

24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

“CARACTERIZACION DE GLICOSILTRANSFERASAS
DE 15 DIFERENTES CEPAS DE
Leuconostoc mesenteroides
AISLADAS DE POZOL”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

VANESA OLIVARES ILLANA



México, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

257553



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

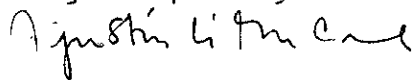
Presidente: Prof. Sveshtarova Pekarkova Biserka
Vocal: Prof. López Munguía Canales Agustín
Secretario: Prof. Aguilar Caballero Raúl
1er Suplente: Prof. Baez Fernandez Marcos Francisco
2o Suplente: Prof. Serrano López Beatriz de Guadalupe.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología UNAM. Cuernavaca Morelos.

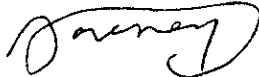
Asesor

Dr. Agustín López Munguía Canales



Sustentante

Vanesa Olivares Illana



Dedicatoria

Por el apoyo, el amor y sobre
todo por la confianza, Gracias!

Ah!, y por la paciencia....

A quien más? por supuesto a
mis papas.

Agradecimientos

A la UNAM, no solo por ser parte de mi formación académica sino por todas las cosas maravillosas que viví y sigo viviendo en esta época de mi vida

Al Dr. Agustín López Munguía Canales, gracias por darme la oportunidad de ser parte de este grupo, por los consejos, por el apoyo y muy, muy especialmente gracias por la amistad.

Por todo lo compartido, todos esos momentos, los desvelos, los nervios, las alegrías, las fiestas, los viajes, las emociones de 5 años juntas: Moncha, Linch, Adrya, Anita, Karla, Sara, Vale.

Si por alguien estoy en esto es por tí Nan.

A July, por la amistad.

A mis hermanitos Mariana y Mario y a Fredy que es casi como mi hermano.

Aquí no podrían faltar Laura, Nayeli, Barbus, Daniel, Gus y Marianita por toda la ayuda que me dieron en esto de la tesis, pero sobre todo por ser mis amigos.

Al Técnico Laboratorista Fernando González Muñoz, por su ayuda y asesoramiento en el análisis por HPLC.

A mis compañeros del labo Mónica, Rose, Male, Fer, Lolita, Nadia, Marisol, Lariza, Gabriel, y otra vez Gus y Marianita.

INDICE

Resumen	
i Introducción	1
ii Objetivo	4
iii Generalidades	5
iii.1 Pozol	5
iii.2 Microbiología del pozol	6
iii.3 Dextranas y dextransacararas	9
iii.4 Mecanismo de reacción	11
iii.5 Reacciones de aceptor	13
iii.6 Levanas y levansacararas	15
iii.7 Mecanismo de acción	18
iii.8 Aplicaciones	19
iv Materiales y Métodos	21
iv.1 Preservación de cepas	21
iv.2 Producción de enzimas	21
iv.2.1 Microorganismos	21
iv.2.2 Identificación de <i>L. mesenteroides</i>	22
iv.2.3 Medio de cultivo	23
iv.2.4 producción de la enzima	24
iv.2.4.1 Controles durante la fermentación	24
iv.3 Medición de la actividad enzimática	25
iv.4 Recuperación de las dextransacararas	25
iv.4.1 Extracción líquido-líquido	26
iv.5 Síntesis enzimática del polímero	26
iv.6 Reacciones de aceptor	27
iv.7 Cromatografía líquida de alta presión HPLC	27
iv.8 Caracterización de la levansacarasa de la cepa de <i>L. mesenteroides</i> CW28	28
iv.8.1 Propiedades fisicoquímicas y cinéticas de la levansacarasa	28
iv.8.2 Caracterización del polímero producido por la fructosiltransferasa de la cepa de <i>L. mesenteroides</i> CW28	29
iv.8.3 Reacciones de aceptor de las enzimas de la cepa de <i>L. mesenteroides</i> CW28	30

iv.8.4 Determinación del peso molecular de las enzimas de la cepa de <i>L. mesenteroides</i> CW28	30
iv.8.4.1 Electroforesis	31
v Resultados y discusión	32
v.1 Producción de las dextranasacarosas de las cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> aisladas del pozol.	32
v.2 Recuperación de las dextranasacarosas extracelulares por extracción líquido-líquido.	33
v.3 Síntesis enzimática de los polímeros	34
v.4 Productos de las reacciones de aceptor de las dextranasacarosas.	35
v.5 Producción de la fructosiltransferasa de la cepa CW28 de <i>L. mesenteroides</i> aisladas del pozol.	36
v.5.1 Verificación de que la enzima es inducida por sacarosa	39
v.5.2 Determinación de pH y temperatura óptimos	40
v.5.3 Estabilidad térmica de la levansacarasa	42
v.5.4 Determinación de las constantes cinéticas Km y V max	43
v.5.5 Síntesis de polímero	45
v.5.6 Reacciones con dextranasa, invertasa e inulinasa	47
v.5.7 Determinación del peso molecular de la levansacarasa de <i>L. mesenteroides</i> CW28	49
v.5.8 Reacciones de aceptor de la levansacarasa de la cepa de <i>L. mesenteroides</i> CW28	50
v.5.9 Electroforesis	51
vi Conclusiones	52
vii Anexo 1	54
viii Anexo 2	60
viii Bibliografía	62

Resumen

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan el traslado de un residuo de azúcar, a diversos aceptores. Las glucosiltransferasas pertenecen a este grupo de enzimas y dentro de ellas se encuentra la dextransacarasa, producida principalmente por bacterias como *Leuconostoc mesenteroides* y las fructosiltransferasas, como la levansacarasa. Ambas son capaces de producir un polímero utilizando a la sacarosa como donador del residuo de azúcar, ya sea glucosa, para el primer caso, o fructosa para el caso de las fructosiltransferasas.

Durante el presente trabajo, se estudiaron las enzimas glicosiltransferasas de 15 diferentes cepas aisladas del pozol, bebida fermentada hecha a base de maíz nixtamalizado, ácida, no alcohólica originaria del sureste del país, fuente natural de *Leuconostoc mesenteroides*. La caracterización se realizó con el fin de encontrar nuevas fuentes para la producción enzimática de polisacáridos y oligosacáridos, debido al auge que estos últimos están cobrando dado su gran potencial para aplicaciones industriales.

En este trabajo se realizó la caracterización de las enzimas glicosiltransferasas de estas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. La mayor parte de ellas son productoras de la enzima dextransacarasa, algunas cepas la producen asociada a células, otras en forma extracelular y otras más la producen tanto en el sobrenadante de la fermentación como asociada a células. Sin embargo una de estas cepas, resultó particularmente interesante, ya que es productora de una enzima fructosiltransferasa, levansacarasa, asociada a células y una dextransacarasa intracelular, por lo cual se realizó una caracterización más detallada.

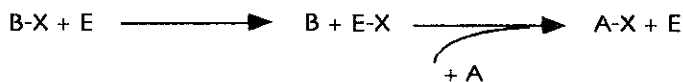
En este estudio se probó la capacidad de las dextransacarasas, incluida la encontrada intracelularmente en la cepa CW28, para transferir glucosa a la maltosa. Así como la capacidad de la levansacarasa de la cepa productora de esta enzima, para transferir fructosa a diferentes aceptores como la galactosa, fructosa, lactosa, maltosa, sorbitol y glicerol; además de la caracterización por Resonancia Magnética Nuclear del polímero producido por la levansacarasa.

i Introducción

Las enzimas son proteínas que intervienen en los procesos biológicos catalizando las reacciones del metabolismo celular. La experiencia en la utilización de microorganismos como fuente de enzimas para uso industrial, se inició en los 40's. En la actualidad esta es una industria bien establecida con un gran potencial económico, y un mercado de cerca de 1000 millones de dólares en ventas mundiales de enzimas al año.

Para su aplicación, las enzimas pueden emplearse en forma de extractos, o bien, dentro de los mismos microorganismos productores para el caso de enzimas intracelulares. En ambos casos las bioconversiones tienen la ventaja sobre las reacciones químicas convencionales de presentar mayor especificidad en las interacciones de las reacciones necesarias para rendir el producto deseado, con un máximo de control sobre la calidad y los rendimientos, y con un mínimo de productos indeseables.

La clasificación de las enzimas se basa principalmente en la reacción química que catalizan. De éstas, un grupo de particular interés es el de las transferasas. Estas enzimas catalizan la reacción de transferencia de ciertos grupos a moléculasceptoras de acuerdo al siguiente esquema:



Donde B-X, es el sustrato donador, X, es el grupo transferido, E, es la enzima transferasa y A, es la molécula aceptora. En el caso de las trasglicosidasas, X será un glucósido y en general A es un compuesto distinto del agua, lo que diferencia a las tranferasas de las hidrolasas.

La energía necesaria para la reacción de síntesis es proporcionada por el enlace osídico original vía la formación de un intermediario con un enlace covalente glicosil-enzima.

Las enzimas que catalizan tales intercambios de enlaces glicosídicos, ocupan un lugar clave en las actividades biológicas de las células. Esto es porque producen polisacáridos y oligosacáridos con funciones importantes para la célula, algunos de los cuales tiene actualmente gran importancia a nivel industrial.

Como se mencionó, dentro de este grupo de enzimas se encuentran las glucosiltransferasas, dentro de las cuales se incluye a la dextransacarasa, que recibe el nombre sistemático de sacarosa: 1,6-alfa-D-glucan-6-alfa-D-glucosiltransferasa (E.C.2.4.1.5) y ha sido la más estudiada de acuerdo con el número de reportes en la literatura. Esta enzima transfiere residuos de glucosa a una cadena constituida por este azúcar, para formar un polímero de glucosa con enlaces alfa(1-6) y ramificaciones en alfa (1-4) y alfa (1-3) llamado dextrana. De manera análoga las fructosiltransferasas, transfieren residuos de fructosa, y en particular la levansacarasa, cuyo nombre sistemático es (E.C.2.4.1.10, β (1-6) D- fructan: D- glucosa 1-transferasa), transfiere residuos de fructosa para la formación de un polímero de fructosa llamado levana, con enlaces β (2-6) y diferentes proporciones de ramificaciones en β (2-1). Esta estructura es similar a la de la inulina, que tiene en su cadena principal enlaces β (2-1) y ramificaciones en β (2-6).

Tanto para la dextransacarasa como para la levansacarasa el sustrato donador es la sacarosa y el aceptor es la cadena de polisacárido que se va formando, ya sea dextrana o levana. De igual forma, bajo ciertas condiciones de reacción pueden transferir residuos glicosílo a una gran variedad de aceptores, dentro de los que destacan alcoholes primarios, azúcares simples o cadenas glicosídicas, dando origen a gran variedad de oligosacáridos y polisacáridos algunos de ellos con interés comercial.

Los polisacáridos tienen entre otras funciones biológicas el servir como reserva de energía y como materiales estructurales en pared celular y cápsulas extracelulares. Los exopolisacáridos desempeñan distintas funciones para los microorganismos productores de estos; entre las que destacan: Protección en contra de la desecación; reservas de energía; interacciones con células de plantas o animales en relaciones específicas.

La industria biotecnológica ha encontrado en los polisacáridos materias primas para una gran diversidad de aplicaciones. Destaca la existencia actualmente de varios biopolímeros microbianos comerciales como la dextrana, la xantana y la galana. Por otro lado, la dextrana es el polisacárido más estudiado y para su producción a nivel industrial ha sido utilizada la bacteria láctica *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

En particular, en el Instituto de Biotecnología dentro del grupo de Tecnología Enzimática se han caracterizado diversas glicosiltransferasas, como las glucosiltransferasas de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299, NRRL 1355, NRRL 512, NRRL 1386, entre otras; y algunas fructosiltransferasas como la de *Bacillus subtilis* y la de *Bacillus circulans*.

Por otro lado, dentro de la Facultad de Química el grupo de la Dra. Carmen Wachter ha venido trabajando en fermentaciones tradicionales, en particular en el pozol, bebida fermentada no alcohólica, ácida, que se elabora a partir de maíz nixtamalizado y es originaria del sureste de México. Dado que el pozol es una fuente natural de *Leuconostoc mesenteroides*, se pensó en el aislamiento de estas cepas para la producción y caracterización de glucosiltransferasas provenientes de nuevas fuentes que pudieran mostrar productos de interés industrial; por lo que se planteó el presente proyecto, con los siguientes objetivos.

ii Objetivos

Objetivo general

* Caracterizar las enzimas glucosiltransferasas producidas por diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del pozol por el grupo de la Dra. Carmen Wachter.

Objetivos específicos

- * Caracterizarlas en función de su capacidad para producir la enzima y su ubicación (extracelular o asociada a células)
- * Obtención de dextrana y oligosacáridos por síntesis enzimática para su posterior caracterización química.
- * Efectuar un estudio comparativo de las dextransacarasas del pozol con las existentes de otras fuentes.
- * Estudiar aquellas que resulten de interés, con base en los criterios antes expuestos.

iii Generalidades

iii.1 Pozol

La palabra pozol, proviene del nahuatl *pozolli*, que significa espumoso y es una bebida fermentada ácida no alcohólica que se consume en el sureste de México, principalmente en los estados de Chiapas, Tabasco, Campeche y Yucatan; y en menor grado en Veracruz y Oaxaca; su origen es maya y se prepara a partir de maíz nixtamalizado.

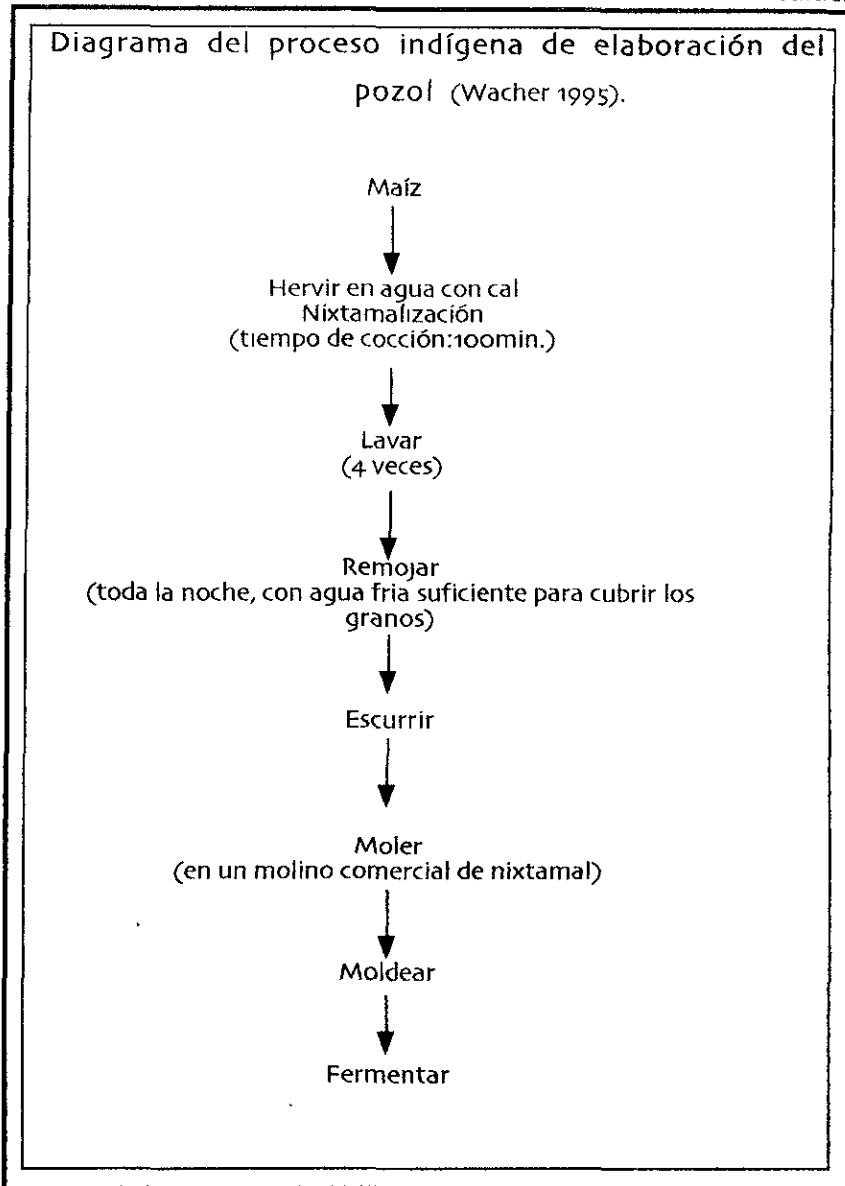
Los chontales, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, tojolabales, chamulas, mames, zoques y zapotecos han utilizado esta bebida desde la época prehispánica con fines ceremoniales, curativos y alimenticios (Viniegra- Gonzalez 1984). En 1955, Cravioto y col. determinaron que el pozol tiene mayor contenido de niacina, riboflavina, lisina y triptofano que el maíz y que la concentración de la proteína del pozol, es también mayor y de mejor calidad que en el maíz; esto probablemente se deba a que entre las bacterias que se han aislado del pozol se encuentran *Agrobacterium azotophilum* y *Enterobacter aerogenes*, las cuales son capaces de fijar el Nitrógeno atmosférico (Wacher 1995).

iii.2 Microbiología del pozol

La fermentación del pozol ocurre en forma natural, es decir, sin adición intencional de inóculo o porción de alimento ya fermentado como ocurre con otros alimentos fermentados tradicionales (Viniegra-Gonzalez 1984). Por esta razón, su microflora es muy compleja y depende del tipo de organismos iniciales y de la incorporación de otros durante el proceso de elaboración.

En el proceso de elaboración del pozol existen diferencias dependiendo del productor, que influyen en las características del producto final. Dentro de estas destacan: el tipo de maíz, que puede ser blanco (*tuxpeño*), amarillo (*olotillo*) o negro (*olotón*) y de su grado de madurez; la adición de otros componentes a la masa, como pueden ser cacao, chile o hielo, aunque esto sólo lo hacen los ladinos ya que los indígenas lo consumen solo; la presencia de una segunda cocción o "reventado" de los granos en el caso del pozol ladino; y el tipo de envoltura, que puede ser en hojas de plátano, que es la forma tradicional o en bolsas de plástico como se ha venido haciendo ultimamente por comodidad.

En la figura 1 se presenta un diagrama de flujo, donde se describen las etapas de elaboración del pozol.



Proceso indígena de elaboración de pozol en San Cristobal de las Casas.
Para el pozol mestizo o ladino se hace una segunda cocción después del lavado, durante 90 min.

A pesar de las diferencias en cuanto a la forma de elaboración del pozol, por los distintos productores, las cuentas microbianas se mantienen constantes. Viniegra, Gómez y Gonzalez (1984), sugieren que la relación C/N (carbohidratos/proteína) y el pH definen el tipo de fermentación y por lo tanto la microbiota del alimento, lo que explica su estabilidad.

En el trabajo de investigación de la Dra. Carmen Wachter, se aislaron e identificaron una gran cantidad de bacterias, hongos y levaduras; en la tabla 1 se muestran las bacterias lácticas encontradas. Entre las primeras se encontraron tanto bacterias lácticas como enterobacterias, del tipo de *E. coli* y otras; de las bacterias lácticas se aislaron mas de 15 cepas diferentes que fueron identificadas como *L. mesenteriodes* las que sirvieron de base para realizar el presente trabajo.

Tabla 1. Microorganismos aislados del pozol (Wacher 1995).

Genero tentativo	Pozol Indígena	Pozol mestizo
1. Lactobacillus	0	1
2. Lactococcus	9	3
3. Leuconostoc	11	15
4. Pediococcus	5	0
No Total	25	19
<hr/> 1. Bacilos homo o heterofermentativos 2. Cocos homofermentativos, dextrana + ó - 3. Cocos heterofermentativos, productores de dextrana 4. Cocos en tetradas, homofermentativos, dextrana -		

iii.3 Dextranas y dextransacararas

Las dextranas son polisacáridos producidos por enzimas llamadas dextransacararas, provenientes de bacterias. En general su estructura esta constituida de unidades de glucosa en su forma piranosa con enlaces alfa (1-6), y ramificaciones en alfa (1-2), (1-3) y (1-4) dependiendo de la cepa productora de la enzima.

Debido a que la estructura no es constante en todas las dextranas, se han clasificado como sigue:

Clase 1. En la cadena principal tienen enlaces alfa 1-6, con ramificaciones en las posiciones 2, 3 y 4. A esta clase pertenecen la mayoría de las dextranas, entre ellas la de la cepa B-512

Clase 2. En la cadena principal tienen enlaces alfa 1-6 y 1-3 en forma alternada, y ramificaciones en posición 3; por lo que se les ha denominado alternanas.

Clase 3. En la cadena principal tienen enlaces alfa 1-3 en forma consecutiva y ramificaciones en alfa 1-6. Dado que estas son producidas por microorganismos como *S. mutans*, se conocen como mutanas.

Los microorganismos capaces de producir a la enzima dextransacarasa, son principalmente *Leuconostoc* de la especie *mesenteroides* y *dextranicum*; y una gran variedad de especies de *Streptococcus*.

La dextranasa cataliza la reacción de transferencia de unidades de glucosa a partir de sacarosa (figura 2), formando así el polisacárido; es importante mencionar que la enzima no necesita de cofactores para llevar a cabo la reacción, la cual es irreversible. La energía requerida para la condensación de dos unidades glucosil es obtenida por la ruptura del enlace glucosídico de la sacarosa.

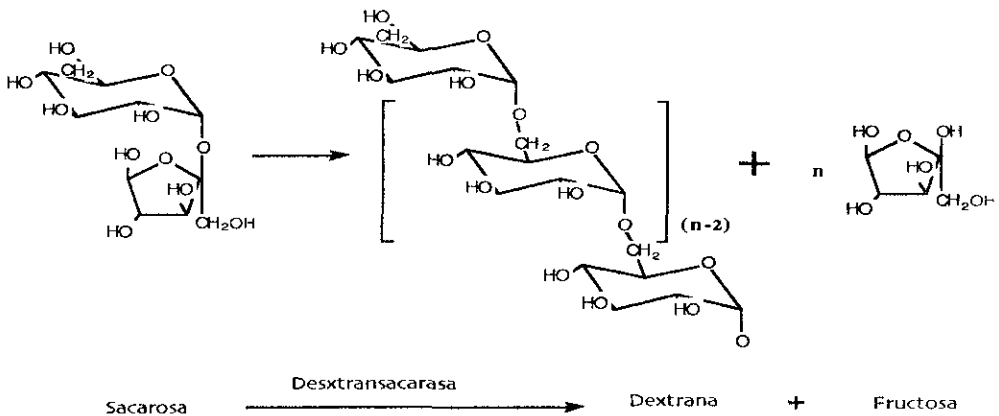


Figura 2. Reacción de síntesis de dextrana catalizada por la dextransacarasa

iii.4 Mecanismo de reacción

El mecanismo de acción de las dextran-sacarasas es muy complejo y aún no está claramente definido, aunque se han explicado extensamente toda una serie de fenómenos que se llevan a cabo durante la reacción. El grupo de Robyt, en una serie de trabajos iniciados en 1994 propuso un mecanismo que involucra a dos grupos nucleófilos en el sitio activo de la enzima, los que atacan a dos moléculas de sacarosa, y así forman dos intermediarios covalentes glucosilo. El grupo hidroxilo C₆ de uno de esos intermediarios glucosilo ataca al C₁ del otro intermediario glucosilo para dar lugar a la adición de la glucosa al extremo reductor de la otra glucosa y así formar un enlace glucosídico alfa (1-6) en una unidad isomaltosil. Con lo anterior tendremos un nuevo grupo nucleófilo libre, que ataca a otra molécula de sacarosa y da origen a un nuevo intermediario glucosilo-enzima. El hidroxilo C₆ de esta nueva molécula de glucosa ataca entonces al C₁ de la unidad isomaltosil recién formada, generando un enlace alfa (1-6) y la formación de una unidad isomaltotriosil.

El proceso continúa entre los dos sitios dando lugar a la síntesis de la cadena de dextrana mediante la inserción de glucosa en el extremo reductor de la cadena. Esto continúa hasta que la concentración de fructosa libre en el medio alcanza niveles que hacen posible la transferencia de la cadena de dextrana o de la unidad glucosilo del sitio activo de la dextran-sacarasa a la fructosa, deteniendo así el crecimiento de la cadena, o bien, produciendo leucrosa. Este mecanismo se ilustra en la figura 3.

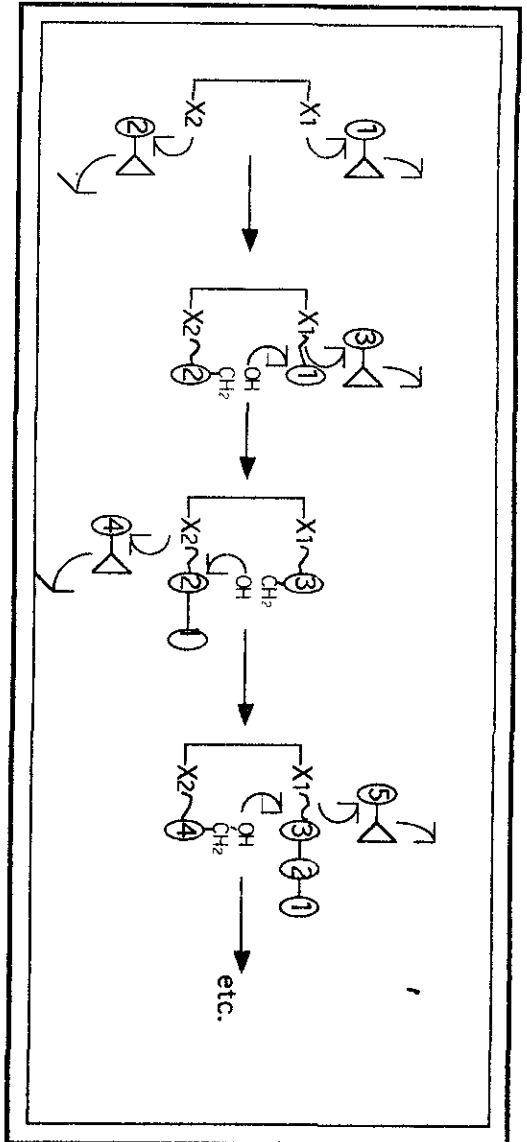


Figura 3. Mecanismo propuesto por Robyt (1974) para describir el mecanismo de la reacción de la dextran-sacarasa

X1 y X2: nucleófilos del sitio activo; ○ glucosa; ▽ es fructosa;
 ○-○ sacarosa, y ○-○ dos glucosas unidas por un enlace alfa 1-6

iii.5 Reacciones de aceptor

Algunos azúcares, al ser agregados a la mezcla de reacción, pueden actuar como aceptores dando lugar a oligosacáridos, a expensas de la síntesis de dextrana. Estos productos de las reacciones de la dextransacarasa con aceptores están cobrando actualmente gran importancia debido a las aplicaciones recientes de los oligosacáridos.

Robyt (1992, 1993) también propuso un mecanismo para explicar las reacciones de aceptor de la dextransacarasa, en el que se postula la existencia de un sitio de unión independiente para aceptores. Estudios realizados por su grupo de trabajo muestran que cuando uno de los dos sitios de unión para sacarosa es modificado, la síntesis de dextrana para, pero la de síntesis de productos de aceptor puede continuar.

En el mecanismo que este autor propone, el sitio de unión para aceptores se encuentra entre los dos sitios de unión para sacarosa como se ilustra en la figura 4, por lo cual, cuando este sitio es ocupado, se bloquea la inserción de la unidad de glucosa a la dextrana, impidiendo así la síntesis del polímero y desviando la glucosa hacia la síntesis de productos de aceptor.

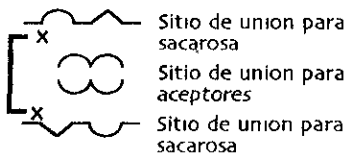


Figura 4. Modelo propuesto por Robyt (1992) del sitio activo de la dextransacarasa de *L. mesenteroides* B512. Donde x representa a los grupos nucleófilos.

El hidroxilo del C₆ del aceptor, realiza un ataque nucleofílico al C₁ de la unidad de glucosa que se encuentra en uno de los sitios nucleófilos de unión, formando así un enlace glucosídico alfa (1-6). Para ciertos aceptores como la maltosa, cuando la concentración del primer producto de la reacción alcanza niveles suficientes, puede actuar a su vez como aceptor, dando lugar a una serie homóloga.

Cuando otra cadena de dextrana actúa como aceptor, donde el hidroxilo del C₃ de la cadena libre ataca al C₁ del complejo glucosil-enzima, se da lugar a un enlace alfa (1-3), formándose así las ramificaciones.

Castillo et al (1992), analizaron y compararon los productos de aceptor de las dextranosaquarinas de 12 diferentes cepas de *L. mesenteroides* de la colección NRRL con la cepa B-512 de la misma colección, y observaron que solo dos de ellas tenían un comportamiento diferente en cuanto a la producción de oligosacáridos, ya que las demás mostraron el mismo perfil en los productos de aceptor que la enzima de la cepa B-512.

En la figura 5 se muestran los productos de aceptor de las reacciones con las enzimas de las dos cepas que mostraron un comportamiento distinto al de la cepa B-512, estas enzimas, además de presentar el mismo perfil de oligosacáridos producidos por la B-512 en las reacciones con maltosa, sintetizan otros que al no ser digeridos en el tracto intestinal de los mamíferos llegan hasta el colon donde son fermentados por la flora benéfica desplazando así a los microorganismos patógenos, de ahí la importancia de estas dos cepas.

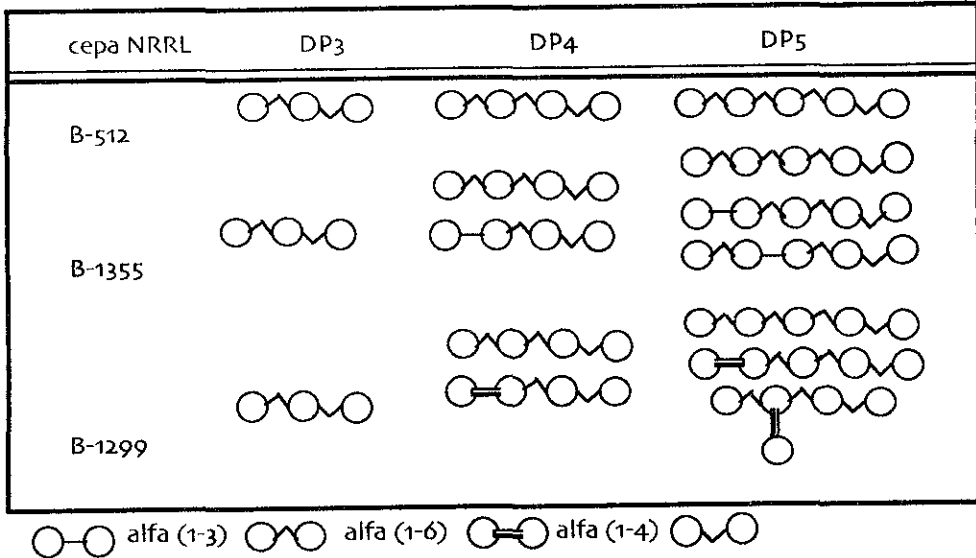


Figura 5. Principales productos de las reacciones de aceptor con maltosa usando dextranasa de diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

Para la producción de dextranas de peso molecular controlado, se utiliza este mecanismo de síntesis en presencia de aceptores (Paul et al 1986 y Oriol et al 1987).

iii.6 Levanas y levansacarosas

Las levanas, al igual que las dextranas, son polisacáridos sintetizados a partir de la sacarosa. Existen varios microorganismos capaces de producir al polímero, fundamentalmente bacterias como: *Acetobacter levanicum*, *Aerobacter levanicum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Corynebacterium leviformes*, *Phytobacterium vitrosus*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia kiliensis*, *Streptococcus sp.*, y algunos otros, como: *Arthrobacter* y *Azotobacter* (Han and Clarke, 1990; Perlot 1980).

La enzima responsable de la reacción es la (E.C.2.4.1.10, β' (1-6) D-fructan: D-glucosa 1- fructosiltransferasa), conocida con el nombre trivial de levansacarasa. También en este caso la energía requerida para la polimerización es tomada de la ruptura del enlace glucosídico de la sacarosa. La levansacarasa sintetiza el polímero levana cuya estructura se describe en la figura 6, estando constituida de moléculas de fructosa unidas por medio de enlaces β (2-6) en la cadena principal y diferentes porcentajes de ramificaciones en β (2-1) (Perlot y Monsan 1984).

Desde los primeros estudios realizados sobre estas enzimas, se propuso que el aceptor inicial de la síntesis de levana, es una molécula de sacarosa, ya que se han encontrado trazas de glucosa en las cadenas de polímero.

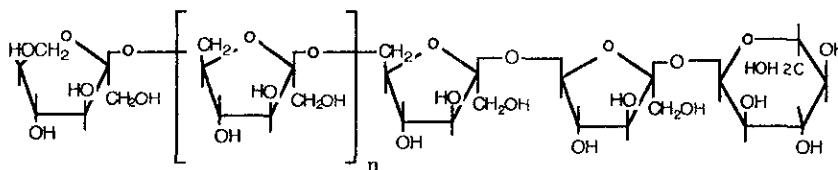
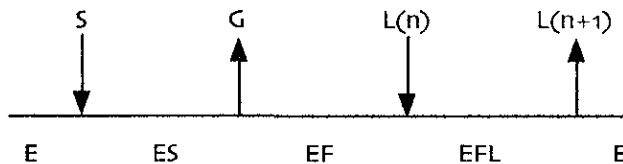


Figura 6. Estructura de la levana según Youn W. Han (1990)

La levansacarasa es una enzima producida por microorganismos de distintos géneros bacterianos como *Bacillus*. Entre estas están *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus natto*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y otras patógenas como *Streptococcus* o *Pseudomonas*, en donde la infección está asociada a la formación de polímero, que tiene la función de ayudar a adherirse a su hospedero. Otros microorganismos que se han reportado como productoras de levansacarasa son: *Erwinia amylovora*, *Zymomonas mobilis*, *Acetobacter suboxidans*, *Gluconobacter oxydans*, *Rahnella aquatilis*.

iii.7 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la levansacarasa es tan complejo como el de la dextransacarasa, ya que por lo general la enzima es capaz de llevar a cabo varias reacciones a la vez. Dendonder (1972), propone un mecanismo de reacción para la formación del polímero de tipo ping-pong, en el que solo toma en cuenta la reacción de transferencia al polímero. Para ello añade levana al medio de reacción logrando así un aumento en la proporción de transferencia y disminuyendo la reacción de hidrólisis. En este mecanismo se da lugar a la formación de un intermediario enzima-sustrato (sacarosa); posteriormente se libera glucosa con la formación de un complejo fructosil-enzima. Finalmente este último, en presencia de levana como aceptor, incrementará el tamaño de la cadena. el mecanismo ping-pong se describe a continuación:



E: Levansacarasa
 S: Sacarosa
 G: Glucosa
 F: Fructosa
 L(n): Levana con n residuos de fructosa

Por lo general, la levansacarasa muestra poca especificidad en cuanto a aceptores, ya que es capaz de transferir la molécula de fructosa a un gran variedad de compuestos, principalmente carbohidratos, aunque también es capaz de transferir fructosa al agua y a alcoholes. Esta situación trae como consecuencia la generación de una gran cantidad de productos de reacción con diferentes aceptores, a los que se da el nombre genérico de fructooligosacáridos.

Actualmente, algunos de estos productos han cobrado gran importancia debido a su carácter de preprobióticos; se trata de compuestos que no son digeridos por las enzimas del tracto digestivo, pero son fermentados por bacterias benéficas del intestino grueso, que actúan como probióticos, y así se previene la proliferación de bacterias putrefactas.

En la tabla 2 se muestran algunos productos de aceptor de las levansacarinas y otras fructosiltransferasas de diversos microorganismos, así como su aplicación.

iii.8 Aplicaciones

Los polisacáridos, tienen múltiples usos en la industria en general. En alimentos por ejemplo, las dextranas se han utilizado como agentes viscosificantes, texturizantes o gelificantes. Además, se ha comprobado que inhiben la cristalización de azúcares por lo que son agregados en jarabes. En la industria farmacéutica las dextranas son utilizadas como tamiz molecular para el aislamiento y purificación de productos biológicos (Sephadex), así como sustancia de encapsulamiento y vector de medicamentos; para la estabilización de agregados de suelo; recuperación secundaria del petróleo y en diferentes procesos metalúrgicos. Otros usos importantes de las dextranas de peso molecular controlado (75,000 daltons), es como sustituto de plasma sanguíneo y como complejo Fe-dextrana en el tratamiento de anemia.

Las levanas a pesar de tener potencialmente los mismo usos que las dextranas, no han tenido un desarrollo industrial importante. Sus aplicaciones más relevantes son: las de peso molecular de 65,000 daltons se usan también como sustituto de plasma sanguíneo; Franz y col. (1988), reportan el uso de levanas como agentes inmunogénicos, basándose en el efecto de algunos polisacáridos para modificar la respuesta inmune de un individuo. De este modo, el hospedero de tumores puede desarrollar la capacidad de destruir las células tumorales por medio de su propio sistema inmune.

Tabla 2. Productos de aceptor de algunas fructosiltransferasas de distintos microorganismos (Canedo 1997)

Microorganismo (s)	Enzima (s)	Producto (s)	Aplicaciones	Compañía	Patente
<i>Aerobasidium Pullulans</i> <i>Aspergillus niger</i>	fructosiltransferasa	Kestosa (neozúcares)	Alimentación humana y animal	Meiji, Seika Japon	59-95895
<i>B. subtilis</i>	levansacarasa				
<i>Aspergillus niger</i> <i>Mucor javanicum</i>	alfa-glicosidasa	theanderosa	farmacéutica (anticaries)	Ashi-Chem Japon	JPO5339282
<i>B. sp</i> <i>B. liqueniformis</i>	levansacarasa ácida- termoestable	levana	farmacéutica y alimentaria	Solvay-Enzymes Francia	FR2691161
<i>Rahnella aquatilis</i> JCM-11683	β -D-fructofuranosidasa levansacarasa	galactooligo- sacárido xylosaacarosa lactosaacarosa xylosilfructósido	edulcorante prebiótico	Nissin-Sugar-Mfg Japon	JO4103593 JPO5276970
<i>B. megaterium</i>	β -D-fructofuranosidasa levansacarasa	lactosilfructosido	farmacéutica alimentaria cosméticos	Nissin-Sugar-Mfg Japon	JP5130885
<i>B. sp</i> <i>Aerobacter sp K-1</i> <i>Sporobolomices</i> <i>Rahnella</i>	levansacarasa β -fructofuranosidasa galactosiltransferasa	lactosacarosa	farmacéutica alimentaria cosméticos	Hayashibara- Biochemi, Biochem Etsuiko- Sugar-refining Europa	JO3290197 EP-447125
<i>B. subtilis</i>	levansacarasa	celbiofructosa gentobiofructosa	alimentaria	Europa	0337889

Una aplicación mas es en fotografía, donde se emplean en la fabricación de emulsiones foto-sensibles (Chambers y Overman, 1964).

Los oligosacáridos, producidos por las enzimas levansacarasa y dextransacarasa tienen también aplicaciones industriales, ya que además de haber sido propuestos como agentes de textura o vectores de medicamentos, los fructooligosacáridos conteniendo enlaces β (2-1), y glucooligosacáridos con enlaces alfa (1-6) y alfa (1-2), tiene propiedades de prebióticos en la alimentación animal.

Los oligosacáridos que no son digeridos por los jugos gástricos de los seres humanos, llegan hasta el colon y son ahí consumidos por la flora intestinal benéfica como las bifidobacterias (Tomomatsu 1994). En general, los efectos benéficos de los probióticos se han observado en el tracto gastrointestinal, pero también han sido reportados como benéficos para el tracto urogenital, por los siguientes efectos:

- o Colonización del tracto gastrointestinal y urogenital, con bifidobacterias de potenciales efectos antagónicos sobre la flora patógena y putrefactiva .
- o Actividad metabólica benéfica, ejemplo: producción de vitaminas como la B₁, B₂, B₆, B₁₂, ácido nicotínico y ácido fólico.
- o Efectos terapéuticos, ejemplo: simulación de la respuesta inmune.

Al fermentar productos lácteos, también promueven la tolerancia a la lactosa y absorción de calcio (Tomomatsu 1994.)

iv Materiales y Métodos

iv.1 Preservación de cepas

Las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* fueron aisladas del pozol, bebida fermentada originaria del Sureste de México, por el grupo de la Dra. Carmen Wachter Rodarte y proporcionadas en tubos con agar inclinado. Se reactivaron en 50 ml. del medio de cultivo reportado por López y Monsan, 1980 (tabla3), incubándose a 30°C durante 12 horas, y se conservaron en una solución de glicerol a una concentración de 15% (v/v) a -4°C. Estas soluciones se utilizaron como inóculos para las fermentaciones en matraz, que se realizaron posteriormente.

iv.2 Producción de enzimas

iv.2.1 Microorganismos

Las 15 diferentes cepas aisladas del pozol por la Dra. Carmen Wachter fueron identificadas como *Leuconostoc mesenteroides*.

iv.2.2 Identificación de *L. mesenteroides*

De las cepas aisladas del pozol, en una se detectó la enzima fructosiltransferasa por lo que se decidió corroborar su identificación empleando los medios Api 50 CH. El procedimiento se describe a continuación:

- 1.- Cultivar al microorganismo en 20 ml de un medio adecuado para su crecimiento, y verificar que el cultivo esté puro.
- 2.- Centrifugar para separar las células y resuspenderlas en 2 ml de agua estéril.
- 3.- Transferir unas gotas a 5 ml de agua estéril hasta igualar la turbidez del estándar No 2 de Mc Farland. Contar las gotas añadidas.
- 4.- Agregar el doble de las gotas añadidas anteriormente a la ampolleta con el medio API.
- 5.- Repartir la suspensión bacteriana en los 50 tubos de la galería API 50 CH, los cuales contienen 49 diferentes azúcares.
- 6.- Cubrir los tubos con aceite de parafina, para mantener las condiciones anaerobias. Incubar a 29 °C.

Durante la incubación, el catabolismo de los azúcares conduce a ácidos orgánicos que provocan que el indicador de pH de los tubos en la galería vire, lo que se detecta por el cambio de color. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa, que sirve de base para su identificación.

Para el análisis de los datos obtenidos se utiliza el programa Apilab plus versión 3.2.2.

iv.2.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* fue reportado por López y Monsan (1980), y se muestra en la tabla 3. El pH del medio se ajustó a 5.4 con ácido ortofosfórico antes de esterilizar.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo utilizado

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

iv.2.4 Producción de la enzima

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio estéril a una temperatura de 30°C, 200 rpm de agitación durante de 8 a 10 horas. El medio se inoculó con el 10% de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento; el pH fué de 6.9 - 7 que es el pH óptimo para el crecimiento del microorganismo.

Al final de la fermentación se midió la densidad óptica a 650 nm y se ajustó el pH a 5.4, pH óptimo de actividad enzimática. Durante la fermentación, el pH baja por la acción del ácido láctico pasando por el pH óptimo para la síntesis de la enzima dextransacarasa (6.0-6.9).

La concentración de insolubles se determinó por peso seco tomando una alícuota de 5 ml. Las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min., y lavadas con una solución amortiguadora de acetato de sodio, 50 mM y pH de 5.4.

iv.2.4.1 Controles durante la fermentación

En el caso de la cepa de CW28, durante la fermentación se realizó un seguimiento del crecimiento celular, midiendo la densidad óptica del medio de cultivo a 650 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650. Al final de la fermentación se ajustó el pH con ácido ortofosfórico a 6.5, pH óptimo de la actividad de esta enzima y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4°C en una centrífuga Beckman J2-H5 (E.U). Se lavaron las células con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM y pH de 6.5 y se resuspendieron en el mismo.

iv.3 Medición de la actividad enzimática

Una unidad de actividad dextransacarasa (UI), está definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de fructosa por minuto, mientras que una unidad levansacarasa, se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto.

La actividad dextransacarasa presente se midió tanto en células como en sobrenadante de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, cuantificando los azúcares reductores liberados en función del tiempo durante la reacción enzimática en presencia de 10% (w/v) de sacarosa a 30°C y en amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 5.4. El poder reductor se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Sumner (1935).

La reacción se lleva a cabo poniendo en contacto 10 ml de una solución enzimática, de forma que presente de 0.5 a 2 UI/ml y 2 ml de una solución de sacarosa (600 g/l), para dar lugar a una concentración final de sustrato de 100 g/l.

La solución enzimática puede ser el sobrenadante obtenido durante la fermentación, o células resuspendidas en amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.4 y 50 ppm de azida de sodio, la cual evita la contaminación sin afectar la actividad de la enzima.

iv.4 Recuperación de las dextransacarasas

Una vez separadas las células del sobrenadante al término de la fermentación, éstas fueron lavadas y resuspendidas en amortiguador de acetato de sodio 50 mM y pH 5.4, para su posterior utilización.

iv.4.1 Extracción líquido-líquido

La enzima extracelular que se encontraba en el sobrenadante obtenido durante la fermentación, se purificó mediante una extracción líquido-líquido, utilizando polietilenglicol 1500 (PEG 1500).

Se preparó una solución de PEG 1500 a 500 g/l y se añadió lentamente al sobrenadante con agitación constante, hasta observar la formación de dos fases o la precipitación de la dextrana, la cual esta asociada a la dextransacarasa. El precipitado se recuperó por centrifugación a 10000 rpm por 10 min en una centrífuga Beckman J2-HS (E.U), para posteriormente resuspenderlo en una solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM y pH 5.4; constituyendo así una solución enzimática concentrada y parcialmente purificada.

iv.5 Síntesis enzimática del polímero

La síntesis del polímero se realizó en un volumen de reacción de 100 ml a una concentración de sacarosa de 100 g/l a 30°C en amortiguador de acetato de sodio 50 mM y a pH 5.4, con una concentración enzimática de 1 UI/ml.

La conversión de sacarosa a polímero fue monitoreada mediante el ensayo enzimático de *Bohering* midiendo glucosa y fructosa libres en el medio de reacción.

Al término de la reacción, se realizó una precipitación del polímero con 2 volúmenes de etanol al 99% por 1 volumen de medio de reacción, agitando constantemente. Una vez obtenido el precipitado, la solución se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min en una centrífuga Beckman J2-HS (E.U). Posteriormente el polímero se resuspendió en agua, para ser liofilizado.

iv.6 Reacciones de aceptor

La síntesis de los oligosacáridos se llevó a cabo en un volumen de reacción de 5 ml a una temperatura de 30°C, en amortiguador de acetato de sodio 50 mM a pH de 5.4.

Para la dextranacarasa se utilizó como aceptor maltosa, y una relación sacarosa/maltosa (*s/m*) de 2. La concentración de los dos sustratos fué de 100 y 50 g/l respectivamente; con una actividad enzimática de 0.1 a 1 UI/ml, dependiendo de la actividad enzimática de cada cepa.

La conversión de sacarosa a productos de aceptores fué monitoreada también mediante el ensayo enzimático de Boehringer Mannheim midiendo glucosa y fructosa libres en el medio de reacción.

iv.7 Cromatografía líquida de alta presión HPLC

Los oligosacáridos producidos mediante las reacciones de aceptor fueron analizados por Cromatografía líquida de alta presión, en un cromatógrafo Waters-Millipore con detector de índice de refracción Waters 410. Las muestras fueron previamente filtradas en membranas de nylon de 4 mm con un tamaño de poro de 0.45 μm . Se utilizó una columna $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (3.9x300 mm), 10 μm Waters-Millipore y agua como eluyente a un flujo de 0.7 ml/min. Otros productos de reacciones de aceptor se analizaron en el cromatógrafo Waters-Millipore con detector de índice de refracción Waters 410 y una columna de sílica aminada para análisis de carbohidratos, Novapak 4 μm (4.6-250mm) Waters-Millipore.

iv.8 Caracterización de la levansacarasa de la cepa de *L. mesenteroides* CW 28.

iv.8.1 Propiedades fisicoquímicas y cinéticas de la levansacarasa

Se realizaron una serie de reacciones enzimáticas a diferentes valores de pH y temperatura de 30°C, utilizando amortiguador de acetato de sodio 50 mM y amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, con el fin de obtener el pH óptimo para la actividad de esta enzima.

También se realizaron ensayos a diferentes temperaturas utilizando amortiguador de fosfatos 50 mM y pH 6.5.

En ambos casos se utilizó un volumen de reacción de 12 ml, una concentración de sacarosa de 100 g/l y una actividad enzimática de 1 U/ml. Los ensayos se hicieron por duplicado y se monitorearon siguiendo azúcares reductores liberados durante el curso de la reacción (Sumner 1935).

Posteriormente, la enzima se sometió a un almacenamiento a diferentes temperaturas por un tiempo de 150 minutos. Cada 30 minutos se le midió actividad a 30°C, pH 6.5 y 10% de sacarosa, para comprobar la estabilidad de la enzima a altas temperaturas.

Para la determinación de las constantes cinéticas se realizaron una serie de reacciones enzimáticas a diferentes concentraciones de sustrato, midiendo las velocidades iniciales e interpretando los resultados mediante los métodos clásicos de la cinética enzimática.

iv.8.2 Caracterización del polímero producido por la fructosiltransferasa de la cepa de *L. mesenteroides* CW 28.

Se sintetizó la levana como ya se describió en la sección iv.5. Se dializó contra agua destilada durante dos días con cambios de agua cada 12 horas, en membranas de poro de 4500.

Posteriormente se liofilizó y se realizó un análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), para determinar la estructura del polisacárido.

Para la caracterización de la enzima fructosiltransferasa se realizaron reacciones de hidrólisis enzimática del polímero .

Se aplicaron 100 μ l de una solución enzimática comercial de dextranasa (Amano, Chem. Co., distribuida por Enzimas y Productos Químicos de México SA de CV), de actividad no reportada, a 10 ml de una solución al 1% de polímero. La reacción se llevó a cabo a 50°C durante 1 hora; al mismo tiempo se agregó la solución enzimática a una solución de dextrana comercial en las mismas condiciones.

La reacción con invertasa se realizó a un pH de 4.6 y una temperatura de 40 °C. Además de emplear como sustrato una solución del polímero, una de dextrana, así como una solución al 1% de levana producida con de la enzima levansacarasa de *Bacillus circulans* en el laboratorio de Bioingeniería del IBT, UNAM.

Para la reacción con inulinasa se utilizó una solución enzimática de actividad desconocida proporcionada por el M. en C. Mariano García Garibay de la UAM Iztapalapa. Se añadieron 50 μ l de dicha solución a una solución de 5 ml al 1% del polímero y a otra con inulina; se incubaron ambas a 40°C, pH de 5.4 por 1 hora.

Posteriormente se inactivaron las enzimas por calentamiento a ebullición durante 10 min y se midieron azúcares reductores a muestras tomadas al inicio y al final de las reacción.

iv.8.3 Reacciones de aceptor de la levansacarasa.

Se realizaron reacciones de aceptor con la enzima fructosiltransferasa, utilizando para ello diferentes compuestos como aceptores, de acuerdo con lo reportado para otras levansacarinas, como la de *Bacillus subtilis* y *Bacillus circulans* (Perlot 1980, Monsan 1995).

Los compuestos utilizados en estas reacciones fueron tanto azúcares (maltosa, lactosa, fructosa y galactosa), como alcoholes (glicerol y sorbitol).

La relación utilizada sacarosa/aceptor en todos los casos fué de 1, utilizando 60g/l de sacarosa y 60g/l de aceptor, 1U/ml de actividad enzimática a pH de 6.5 en buffer de fosfato de potasio 50mM. La reacción se dejó transcurrir durante 5 horas y se inactivó la enzima por calentamiento a ebullición por 10 minutos.

iv.8.4 Determinación del peso molecular de las enzimas de la cepa de *L. mesenteroides* CW28.

Para determinar el peso molecular de la enzima, fue necesario separar a la enzima de las células, para lo cual se llevó a cabo una etapa de sonicación (condiciones).

Tratamiento con Lisozima:

Los restos celulares (después de sonicar), se trataron con lisozima (sigma) a una concentración de 2 mg/ml durante 2 horas a 30°C. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y separó el sobrenadante de los restos celulares, midiendo actividad enzimática en ambos casos, por medio de azúcares reductores liberados.

Posteriormente se realizó una síntesis del polímero siguiendo la reacción por medio del ensayo enzimático de Boehringer Mannheim. El polímero fue analizado por RMN, para conocer su estructura.

iv.8.4.1 Electroforesis

Con el sobrenadante del tratamiento anterior se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, (2.7% de bis-acrilamida), en condiciones desnaturizantes, utilizando dodecilsulfato de sodio y β -mercaptoetanol. Se realizaron igualmente electroforesis en condiciones no desnaturizantes.

Del mismo sobrenadante, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida, pero al 7% (con 1% de bis-acrilamida), para la determinación del peso molecular de la dextranasa intracelular que se encontró en esta misma cepa.

v Resultados y discusión

v.1 Producción de glicosiltransferasas de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del pozol.

Para producir las enzimas glicosiltransferasas de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, se realizaron fermentaciones en matraces de 500 ml, con 200 ml de medio de cultivo reportado por López y Monsan (1980).

Como puede apreciarse en la tabla 4, seis de las trece cepas presentan actividad enzimática extracelular, tres presenta actividad glicosiltransferasa asociada a células y dos más presentan actividad tanto en células como en sobrenadante. Se encontró igualmente que tres de las cepas presentan una actividad demasiado baja para poder ser medida.

Las fermentaciones se dejaron 12 horas y podemos observar en la tabla 4 que la mayoría de las cepas alcanzaron una densidad óptica (D.O) de entre 4 y 7, con excepción de las cepas 1 y 25, que después de 24 horas de fermentación no alcanzaron una D.O. de 0.2, lo que puede explicar la baja actividad, ya que en general la actividad glicosiltransferasa está asociada al crecimiento celular.

En conclusión, las cepas aisladas del pozol, presentan una actividad dextranasa baja, ya que solo cuatro de ellas están por arriba de 1 U/ml en el sobrenadante de la fermentación, estas son las cepas 31, 39, 42 y 34.

Es importante señalar que esta primera caracterización enzimática se realizó con base en la determinación de azúcares reductores liberados en el curso de la reacción de síntesis enzimática de polímero.

Tabla 4. Evaluación preliminar de las diferentes cepas de *L. mesenteroides* aisladas del pozol

Cepa	D.O (650nm) 12 hrs.	Final pH	a Actividad	
			(U/mg) asociada a células	(U/ml) en sobrenadante
28	6.15	4.47	0.565	-----
39	7.16	4.7	0.443	1.35
31	7.37	4.74	0.44	1.45
29	6.68	4.44	0.203	-----
12	4.25	4.53	-----	0.249
34	5.63	4.8	-----	1.5216
11	4.10	4.46	-----	0.286
30	5.63	5.06	0.123	-----
42	6.30	4.41	-----	1.3355
*7	3.89	4.6	-----	0.226
*1	0.054	6.81	-----	-----
*22	5.10	4.36	-----	0.225
*25	0.167	6.69	-----	-----
*44	2.35	5.79	-----	-----
23		no viable		

* Después de 24 horas.
a condiciones de reacción: 10% sacarosa, 30°C y pH 5.4

v.2 Recuperación de las dextranosaasas extracelulares por extracción líquido-líquido.

Para lograr la recuperación de las dextranosaasa del sobrenadante de la fermentación, se realizó una extracción líquido-líquido con polietilenglicol 1500 (PEG 1500); aprovechándose que en el mecanismo de la reacción enzimática para la síntesis de la dextrana, aparentemente se involucra la unión covalente de dicho polímero con la enzima. De esta forma la dextranosaasa siempre tiene adherida una molécula de dextrana, y la enzima se queda en la fase dextrana, mientras que las demás proteínas migran a la fase PEG. Esto da lugar a una purificación muy eficaz, pues el resto de las proteínas permanecen en el sobrenadante, mientras que la dextranosaasa junto con el polímero precipitan.

Tabla 5. Purificación de las dextranosaasas por extracción líquido-líquido

Cepa	actividad en sobrenadante	volumen (ml)	actividad después de la purificación (U/ml)	rendimiento %
CW12	0.326	20	1.167	72
CW11	0.285	15	1.056	75.4
CW 7	0.157	15	0.8814	84.75
CW31	1.08	25	3.26	75.5
CW39	1.187	20	5.804	98.37

Antes de realizar la extracción se agregó un poco de sacarosa, para promover la síntesis de polímero y facilitar así la precipitación. En la tabla 5 se muestran los resultados de la precipitación de las dextran-sacarosas con PEG 1500, y como se aprecia los rendimientos son constantes y están alrededor del 75%, con una pérdida del 25% de la actividad que probablemente permanece en el sobrenadante. La excepción fue la cepa 39, en la que el rendimiento fue mayor, alcanzando un 98.37% con 5.8 U/ml. Es importante hacer notar que esta cepa es la que mayor actividad mostró en el sobrenadante de la fermentación de estas cinco cepas, por lo que la concentración de la enzima y los rendimientos pueden ser proporcionales.

v.3 Síntesis enzimática de los polímeros.

Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo a 30°C con una solución de sacarosa de 100 g/l y pH 5.4 y una actividad de 1 U/ml.

Se produjeron dextranas con dextran-sacarosas extracelulares de las cepas 39, 31, 12, 34, 42, 11, 7, y 22; y con dextran-sacarosas asociadas a células de las cepas 39, 31, 29 y 30; pues son las que mostraron actividad dextran-sacarasa.

Durante el seguimiento de la conversión de sacarosa a polímero por el ensayo enzimático de Boehringer Mannheim, se observó que la cepa CW 28, en la cual la enzima está asociada a células, sí había producción de polímero, pero que éste estaba formado por unidades de fructosa, ya que en el medio de reacción se encontró glucosa libre y no fructosa como en los demás casos.

En las reacciones de síntesis de dextrana con enzimas extracelulares de las cepas 39, 31, 12, 34, 42, 11, 7, y 22; se observó un aumento considerable en la viscosidad del medio de reacción. Por otro lado, en el caso de las reacciones en las que se emplearon células con actividad dextran-sacarasa de las cepas 39, 31, 29 y 30; sí hay producción de polímero pues se observa turbidez en el medio conforme la reacción de síntesis avanza, pero sin aumento en la viscosidad del medio de reacción.

v.4 Productos de las reacciones de aceptor de las dextran-sacarasas.

Las reacciones de aceptor se realizaron con las enzimas extracelulares de las cepas 39, 31, 12, 34, 11, 42, 7 y 22; y con las enzimas asociadas a células de las cepas 28, 39, 31, 29 y 30. A 30°C y pH 5.4 en presencia de maltosa como aceptor, y una relación sacarosa/maltosa de 2.

Se encontró que los productos de las reacciones de aceptor de las enzimas provenientes de los microorganismos aislados del pozol son los mismos que los obtenidos con la enzima B512, la cual es usada a nivel industrial para la síntesis de dextrana. Los cromatogramas de los productos de las reacciones de aceptor de las cepas antes mencionadas se muestran en el anexo 1; las únicas diferencias observadas son en cuanto a la cantidad de oligosacáridos formados. Esto se debe probablemente a la cantidad de enzima utilizada, ya que, no todas las reacciones se hicieron con la misma actividad enzimática, debido a que algunas cepas producen una muy baja actividad enzimática. De acuerdo con Robyt et al (1993), la distribución de la glucosa en dextrana y productos de las reacciones de aceptor depende de la concentración de sacarosa añadida, la proporción existente entre la sacarosa y la maltosa y de la concentración de enzima en la reacción.

Como se puede observar en el anexo 1, la cepa CW 28, no forma productos de aceptor con la maltosa. Esta reacción también fue monitoreada por el ensayo enzimático de Boehringer Mannheim, y se observaron los mismo resultados que para la síntesis de polímero: un aumento considerable en la glucosa libre y turbidez en el medio de reacción. Esto se puede deber a la producción de polímero, lo que podía indicar la naturaleza de esta enzima, es decir, una enzima fructosiltransferasa asociada a células.

Ninguna de las cepas de *L. mesenteroides* aisladas del pozol presentan actividades inusuales, ya que solo las cepas 39, 31, 34 y 42 apenas rebasan 1 U/ml en sobrenadante, mientras que la cepa B-512 se ha reportado con actividades que están entre 1.5 y 2 U/ml. Por otro lado, también el perfil de oligosacáridos obtenidos es el mismo que produce la B-512.

Sin embargo, la cepa 28 mostró una actividad poco común en estos microorganismos. Si bien existen reportes sobre la presencia de actividad levansacarasa en *L. mesenteroides*, esta, además de ser extracelular, siempre esta en una proporción mucho menor comparada a la actividad dextransacarasa del mismo microorganismo. De hecho se considera una actividad contaminante de la dextransacarasa. En el caso de la cepa 28, solo se presenta la actividad levansacarasa que está asociada a células. Aparentemente no hay presencia de dextransacarasa al realizar un ensayo con células completas, por lo que se decidió hacer una caracterización más profunda de esta cepa.

v.5 Producción de la fructosiltransferasa de la cepa CW 28 de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del pozol.

Con los medios Api 50 CH, se realizó la corroboración de que la cepa productora de la enzima fructosiltransferasa es *Leuconostoc mesenteroides*. En la tabla 6 se observan los resultados obtenidos en la galería con los 49 diferentes azúcares. Están señalados los que el microorganismo fué capaz de fermentar, lo que nos da una idea de su perfil bioquímico.

Tabla 6. Perfil bioquímico de la cepa CW 28 de *L. mesenteroides* según las pruebas Api 50 CH para identificación de microorganismos

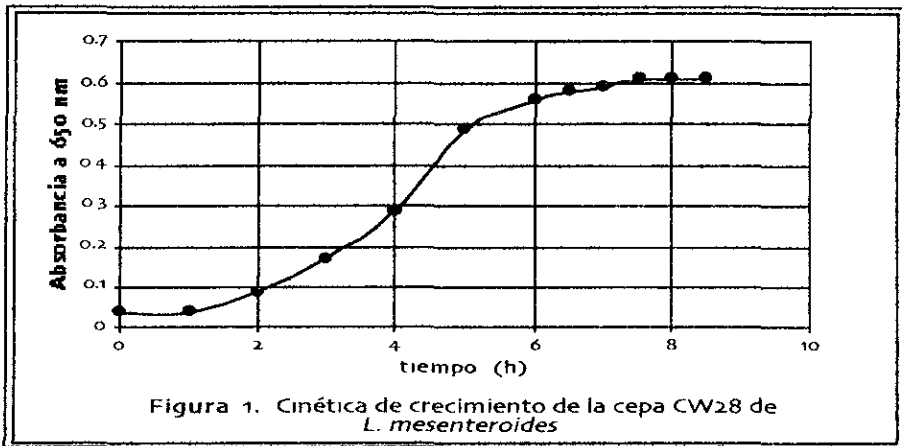
Temperatura 30°C			
	A	B	C
Control			
Glicerol			
Erythritol			
D-Arabinosa			
L-Arabinosa			X
Ribosa			
D-Xilosa	X	X	X
L-Xilosa			
Adonitol			
β Metil-xilosido			
Galactosa			X
D-Glucosa	X	X	X
D-Fructosa	X	X	X
D-Manosa			X
L-Sorbose			
Ramnose			
Dulcitol			
Inositol			
Monitol	X	X	X
Sorbitol			
alfa Metil-D-manosido			
alfa Metil-D-glucosido	X	X	X
N Acetyl glucosamina	X	X	X
Amygdalina	X	X	X
Arbutina	X	X	X
Esculina	X	X	X
Salicina	X	X	X
Cellobiosa	X	X	X
Maltosa	X	X	X
Lactosa			
Melibiosa			
Sacarosa	X	X	X
Trealosa	X	X	X
Inulina		X	X
Melezitosa			
D-Rafinosa		X	X
Almidon			
Glicogeno			
Xilitol			
β Gentiobiosa	X	X	X
D-Turanosa	X	X	X
D-Lixosa			
D-Tagatosa			
D-Fucosa			
L-Fucosa			
D-Arabitol			
L-Arabitol			
Gluconato			
2 ceto-gluconato			
5 ceto-gluconato			

A, 24 horas, B, 48 horas; 1, semana

Este ensayo se realizó por duplicado, tomando lectura a las 24 y 48 horas y a la semana, incubando los medios a 30°C.

Estos datos fueron procesados en el programa Apilab plus versión 3.2.2, en el que se obtuvo un 96% de probabilidades de que el microorganismo fuera *Leuconostoc. mesenteroides* y un 4% que fuese *Leuconostoc. dextranicum*.

Una vez identificada la cepa como *Leuconostoc mesenteroides*, se produjo la enzima como se explica en materiales y métodos, siguiendo la fermentación por D.O. a 650 nm, para así obtener la cinética de crecimiento como se muestra en la figura 7, en donde podemos observar que el microorganismo alcanza la fase estacionaria a la 6 horas de fermentación con un pH 4.47, similar a lo que ocurre con la cepa de *L. mesenteroides* de la cepa B-512F. En este punto la cepa cuenta con una actividad levansacarasa de 0.6 U/mg.

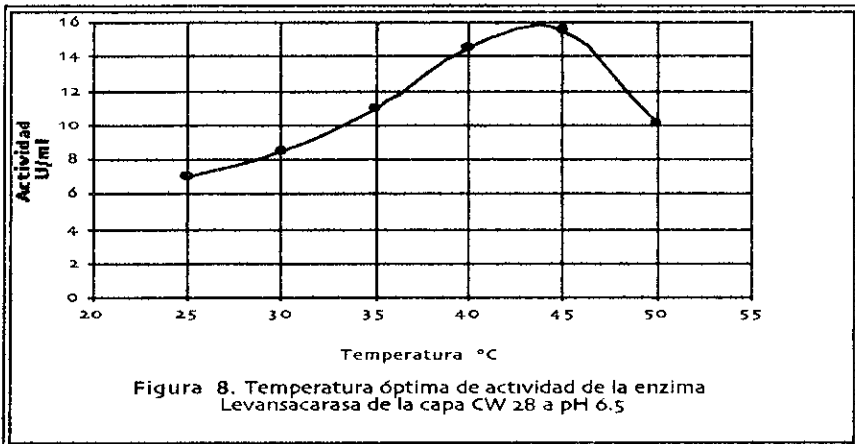


v.5.1 Verificación de la inducción de la enzima en presencia de sacarosa.

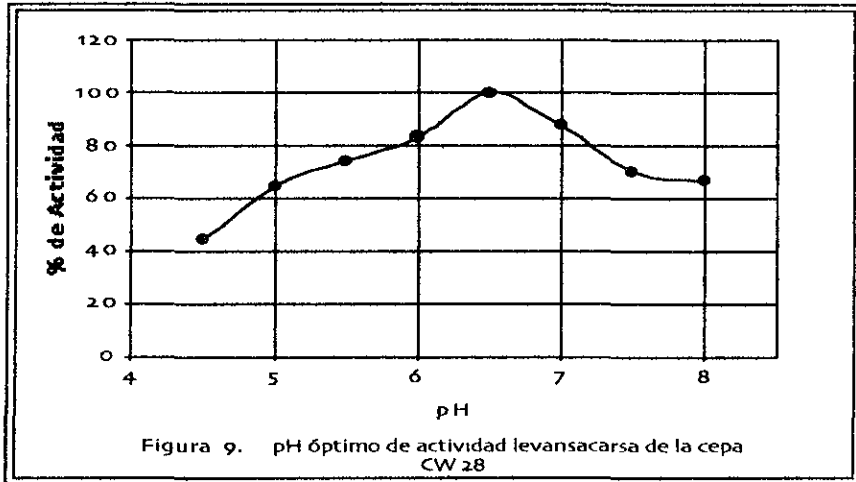
Se realizaron fermentaciones en matraces de 500 ml con 200 ml de medio de cultivo reportado por López y Monsan (1980), pero en lugar de agregar sacarosa al medio, se agregó en igual cantidad glucosa, para analizar si en ausencia del sustrato natural de la enzima, ésta estaba presente en forma constitutiva en el microorganismo. Se realizó un seguimiento de la fermentación por D.O. a 650 nm hasta que el microorganismo alcanzó a su fase estacionaria, que en esta ocasión fué a una D.O. de 5.5, un poco menor que en presencia de sacarosa. Se llevó a cabo un ensayo de actividad sin detectar actividad levansacarasa ni asociada a células, ni en el sobrenadante obtenido durante la fermentación, por lo que se concluyó que la enzima de esta cepa es inducida por sacarosa.

v.5.2 Determinación de la temperatura y pH óptimos.

Al realizarse una serie de reacciones de síntesis enzimática con la levansacarasa de la cepa CW 28 a diferentes valores de temperatura, se encontró que la temperatura óptima de actividad de esta enzima es de 45°C a un pH 6.5 como se muestra la figura 8.

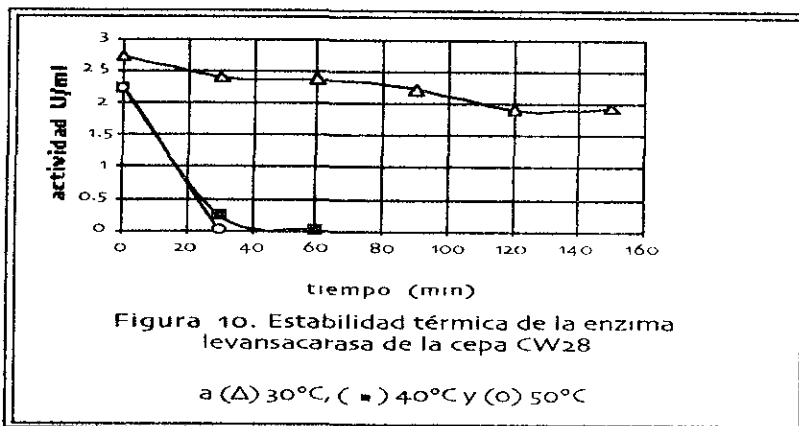


El estudio para determinar el pH óptimo de la actividad levansacarasa se llevo a cabo a una temperatura de 30 °C y se muestra en la figura 9. Se puede observar que la enzima presenta un óptimo en 6,5, aunque al igual que las levansacarasa de *B. subtilis* y *B. circulans*, tiene buena actividad en el rango de pH 6 -7.



v.5.3 Estabilidad térmica de la levansacarasa

La levansacarasa de la cepa CW28 de *Leuconostoc mesenteroides* no es estable a altas temperaturas, ya que a 40°C en un tiempo de de 30 minutos la pérdida de actividades casi total, inactivándose totalmente a los 60 minutos. A 50°C en 30 minutos pierde totalmente la actividad. En contraste, a 30°C en un tiempo de 150 minutos la pérdida de actividad es casi nula, como se aprecia en la figura 10.

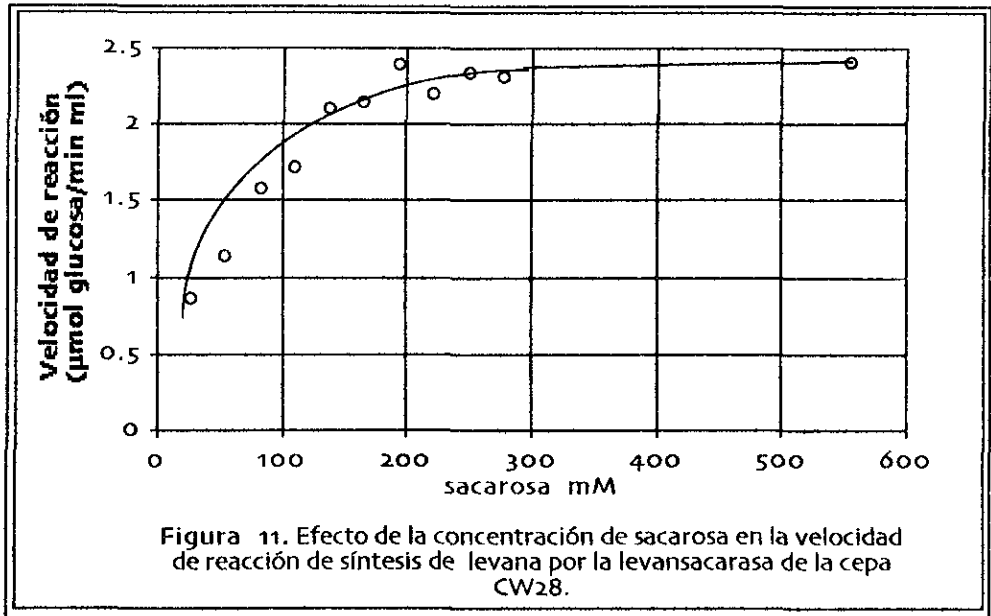


En general, las levansacarasa no son enzimas termoresistentes. De hecho, la levansacrasa de *Bacillus circulans* es estable a 30 °C, sin embargo a 40 °C existe pérdida de la actividad, desapareciendo toda la actividad después de 20 minutos a 60°C (Perez Oseguera 1995).

Se pensó que la enzima de esta cepa, por estar asociada a las células sería más estable. Sin embargo como se muestra en el ensayo realizado a 45°C que corresponde a su temperatura óptima, a esta temperatura perdería rápidamente actividad. Por lo antes señalado se decidió continuar trabajando a 30°C.

v.5.4 Determinación de las constantes cinéticas K_m y V_{max}

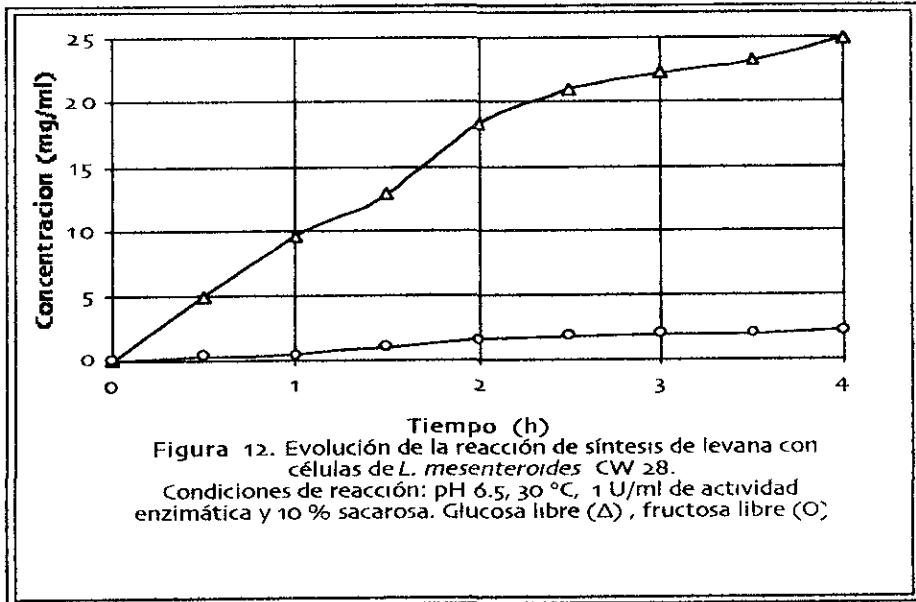
Se realizaron una serie de ensayos para la determinación de las constantes cinéticas de la levansacarasa asociada a células, variando la concentración de sacarosa en el medio de reacción de 0 a 20%. Se encontró que la K_m para esta enzima es de 66.34 mM, la cinética se muestra en la figura 11. Esto contrasta con los valores reportados para la levansacarasa de *Bacillus subtilis* de 20mM (Dedonder 1966), así como con el de la levansacarsa de *Bacillus circulans*, para lo cual se reporta un valor de K_m de 15.82 mM. Es probable que esta diferencia se deba al hecho de que la enzima esta asociada a las células, y se vea afectada por problemas de difusión.



v.5.5 Síntesis del polímero

La síntesis del polímero se efectuó en las mismas condiciones que las síntesis de las dextranas solo que a pH 6.5, pues como ya se demostró, es el óptimo de actividad para esta enzima.

La reacción se siguió através del ensayo enzimático de Boehringer Mannheim para medir fructosa y glucosa libres. Como se puede observar en la figura 3, la concentración de glucosa libre en el medio de reacción es mucho mayor que la fructosa, lo que nos indica que el polímero está siendo sintetizado con la fructosa de la sacarosa y esta liberando glucosa. Además, a diferencia de la mayoría de las enzimas levansacarasas de otros microorganismos, la levansacarasa de *L. mesenteroides* es muy eficaz para la transferencia al polímero, transfiriendo aproximadamente un 95.8 %; y prácticamente no realiza hidrólisis ya que solo 4.2 % del sustrato fué hidrolizado. Otras levansacarasas tienden a realizar un alto porcentaje de hidrólisis, en detrimento de la reacción de transferencia hacia al polímero, llegando a ser hasta de un 23 %. En estos casos para alcanzar 100 % de transferencia es necesario adicionar levana al medio de reacción.



v.5.6 Reacciones con dextranasa, invertasa e inulinasa.

La reacción con dextranasa se realizó para confirmar que la enzima de la cepa 28 no se trataba de una dextransacarasa y que el polímero formado no es, por lo tanto, dextrana. En efecto, el polímero sintetizado extracelularmente no es degradado por la dextranasa comercial de la empresa de Amano.

Al corroborar lo anterior, el polímero fué analizado mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se dializó como se describe en materiales y métodos, y se liofilizó antes de ser analizado. El espectro de RMN se muestra en la figura 13. Los resultados de este estudio muestra que si bien se trata de un polímero de fructosa muy similar a la levana, que parecía tener enlaces β (2-1), por lo que se pensó que el polímero podría ser inulina. Se realizó la hidrólisis con inulinasa, pero como se muestra en la tabla 6, el polímero no es hidrolizado por esta enzima.

Posteriormente se llevó a cabo una hidrólisis con invertasa, pues según Bhatia y Nandra (1978), esta enzima es capaz de hidrolizar los enlaces β (2-1), pero como podemos observar en la tabla 7, el polímero tampoco es hidrolizado por esta enzima.

Al analizar el espectro se llegó a la conclusión de que el pico correspondiente a los enlaces β (2-6), se encontraba un poco corrido, sin embargo si corresponde a los enlaces β (2-6).

Tabla 7. Suceptibilidad de diversos polímeros a la acción de enzimas despolimerizantes.

polímero	dextranasa	invertasa	inulinasa
dextrana	+++	---	nr
levana	---	+	nr
inulina	nr	nr	+++
*polímero CW28	---	---	---

nr: No se realizó. * elaborado con células completas.

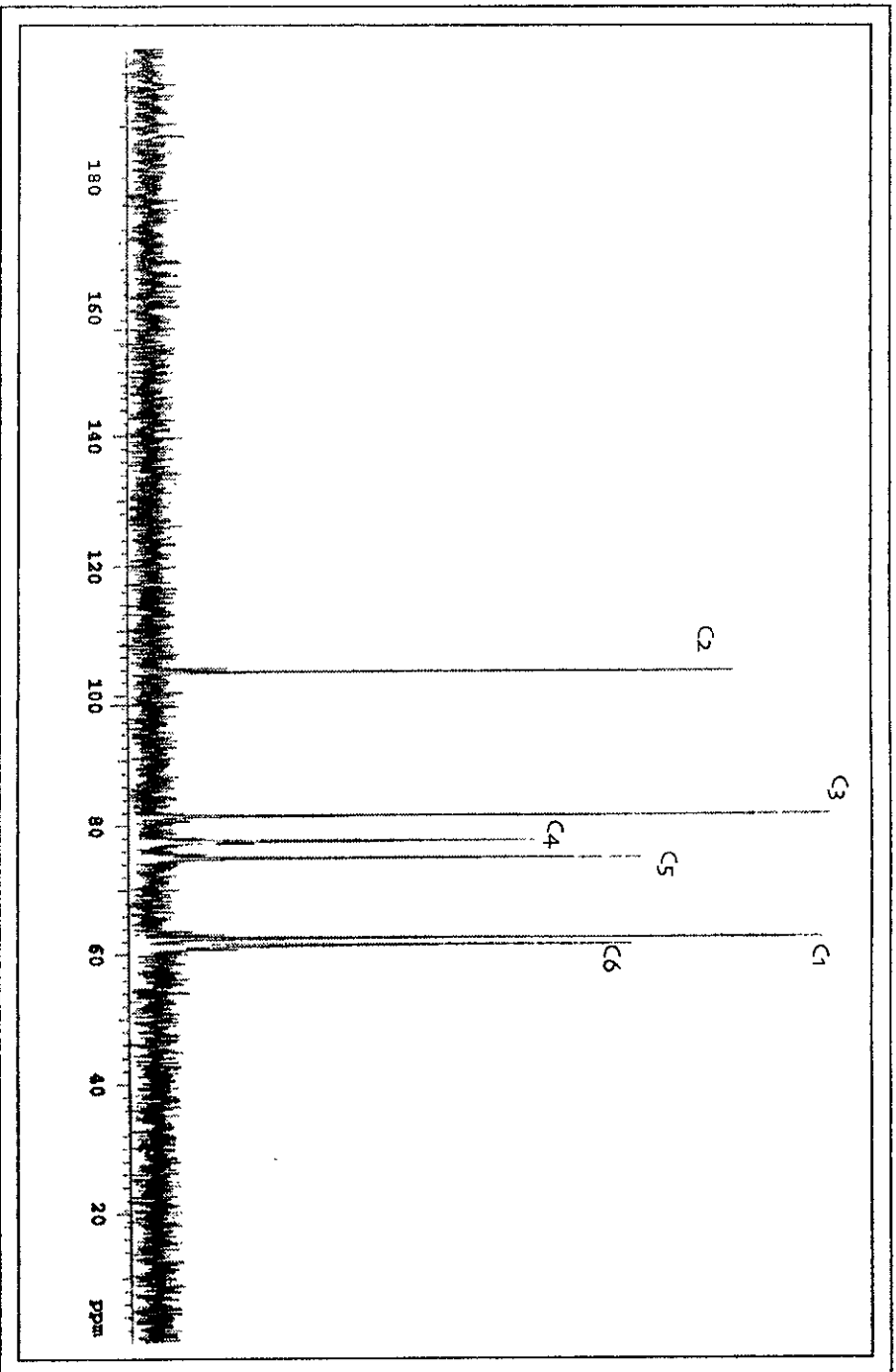


Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear, del polímero sintetizado por la levansacarasa de *L. mesenteroides* de la cepa CW28

v.5.7 Determinación del peso molecular de la levansacarsa de *Leuconostoc mesenteroides* CW 28.

Al sonicar las células como se describe en Materiales y Métodos, y tratarlas con lisozima (tratamiento 1), se centrifugó y midió actividad, tanto en los restos celulares como en el sobrenadante, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 8. En esta tabla también se muestran los resultados obtenidos al tratar las células solo con lisozima, sin sonicar (tratamiento 2).

Como se puede observar la suma de las actividades de restos celulares y sobrenadante una vez rotas las células (Act. total), no es igual a la actividad en las células originales en ninguno de los dos casos. De hecho, en el caso en el que solo se efectúa el tratamiento con lisozima, la actividad al final es mucho mayor que al inicio, lo que sin duda es evidencia de que al romper las células se está liberando actividad que no se detecta al efectuar la medición con las células completas. Al sonicar se pierde una parte de la actividad, pues el tratamiento con lisozima no es tan drástico como el sonicado.

Tabla 8. Tratamientos para liberar a la enzima de las células.

Tratamientos	Cantidad de células (ml)	Act. celular (U/ml)	Act.total (U)	Rendimiento (%)
Células originales	100	7.65	765	
sonicado + lisozima (1)	100	11.7	1170	152
lisozima (2)	100	19.4	1940	235

v.5.8 Reacciones de aceptor de la levansacarasa de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* CW 28.

Se realizaron reacciones de aceptor como se reporta en Materiales y Métodos. A diferencia de otras levansacarasa como la de *Bacillus subtilis* o la de *Aerobacter levanicum*, que en presencia de algunos compuestos como monosacáridos y algunos otros azúcares, además de algunos alcoholes, desvían la fructosa de la síntesis de polímero hacia productos de aceptor en este caso no se detectaron productos de la reacción de aceptor con ninguno de los compuestos empleados (glucosa, galactosa, fructosa, maltosa, lactosa, glicerol y sorbitol). En efecto, toda la fructosa de la sacarosa es empleada para la síntesis del polímero como lo podemos constatar en los cromatogramas que se muestran en el anexo 2, y el aceptor permanece sin modificación desde el inicio de la reacción hasta que esta fue detenida.

posteriormente se realizó una reacción en presencia de maltosa como azúcar aceptor, en las mismas condiciones empleadas para la síntesis de productos de aceptor con las dextranacarasa, pero con el sobrenadante del tratamiento 1; se observó que no había presencia de productos de aceptor, sin embargo había liberación de fructosa en el medio de reacción y una cantidad despreciable de glucosa. Esto solo podía suceder si la actividad liberada al lisar las células era de tipo glucosiltransferasa. Además el tratamiento de sonicado es muy agresivo para la levansacarasa, ya que no hay presencia de esta actividad en la reacción de síntesis del polímero. Sin embargo, en el tratamiento 2 si hay presencia de ambas actividades: la glucosiltransferasa y la fructosiltransferasa.

v.5.9 Electroforesis

Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), con 10% de acrilamida con 2.7% de bis-acrilamida, en el cual se corrió una muestra conteniendo levansacarasa de *Bacillus subtilis* con un peso molecular de aproximadamente 50 000 daltons, además del sobrenadante del tratamiento 2, en este observó una banda a la misma altura de la banda de 50 000 daltons que posiblemente sea la levansacarasa de la cepa CW28 de *L. mesenteroides*.

También se realizó SDS-PAGE, con 7.5% de acrilamida con 1% de bis-acrilamida, en este caso se corrió una muestra de la dextransacarasa B-512, con un peso aproximado de 158 000 daltons, y el mismo sobrenadante del tratamiento 2 inyectado en el gel al 10%, en este caso encontró una banda a esa misma altura que posiblemente sea la dextransacarasa intracelular de la cepa CW28 de *L. mesenteroides*.

vi Conclusiones

1. Las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* estudiadas en este trabajo, son productoras de la enzima dextranasa, con excepción de la cepa 28. Las actividades de estas enzimas no resultaron relevantes, pues apenas cuatro de ellas rebasan 1 U/ml y el perfil de oligosacáridos de estas enzimas en las reacciones de aceptor en presencia de maltosa, es el mismo que el reportado para la dextranasa usada a nivel industrial B-512.

2. La cepa identificada como *Leuconostoc mesenteroides*, y designada como CW28 es productora de una levansacarasa asociada a células con actividad de 0,6 U/mg a pH 6.5 y una temperatura de 30°C.

3. La levansacarasa de la cepa 28, fué caracterizada, asociada a las células. No sintetiza oligosacáridos en las reacciones de aceptor con los compuestos empleados: galactosa, fructosa, maltosa, lactosa, glicerol y sorbitol. Toda la fructosa de la sacarosa es empleada para la síntesis de polímero pues prácticamente no hay hidrólisis. El polímero obtenido fué identificado como levana.

4. Se encontró además en la cepa CW28 una actividad presumiblemente dextranasa intracelular que no se expresa a menos que las células sean lisadas,

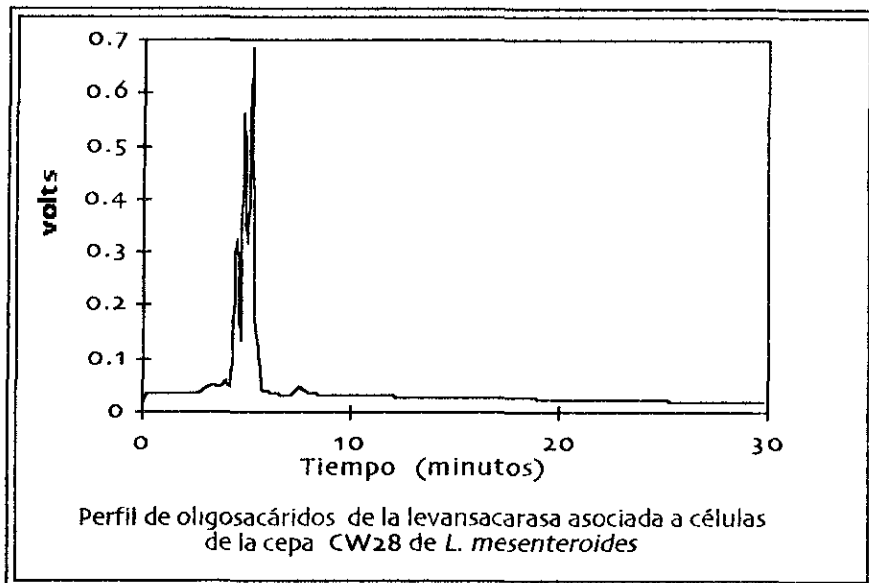
5. La dextranasa intracelular de esta misma cepa, no produce oligosacáridos en presencia de maltosa.

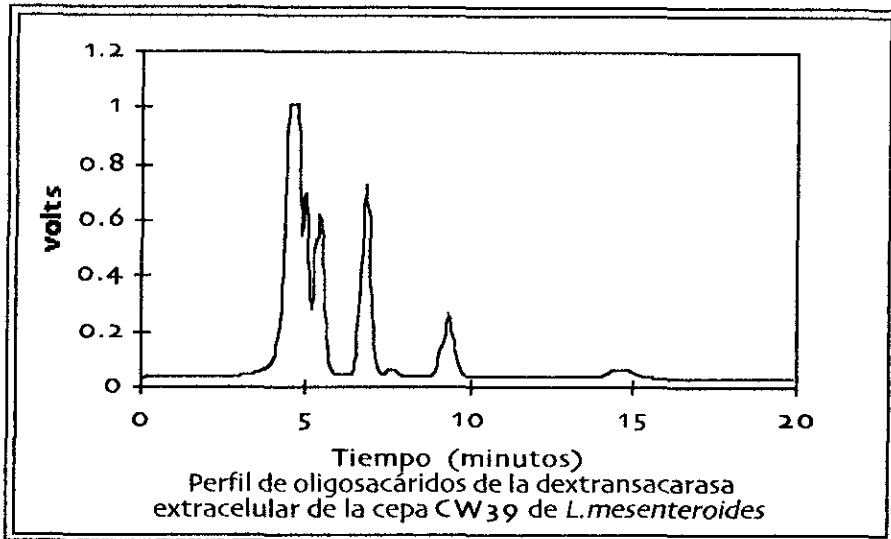
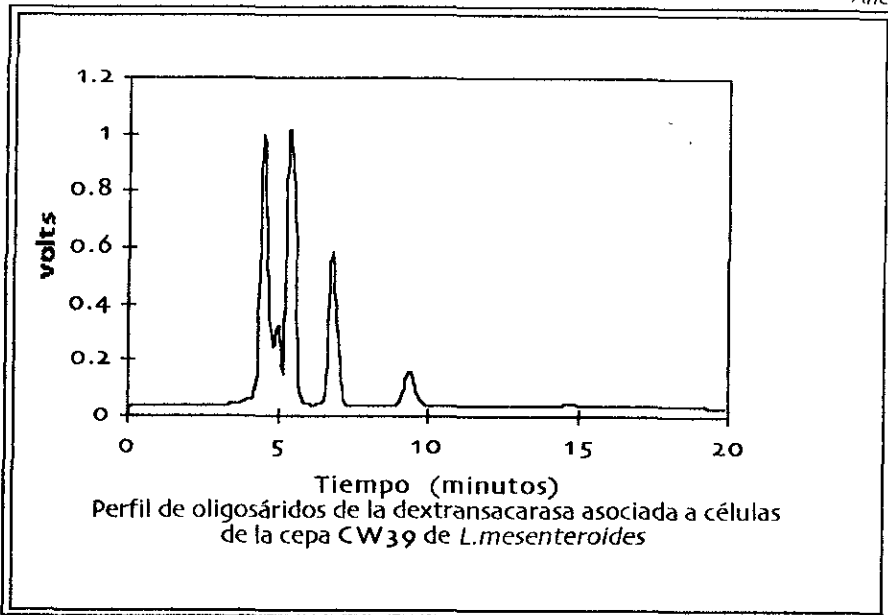
Conclusión general.

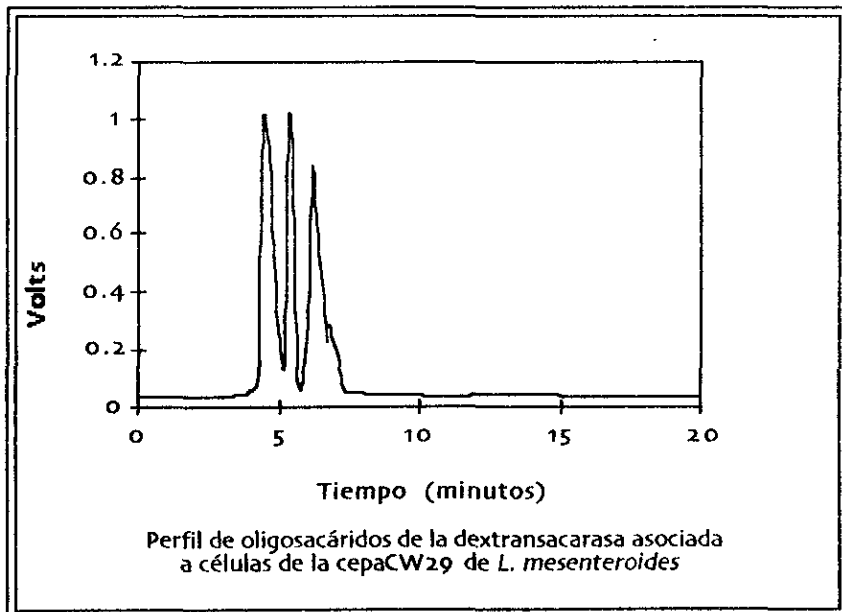
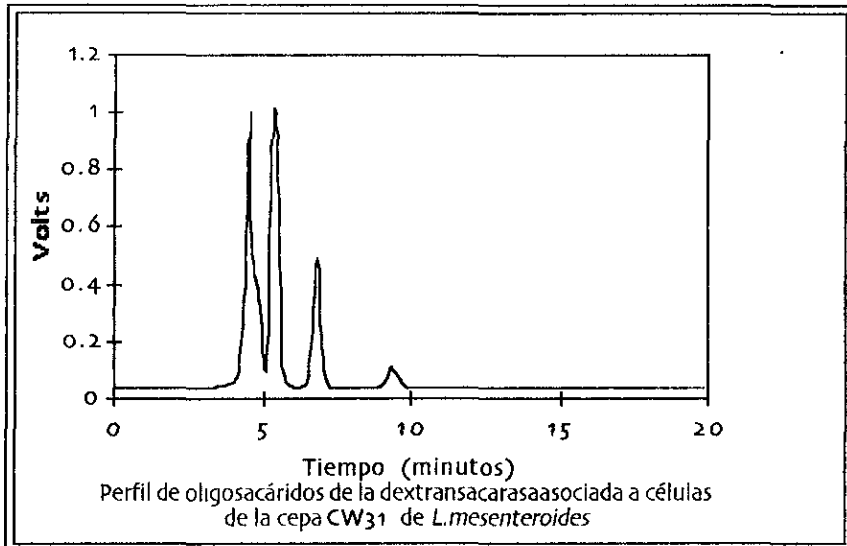
En el presente trabajo se encontró una cepa de *L. mesenteroides* que cuenta con características no vistas antes en alguna otra cepa de este microorganismo, por lo que es recomendable hacer un estudio exhaustivo con el fin de caracterizar a las enzimas en términos de peso molecular, temperatura y pH óptimos, especificidad, condiciones de producción, además del tipo de productos que ambas enzimas puedan producir para ser aplicados industrialmente en las áreas de alimentos y farmacia.

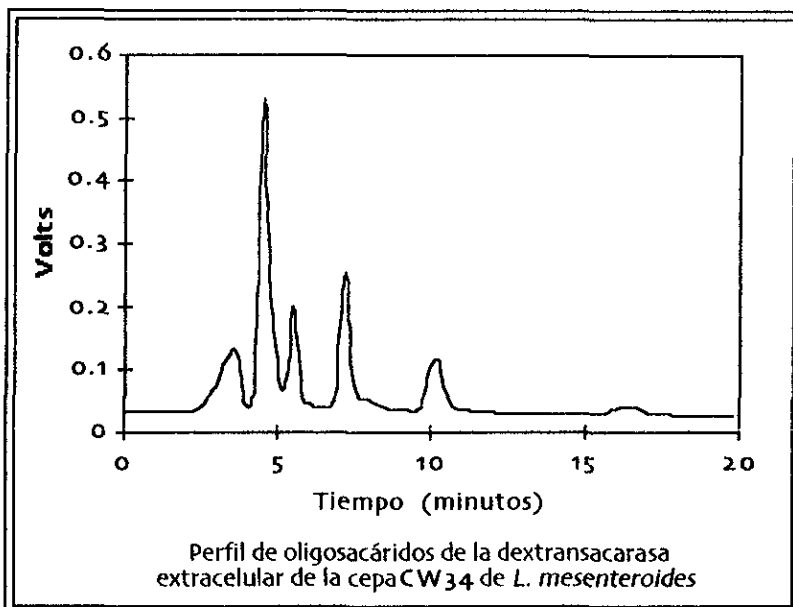
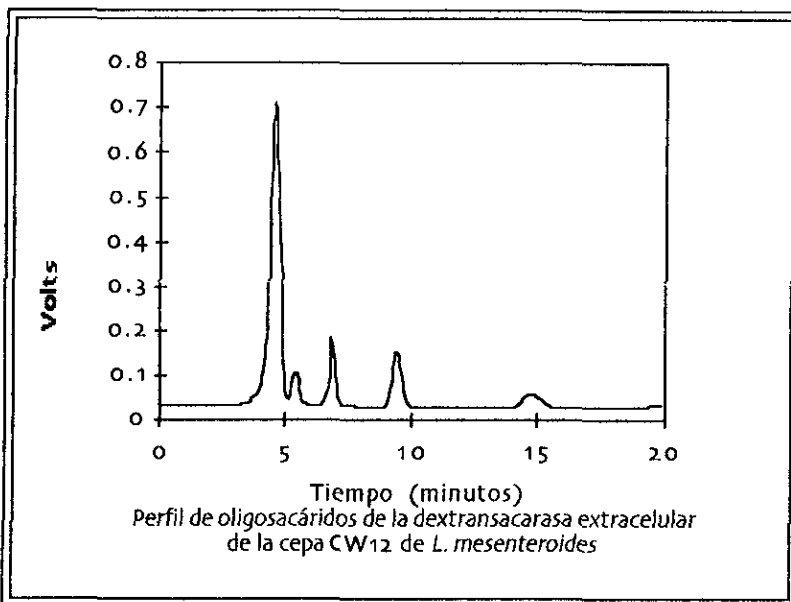
Anexo 1.

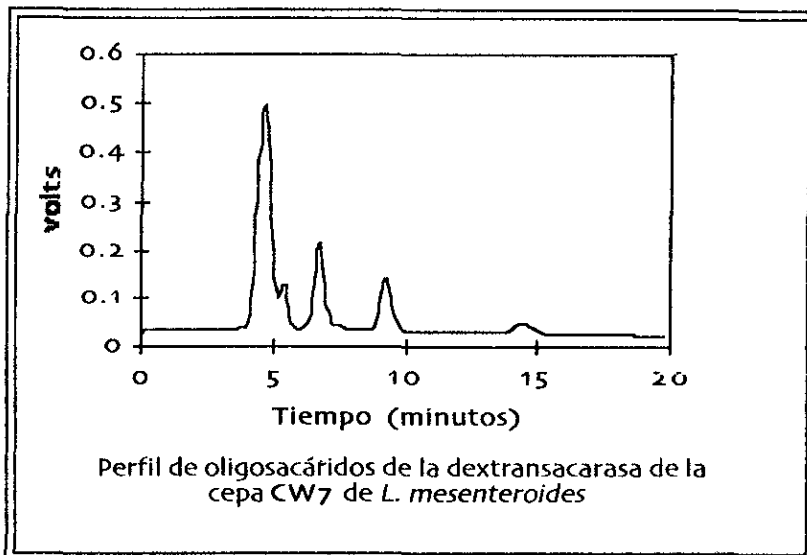
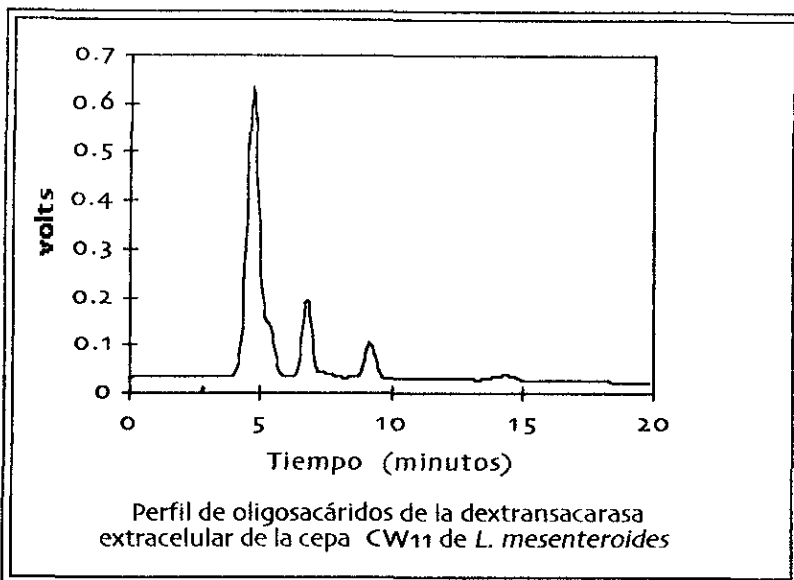
Cromatogramas de los productos de acepto de las cepas de *L. mesenteroides* aisladas del pozol. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de maltosa como azúcar acepto y sacarosa en una relación de 1:2 a una temperatura de 30 °C y pH 5.4.





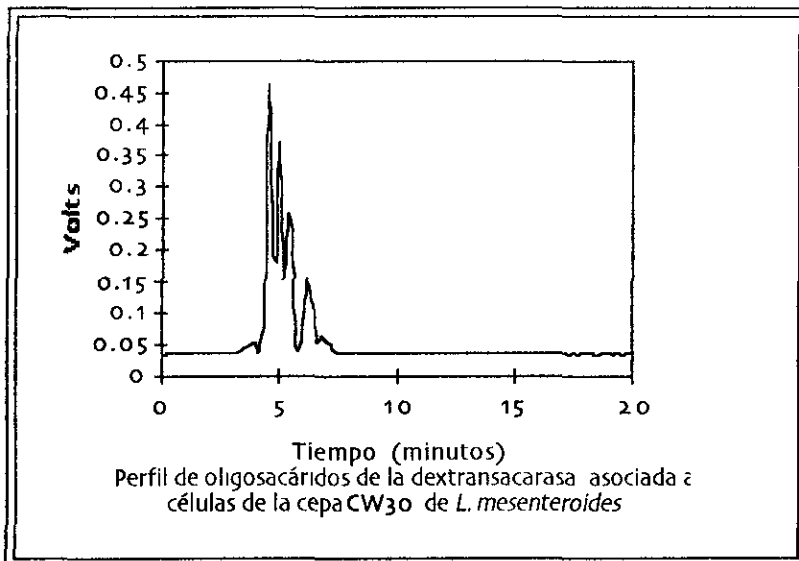






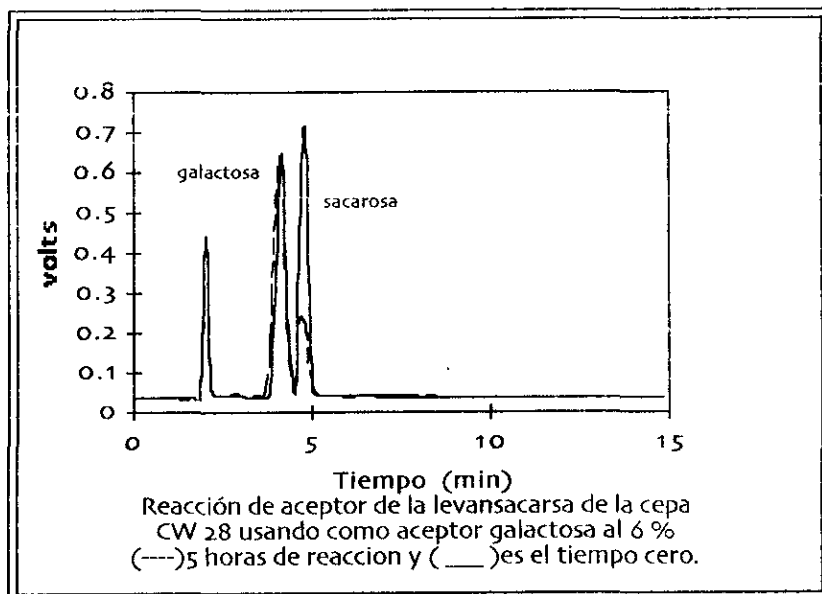
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

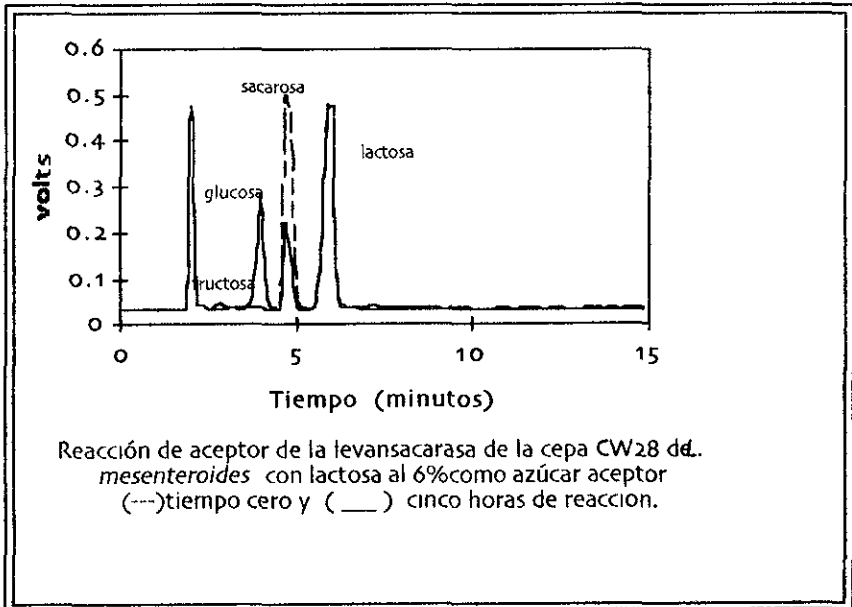
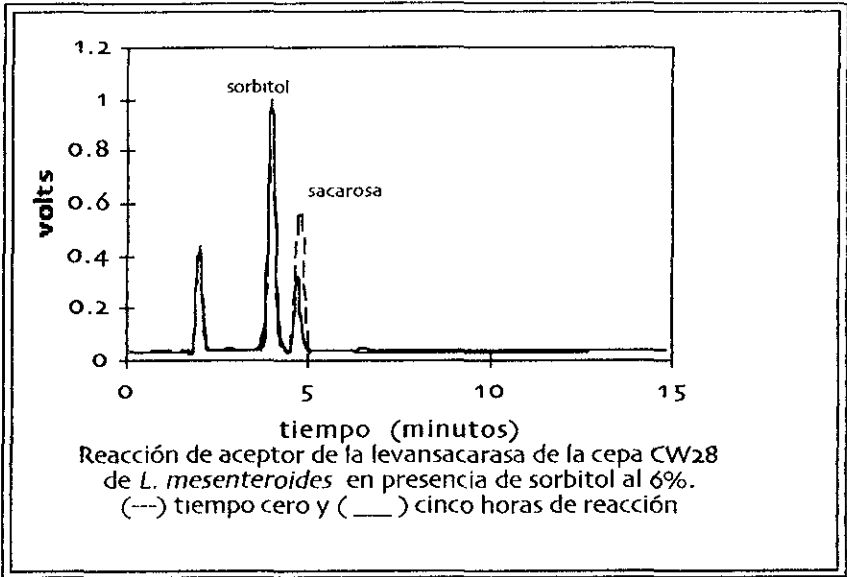
Anexo 1



Anexo 2

Reacciones de aceptor de la Levansacarasa de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* aislada del pozol Cw 28 con diferentes aceptores. Temperatura de reacción 30°C y pH 6.5





vii Bibliografía

Canedo S., Aplicación de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* en la síntesis de oligosacáridos. Instituto de Biotecnología UNAM. 1997.

Dendonder, R., Role and mechanisms of transglycosylation reaction. Biochemistry of the glycosidic linkage. P.A.A.B.S. Symposium, 2, 21-76, Acad. press. Inc. new York. 1972.

Franz, G., A. Hensel and J. Kraus. Structure-activity relationship of immune modulating polysaccharides with an antitumor effects. In Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides. Gordon and Breach Science Publishers. 241-249. 1988.

Fu, D. and Robyt, J. A facil purification of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512FM dextransucrase. Preparative biochemistry 20:2 93-106, 1990.

Han, Youn W., Margaret, A., Clarke. Production and Characterization of Microbial Levan. Journal Agric. Food. Chem. 38, 393-396. 1990.

Kobayashi, M., K. Shishido, T. Kikuchi and K. Matsuda. Fractionation of the *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran and preliminary characterization of the fractions. Agr. Biol. Chem. 37:357-365, 1973a.

López, M. and Monsan, P. Dextran synthesis by immobilized dextransucrase. Biochemie. 62:323-329, 1980.

Monsan, P. and Paul, F. Enzymatics synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiol. Rev. 16:187-192, 1995.

Monsan, P. Oligosaccharides.. ou oligosaccharines?. Biofutur. No. 125 pp 29-30. 1993.

Perlot, P., Monsan, P. Production, purification and inmovilization of *Bacillus subtilis* Levansacarasa. 434, 468-471. 1984.

Perlot, P., Production, Purification et aplication de la levane-saccharase de *Bacillus subtilis*. Thèse Doc. Institut National des Sciences Apliquées de Toulouse. 1980.

Robynt, J., Su, D. Determination of the number of sucrose and acceptor binding sites for *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase, and the confirmation of the two site mechanism for dextran synthesis.308, 471-476.1993

Robynt, J., Kimble, B. The mechanism of Dextransucrase action. Arch. of Biochemistry and biophysics. 165, 634-640. 1974

Robynt, J., Tanriserven, A. Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextransucrase, and the demonstration of a separate acceptor binding-site. Carbohydrates Research. 225, 321-329. 1992.

Robynt, J. and Taniguchi H. The mecanism of dextransucrase action. Arc. Biochem. Biophys. 174:129-135, 1976.

Robynt, J. and Walseth, T. The mecanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. Carbohydrates Research 61:433-445, 1978.

Robynt, J. and Eklund, S. Relative, quantitative effects of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. Carbohyr. Res. 121:279-286, 1983.

Robyt, J. Dextran. Encyclopedia of Polymer science and engineering. Vól 4. 2° edición. John Wiley and Sons, Inc. N. York. E.U.A. 752-767.

Summer J.B., and S.F. Howell., A method for determination of invertase activity. J. Biol Chem., 108. 51-54. 1935.

Tsuchiya, H.M., and Koepsell H.J. The effects of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 64: 521-527, 1993

Viniegra, González, G. y Gomez. Lactic acid production by pure and mixed bacterial cultures. *Chemical and fuel fermentation*. Wised. Ontario. 17-38. 1984

Wacher R., (1995) Estudios sobre la microbiología del pozol. Tesis doctoral. Facultad de Química. UNAM.