células inmovilizadas	140 mM	Cheatham, 1987 y Takazoe, 1989
<i>Protaminobacter rubrum</i>	Extracto enzimático	21 mM	Este trabajo
<i>Klebsiella sp.</i>	Enzima purificada	120 mM	Park, 1992
<i>Pseudomonas mesoacidophila</i> (produce trehalulosa como producto principal)	Enzima purificada	19.2 mM	Nagai, 1994

La última parte que se estudió dentro de las constantes cinéticas para la isomaltulosa sintasa, fue el efecto de la concentración de sustrato en la velocidad inicial de la reacción. Como se puede apreciar en la Figura 11, la velocidad inicial aumenta rápidamente hasta llegar a un máximo, donde la concentración de sustrato es aproximadamente de 0.35 M y posteriormente cae para concentraciones mayores y hasta de 1.7 M.

A partir de los resultados, donde se aprecia una caída lineal de la velocidad inicial de la reacción, y empleando el inverso de la ecuación de Michaelis-Menten que describe la inhibición por exceso de sustrato se puede calcular la constante de inhibición (K_s) de la siguiente forma:

$$V_i = (V_{max} \cdot S) / (K_m + S + S^2 / K_i) \longrightarrow 1/V_i = 1/V_{max} + (K_m / V_{max}) \cdot (1/S) + S / (V_{max} \cdot K_s)$$

A concentraciones altas de sustrato, el segundo término es despreciable, y entonces la ecuación se reduce a:

$$1/V_i = 1/V_{max} + S / (V_{max} \cdot K_s)$$

Al graficar $1/V_i$ vs. $[S]$ se obtiene que:

$$y = 60.16x + 37.94$$

$$r^2 = 0.99988566$$

y por lo tanto:

$$K_s = 1.18 \text{ M}$$

Es importante resaltar que en la literatura, no se reportan valores de K_s para la isomaltulosa sintasa de ningún microorganismo, únicamente se mencionan los valores de K_i por producto para esta enzima en algunas bacterias.

A manera de resumen, la **Tabla XII** condensa los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica y cinética de la enzima.

Tabla XII. Resumen de las características fisicoquímicas y cinéticas de la isomaltulosa sintasa.

K_m	21 mM
V_{max}	2.38 U/mg proteína
K_s	1.18 M
E_a	49 KJ/mol
pH de máxima actividad	6 (acetatos)
pH de máxima estabilidad	6 (fosfatos)
Temperatura de máxima actividad	30°C
Temperatura de máxima estabilidad	4°C
Vida media a 4°C	3.75 meses
Vida media a 30°C	38 días

5.3. Especificidad de la enzima.

De acuerdo con la hipótesis de Cheetham (1984), la isomaltulosa sintasa lleva a cabo un mecanismo de transglucosilación intra y monomolecular que posee el mismo intermediario tanto para la isomaltulosa como para la trehalulosa formadas. Esto sugiere, que la reacción podría llevarse a cabo debido a la acción de dos enzimas diferentes o de una misma que posea dos sitios activos, sin embargo, la evidencia experimental que Cheetham presenta, presume que esto no sucede así (ver sección de antecedentes), por lo que el mecanismo que se propone, considera la unión de la sacarosa con la enzima, su hidrólisis y la síntesis de los enlaces α -1,6 ó α -1,1 mediante una reacción no selectiva de la glucosa con los grupos hidroxilos de los carbonos 6 y 1 de la fructofuranosa.

De esta manera, en el presente trabajo, se llevaron a cabo experimentos con el propósito de conocer algo más del comportamiento de la enzima, aprovechando indirectamente la eventual capacidad de transferencia que pudiese presentar hacia moléculas ajenas a la propia sacarosa.

5.3.1. Reacciones de aceptor.

Para lo antes mencionado, se emplearon fructosa, glucosa y maltosa como posibles aceptores del grupo glucosilo que se presume, transfiere la isomaltulosa sintasa a la fructofuranosa para formar isomaltulosa. Si la enzima fuera capaz de transferir la glucosa a tales aceptores en la mezcla final de reacción, existirían otros productos como maltosa o maltotriosa. Al realizar estas reacciones, se encontró que ninguna de las tres moléculas es usada por la isomaltulosa sintasa como aceptor y por lo tanto, los únicos productos que se observaron fueron isomaltulosa y trehalulosa, en las proporciones usualmente formadas.

Otra alternativa la constituyó el uso de agentes nucleofílicos alternos al agua, tales como etanol y metanol. Cuando se empleó una concentración de etanol de 20%, no hubo reacción, por lo que es evidente que bajo estas condiciones, la enzima se inhibe y/o desactiva.

En el caso del metanol, también existe un efecto negativo sobre la actividad de la isomaltulosa sintasa, como se muestra en la **Figura 13**. Sin embargo, al ensayar una reacción con 20% de metanol, se obtiene, además de isomaltulosa, trehalulosa y fructosa libre en las concentraciones habituales, metil glucósido, con un tiempo de retención en el análisis por HPLC de 3.6 minutos (**Figura 14**). Este último producto, es resultado de la transferencia de la glucosa (que se aprecia habitualmente en forma libre) al metanol presente en la mezcla de reacción. De este hecho, podemos afirmar que el metanol es un aceptor débil dentro de esta reacción, porque la síntesis de isomaltulosa no se ve afectada por la presencia del metanol. Además, este hecho concuerda con la hipótesis planteada por Cheetham para el mecanismo de reacción de la isomaltulosa sintasa en *P. rubrum* (que se presume no es específica para aceptor), ya que la formación de metil-glucósido se debe a que la enzima ha transferido la glucosa al metanol. Entonces, podemos concluir que en la reacción de hidrólisis se transfiere la glucosa y el metanol funciona como aceptor, lo que sugiere una eventual formación de un intermediario enzima-glucosa en el mecanismo de esta reacción.

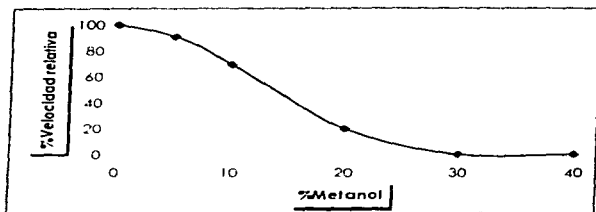


Figura 13. Efecto de la concentración de metanol en la VI de la reacción. La concentración empleada de sustrato fue siempre constante (10%). Se trabajó a 30°C y pH=6 en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M.

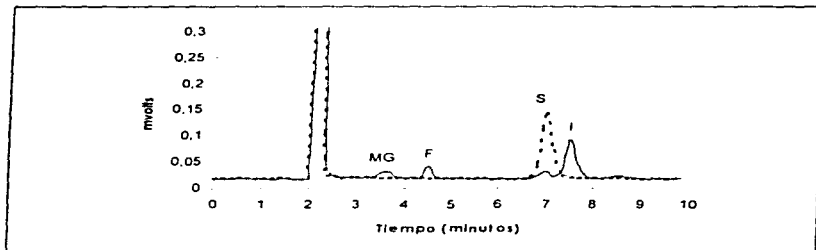


Figura 14. Cromatograma de una reacción de síntesis de isomaltulosa en presencia de metanol 20% y sacarosa 10%. La reacción se trabajó bajo las siguientes condiciones: temperatura de 30°C, y solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH=6. En el análisis por HPLC la fase móvil utilizada fue acetónitrilo:agua 80:20. Los productos obtenidos fueron: MG (metil-glucósido), F (Fructosa), S (Sacarosa), e I (Isomaltulosa).

5.3.2. Reacciones con oligosacáridos.

El empleo de una mezcla de oligosacáridos se realizó con la finalidad de conocer si la enzima era capaz de utilizar otro sustrato, como por ejemplo, la kestosa (O- β -D-Fructofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-Fructofuranosil- α -D-glucopiranosido) (Collins, 1987), de la que tomaría el residuo glucopiranosil y lo transferiría a cualquiera de las 2 fructosas que contiene la kestosa. En el desarrollo de la reacción no se observó la aparición de algún producto nuevo, tampoco cambió la concentración de los componentes originales de la mezcla, a excepción de la pequeña cantidad de sacarosa que fue convertida en isomaltulosa. A partir de estos resultados podemos afirmar que la sacarosa fructosilada, deja de ser reconocida por la isomaltulosa sintasa.

5.3.3. Reacciones en presencia de tetraborato de sodio.

El tetraborato de sodio, reacciona selectivamente formando complejos con la fructofuranosa libre (Cheetham, 1984) por lo que se planteó la probabilidad de que la reacción catalizada por la isomaltulosa sintasa en presencia de tetraborato, podría interferir en la formación del complejo enzima-fructosa en la formación de isomaltulosa. En condiciones equimolares de sustrato borato, se observó que la velocidad inicial de la reacción disminuye considerablemente conforme aumenta la concentración del borato. Para una concentración de 0.1M de cada uno, la reacción se inhibe completamente. En el análisis de HPLC, a los 30 minutos de la reacción con una concentración de 0.04M se observa que se ha consumido casi por completo la sacarosa, se ha formado glucosa libre en las cantidades habituales, pero no aparece la señal que da la isomaltulosa ni tampoco la de fructosa. Esto nos hace suponer que ambos azúcares se han complejado con los boratos y por ello no son detectados. Sin embargo, no es posible asegurar, en base a estos resultados, que se haya formado el complejo.

5.4. Reacciones de síntesis de isomaltulosa.

En la **Figura 15** se observa la evolución de la síntesis de isomaltulosa con el tiempo, empleando diferentes concentraciones de sacarosa (10 y 40%) y 4.8 U/mL de reacción de extracto enzimático. En ambas concentraciones de sustrato se observa la misma tendencia: la única diferencia es obviamente el tiempo que transcurre para que la conversión de sacarosa en isomaltulosa se lleve a cabo por completo (70 vs. 160 minutos respectivamente). De acuerdo con lo reportado por Mc Allister et al. (1990), una reacción al 10% p/v de sacarosa catalizada con *S. plymuthica* empleando 1 unidad de enzima purificada, se lleva a cabo en 60 minutos, obteniéndose un rendimiento del 85%; de la misma manera, si se realiza a 40% se obtendrá un 87% de conversión después de transcurridas tres horas. Al comparar estos resultados con los reportados en el presente trabajo, observamos que las reacciones transcurren dentro del mismo intervalo de tiempo.

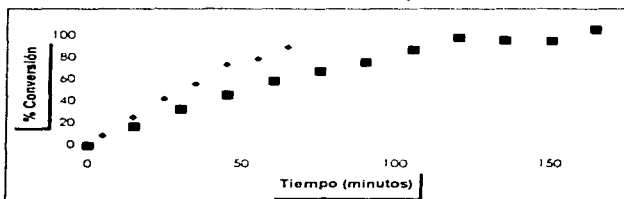


Figura 15.- Cinética de producción de isomaltulosa a partir de sacarosa al 10% (+) y al 40% (■) a pH=6 en amortiguador de fosfatos 0.1M. Se utilizó una concentración de enzima de 4.8 U/mL.

La reacción de formación de isomaltulosa procede hasta llegar a un 95%, en el cual se mantiene sin variaciones aún en periodos prolongados de incubación. Así mismo, las proporciones de glucosa y fructosa libres aparecen desde los primeros minutos de la reacción (simultáneamente a la isomaltulosa) y aumentan, aunque a una velocidad mucho menor al producto principal. Al término de la reacción, la cantidad de sacarosa hidrolizada a glucosa y fructosa nunca es mayor del 10% de cada una. Finalmente la síntesis de trehalulosa tiene lugar poco después de que ha aparecido isomaltulosa, glucosa y fructosa en el medio, aproximadamente cuando se ha consumido el 15-20% de sacarosa. Esta, aumenta lentamente y una vez terminada la sacarosa se mantiene constante de la misma forma que la isomaltulosa (Figura 18). Por lo tanto, no existe evidencia de que la trehalulosa se forme a partir de la isomaltulosa tal y como lo menciona Cheetham (1984). La cantidad de trehalulosa formada no se cuantifica debido a que no existen estándares de este disacárido. Por esta misma razón, el confirmar que este subproducto es realmente trehalulosa necesitaría de un análisis por RMN. Sin embargo, este es el subproducto usual en las isomaltulosa sintasa de otros microorganismos.

En la Figura 17, se muestran los resultados obtenidos por CCF. Los primeros 11 carriles son muestras a diferentes tiempos de la reacción. Se puede apreciar que conforme avanza la síntesis, la cantidad de isomaltulosa aumenta y la de sacarosa disminuye. Los carriles 13 y 14 son estándares de isomaltulosa 0.3% y sacarosa 0.3%, respectivamente; y el carril 12 es un estándar de ambos azúcares. Al momento de revelar la cromatoplaca, se pudo observar de manera muy tenue, una mancha adicional que se presume, es trehalulosa. Empleando esta técnica, no fue posible detectar glucosa y fructosa; sin embargo, como se muestra en la Figura 16, por medio del HPLC si se detectan dichos azúcares.

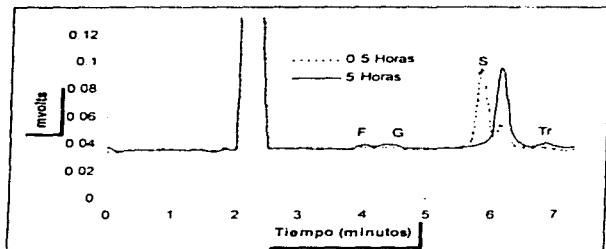


Figura 16. Cromatograma de una cinética lipica catalizada por la Isomaltulosa sintasa de *Protaminobacter rubrum* utilizando sacarosa al 10% como sustrato. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 30°C y pH=6 en solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M. Se ilustra la evolución de la misma a los 30 minutos (----) y después de 5 horas (—). F=Fructosa, G=Glucosa, S=Sacarosa, I=Isomaltulosa, Tr=Trehalulosa.

Como se puede apreciar en el cromatograma, la cantidad de glucosa y fructosa que se forma es muy pequeña con respecto a la obtenida de isomaltulosa. Además se observa la formación de trehalulosa. El inconveniente que ésta técnica presenta, es la dificultad de separar la sacarosa de la isomaltulosa y la trehalulosa, debido a que poseen tiempos de retención muy semejantes.

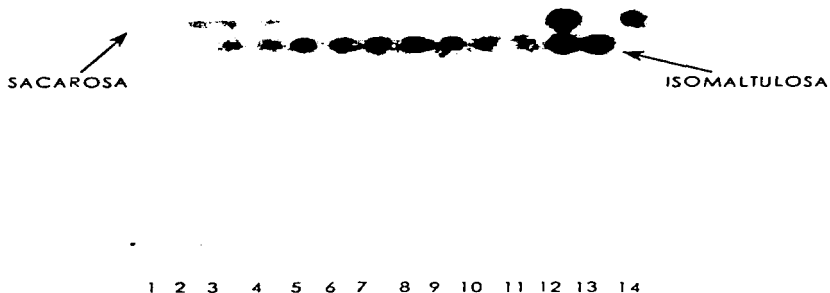


FIGURA 17. Cromatografía en capa fina de una cinética típica de síntesis de isomaltulosa catalizada por la isomaltulosa sintasa de *Proteaminobacter rubrum*, utilizando 1.68 U/ml de enzima (como extracto enzimático) y sacarosa al 10% como sustrato. Se realizó a 30°C en amortiguador de fosfatos 0.1 M a un pH=6. Se empleó una fase butanol:etanol:agua en proporciones 3:5:2. Se ilustra la evolución de la reacción de la siguiente forma: los carriles 1 al 11. representan desde el tiempo cero, hasta las 6 horas de reacción. El carril 12 es un estándar de isomaltulosa 0.3% y sacarosa 0.3%. El carril 13 es un estándar de isomaltulosa 0.3% y el carril 14 es un estándar de sacarosa 0.3%.

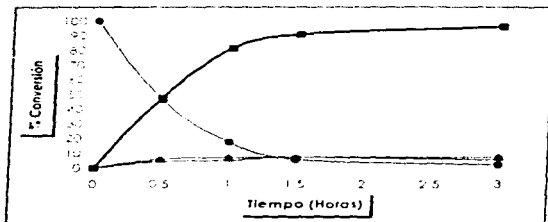


Figura 18. Relación de productos obtenida por HPLC (■ Isomaltulosa, ● Sacarosa, ▲ Glucosa, y ◆ Fructosa), para una cinética al 10% de sustrato y 30 °C, en solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M, pH=6 y 4,8 U de isomaltulosa sintasa por mL de reacción.

5.5 Modelos cinéticos de predicción para las reacciones.

Empleando las constantes cinéticas obtenidas previamente y aplicando el programa ISIMT™ (Interactive Simulator), se construyeron los modelos teóricos de Michaelis-Menten para una cinética de producción de isomaltulosa catalizada con la isomaltulosa sintasa para concentraciones de sustrato de 10 y 40% y con concentraciones de enzima (como extracto enzimático) de 7,2 y 4,8 U, respectivamente. En la Figura 19 y en la Figura 20, se puede apreciar una comparación de dichos modelos con los resultados experimentales. Además para la reacción a 40% de sacarosa, se considera en el modelo una inhibición por exceso de sustrato. Como puede constatarse, el modelo predice adecuadamente el tiempo necesario para la síntesis de isomaltulosa en una reacción al 10% de sacarosa. Sin embargo, para la síntesis de isomaltulosa a altas concentraciones de sustrato, la descripción del modelo es muy diferente al que sucede en realidad, por lo que para obtener una estimación más precisa, particularmente hacia el final de la reacción, se necesitaría involucrar en el diseño, la inhibición por producto.

El modelamiento de las reacciones enzimáticas es importante ya que permiten predecir teóricamente el comportamiento de la enzima en condiciones no probadas, es decir, ahorrando experimentos se pueden conocer (con cierta seguridad), tiempos, rendimientos, así como proponer condiciones de optimización y escalamiento del proceso.

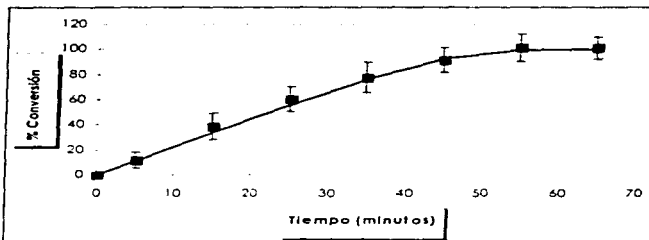


Figura 19. Cinética de producción de isomaltulosa empleando 10% de sacarosa y 7.2 U de isomaltulosa sintasa/mL de reacción. La reacción se llevó a cabo a 30°C y en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH=6. Se compara la evolución experimental (■) con el modelo teórico (—) obtenido a partir de la ecuación de Michaelis-Menten.

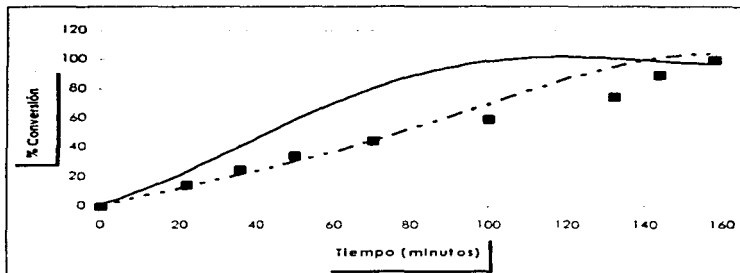


Figura 20. Cinética de producción de isomaltulosa empleando 40% de sacarosa y 4.8 U de isomaltulosa sintasa/ mL de reacción. La reacción se llevó a cabo a 30°C y en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH=6. Se compara la evolución experimental (■) con el modelo teórico obtenido de la ecuación de Michaelis-Menten para la reacción (—) y para la reacción inhibida por exceso de sustrato (---). La desviación estándar promedio para los valores experimentales fue de 9.35%.

VI.- CONCLUSIONES.

- *Protaminobacter rubrum*, es una buena alternativa para obtener la enzima isomaltulosa sintasa, ya que no es patógena, presenta buena estabilidad bajo condiciones de operación y su capacidad de producción de isomaltulosa es aceptable.
- La producción de la enzima, está asociada al crecimiento de la bacteria.
- Las condiciones mas favorables para la síntesis de isomaltulosa, bajo condiciones óptimas de sustrato fueron 30°C y pH 6, los cuales, coinciden con lo reportado en la literatura para *S. plymuthica* y *E. rhapsodic*. Se observó que la enzima presenta mayor actividad a pH 6, empleando amortiguador de acetatos, que de fosfatos.
- La enzima isomaltulosa sintasa, no fue capaz de utilizar como sustrato a ninguno de los derivados de sacarosa utilizados.
- La presencia de aceptores como glucosa y maltosa, no afectan la síntesis de isomaltulosa, por lo que se obtienen los mismos productos, en las mismas cantidades que en ausencia de éstos.
- El etanol presenta un efecto inhibitor sobre la actividad isomaltulosa sintasa.
- La presencia de metanol repercute en la formación de metil-glucósido en pequeñas cantidades además de isomaltulosa, trehalulosa y fructosa libre en las proporciones habituales, por lo que podemos afirmar que la isomaltulosa sintasa reconoce al metanol como un aceptor débil.

Conclusiones

- Al parecer, el mecanismo que lleva a cabo la enzima, es una transglucosilación en donde la isomaltulosa sintasa es específica para el sustrato mas no para el aceptor.
- Las cinéticas de producción de isomaltulosa a bajas concentraciones de sacarosa, se comportan de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten obteniéndose la siguiente relación: Isomaltulosa como producto principal, Trehalulosa, Fructosa y Glucosa libres (menos del 10%) como subproductos.

VII.- RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS.

- Probar otros disacáridos como aceptores para dilucidar en el mecanismo de acción de la enzima.
- Purificar la isomaltulosa sintasa con la finalidad de descartar los efectos por una posible contaminación de otras enzimas presentes en el extracto enzimático.
- Profundizar en el mecanismo de reacción para concretar si la isomaltulosa sintasa es una glucosiltransferasa o una isomerasa.
- Realizar mutaciones al azar, con el objetivo de incrementar la actividad específica de la cepa y/o clonar el gen para sobreexpresar la producción de la enzima.
- Construir un biocatalizador empleando enzima inmovilizada o células completas, para la producción de isomaltulosa a nivel industrial.

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- BAILEY, R. W. & BOURNE, E.J. *Nature* (London) (1959). **194**:904-905
- BARRY, R.D. Outlook for Sugar and Sweeteners. ERS, USDA, 1987.
- BERGEY, D.H., HARRISON, F.C., BREED, R.S., HAMMER, B.W., & HUNTOON, F.M. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. Edition. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA, 1988.
- BOURNE, E.J., HUTSON D.H. & WEIGEL, H. Oligosaccharides in dextran-producing cultures of *Streptococcus boyis*. *Biochem J* (1961) **79**:549-553
- CASTELLAN, G.W. Esicoquímica. 2a Edición en español. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, México, 1987. p.p. 85a
- COLLINS, P.M., Carbohydrates, Ed. Chapman and Hall Chemistry Sourcebooks, London, U.K., 1987. p.p. 293
- CHEETHAM, P.S.J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erythra thopontici*. *Biochem. J.* (1984) **220**:213-220
- CHEETHAM, P.S.J. Production of isomaltulose using immobilized microbial cells. *Meth. Enzym.* (1987); **136**:432-454
- CHEETHAM, P.S.J., GARRET, C. & CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. *Biotech Bioeng.* (1985). **27**:471-481.
- CHEETHAM, P.S.J., IMBER, C.E. & ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erythra thopontici*. *Nature.* (1982) **299**:628-631
- DARNELL, LODISH AND BALTIMORE. Molecular Cell Biology, Ed. Scientific American Book, Inc. U.S.A., 1986. p.p. 154,155.
- FUJI, S., KISHIHASA, S., KOMOTO, M. & SCHIMIZU, J. *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi.* (1983). **30**:339-344.
- GHERNA, R., PIENTA, P. AND COTE, R. ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophages. 16th. Edition. Ed. American Type Culture Collection, USA, 1992
- GREEN, P.N. & BOUSFIELD, I.J. A Taxonomic study of some gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* (1982) **128**:623-638.

Bibliografía

- GREEN, P.N., BOUSFIELD, I.J. & HOOD, D. Three new *Methylobacterium* species: *M. diplospidium* sp. nov., *M. jairamii* sp. nov. and *M. fujisawaense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1986), **38**:124-127.
- GRIMMOND, P.A.D., GRIMMOND, F., DULONG DE ROSNAY, H.L.C. & SNEATH, P.H.A. Taxonomy of genus *Serratia*. *J. Gen. Microbiol.* (1977), **98**:39-66.
- HALVORSEN, H. *Meth. Enzymol.* (1965), **8**:559-562.
- HEHRE, E.J. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* (1961), **11**:297-330.
- IRWIN, W.E. Isomalt: A sweet, reduced-calorie bulking agent. *Food Tech.* (1990), **44**:128.
- JACOBSSON, S., JAMISON, A. & ROTHMAN, H. *In: biotechnological Challenge*. Cambridge University Press, N.Y., U.S.A., 1986.
- JOSEPH, S.B.F., DEKKER, M. Inc. N.Y. AND BASEL, P. *In: Layer Chromatography Techniques and Appl.*, 2nd Edit. Ed. DEKKER, Inc. New York, U.S.A., 1986. Cap. 17, p. 287.
- KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. Purification and properties of extracellular dextransucrase from *L. mesenteroides* B-1299. *J. Biochem.* (1976), **79**:1301-1308.
- LÓPEZ-MUNGUÍA, A. *En: Biotecnología alimentaria*, Eds. GARCÍA, M., QUINTERO, R., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Ed. Limusa México, 1993. Capítulo 16. P.p. 519-552.
- LÓPEZ-MUNGUÍA, A., PELENG, V., REMAUD, M., BITON, J., MICHEL, J. M., LANG, C., PAUL, F. & MONSAN, P. Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *L. mesenteroides* NRRL-1355, for the synthesis of oligoalters. *Enzyme Microb. Technol.* (1993), 1577-1587.
- LOW, N.H. AND SPORNS, P. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *J. Food Sci.* (1988), **53**:558-561.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, J., FARR, A., RONDALL, R. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951), **193**:265-275.
- MACIAS, A. *En: Métodos y técnicas de investigación documental*, Ed. Instituto Nacional de Salud Mental, México, 1993.
- Mc. ALLISTER, M., KELLY, C.T., DOYLE, E. & FOGARTY, W.M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. *Biotech. Letters*. (1990), **12**:667-672.
- HAGAI, Y., SUGITANI, I. & TSUYUKI, K. Characterization of α -glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Biosci. Biotech. Biochem.* (1994), **58**:1789-1793.
- PARK, Y. K., UEKANE, P. T., & PUPINI, A. M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. *Biotech Letters* (1992), **14**:547-551.

- RODRÍGUEZ, M.E., QUINTERO, R. & LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Design and kinetic characterization of a whole cell penicillin acylase biocatalyst using *E. coli*. *Proc. Biochem.* (1994), **29**:213-218
- SCHIWEK, H., STEINLE, G. & HABERL, L. *German Pat. Appl. Publ. No. 221,7628*. (1974).
- SHARPE, E.S., STODOLA, F.H. & KOEPESELL, H.J. *J. Am. Chem. Soc.* (1954), **76** Abstract 5-D.
- SHARPE, E.S., STODOLA, F.H. & KOEPESELL, H.J. *J. Org. Chem.* (1960), **25**:1062-1063.
- STODOLA, F.H., KOEPESELL, H.J. & SHARPE, E.S. *J. Am. Chem. Soc.* (1952), **74**:3202-3203.
- STODOLA, F.H., KOEPESELL, H.J. & SHARPE, E.S. *J. Am. Chem. Soc.* (1956), **78**:2514-2518.
- SUMNER, J. & HOWELL, S. A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* (1935), **108**:51-54.
- TAKAZOE, I. "Palatinose, an isomeric alternative to sucrose". in *Progress in Sweeteners*, (Edited by T.H. Grenby). Ed. Elsevier Applied Science, London, U.K., 1989, p.p. 143-167.
- TSUCHIYA, H.M., KOEPESELL, H.J., CORMAN, J., BRYANT, G., BOGARD, V.H., FEGER, V.H. & JACKSON, R.W. The effect of certain culture factors on production of dextransucrase by *L. mesenteroides*. *J. Bacteriol.* (1952), **64**:521-526.
- URAKAMI, T. & KOMAGATA, K. Electrophoretic comparison of enzymes in the gram negative methanol-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (1981), **27**:381-403.
- USDA, United States Department of Agriculture. *Sugar and Sweetener Outlook and Situation*. (1981).
- YOURNO, J., KOHO, T. & RUTH, J. *J. Nature* (London), (1970), **228**:820-824.