



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE
Leuconostoc mesenteroides
NRRL B-512F AL SUBCULTIVAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ABRAHAM ITZCOATL ACATZI SILVA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

MEXICO, D.F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente	Prof. Agustín López-Munguía Canales
Vocal	Profa. María Del Carmen Wachter Rodarte
Secretario	Profa. Maricarmen Quirasco Baruch
1er. Suplente	Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
2º . Suplente	Profa. Amelia Ma. De Gpe. Farrés González Saravia

Lugar en donde se desarrollo este trabajo:

Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM,
Laboratorio 312, Conjunto E.

Asesor del tema:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch



Firma

Sustentante:

Abraham Itzcoatl Acatzi Silva



Firma

Mamá, simplemente gracias por todo

Papá, gracias por enseñarse a ser un hombre de ideas y trabajo

Angélica e Itzel, todavía son mis niñas de la casa

*Mi gran familia: Abuelita, Mamá Santa, Tías (mis maestras en la casa), Tíos
y primos, de todos guardo algo*

A todos ustedes, no saben cuanto los quiero

Y por su puesto a todos mis amig@s y compañer@s:

Adrián, Adriana, Alejandra, Alejandro, Alexandra, Alma Berenice, Ana Berenice,
Ariadna, Brenda, Claudia, Cristian, David, Griselda, Jacqueline, Jeanette, Joel, Jorge A.,
Jorge D., Leobardo, Lizbeth, Lucía, Lupita, Mirna, Mónica, Naomi, Nelly, Raúl, Rene,
Rocío, Sandra, Susana, Viridiana, Yareli

con los que comparto, compartí y espero seguir compartiendo cantidad de alegrías,
tristezas, desvelos, enojos, ideales, aventuras, en fin...
ustedes bien lo saben.

*....y tú, mi lucecita en el camino, lo que sigue va por ti
y no importa cuanto dure...*

Mi máximo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de recibir la mejor educación de este país.

Maricarmen gracias por hacer que termine esta carrera con broche de oro.

A las Dras. Amanda y Amelia, gracias por ser fuente de inspiración.

Agradezco al Dr. López-Munguía y a la Dra. Watcher por sus comentarios en la revisión de esta tesis.

Gracias al Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL) por la beca otorgada.

...y quién dijo que a la Universidad sólo se viene a estudiar

Marcos, primavera de 2001, C.U.

Índice	Página
Resumen	
I Introducción	1
II Antecedentes	4
II.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5
II.2 Transferasas	5
II.2.1 Glucosiltransferasas	5
II.2.1.1 Dextranacararas	6
II.2.1.2 Producción de dextranacarasa	7
II.2.1.3 Purificación de la dextranacarasa	7
II.2.1.4 Peso molecular	8
II.2.1.5 Dextranas	9
II.2.1.6 Estructura de las dextranas	11
II.2.2 Fructosiltransferasas	13
II.2.2.1 Levansacararas	13
II.3 Sistema proteolítico en BAL	14
II.3.1 Actividad proteolítica en <i>L. mesenteroides</i> B-512F	15
III Objetivos	17
IV Materiales y métodos	18
IV.1 Microorganismo y medio de cultivo	18
IV.2 Obtención de los inóculos para cada resiembra	18
IV.3 Cinética de crecimiento	19
IV.4 Análisis de enzimas GT de <i>L. mesenteroides</i> B-512F después de subcultivarlo	19
IV.5 Medición de la actividad GT por aparición de reductores	19
IV.6 Electroforesis de proteína y detección de actividad GT <i>in situ</i>	20
IV.6.1 Condiciones de electroforesis	20
IV.6.2 Tinción de proteínas con azul de Coomassie	21
IV.6.3 Detección de actividad GT <i>in situ</i>	21
IV.6.4 Tinción de Schiff para revelar actividad GT <i>in situ</i>	21
IV.7 Ensayos de inhibición con acetato de zinc y EDTA	22
IV.7.1 Efecto de los inhibidores por análisis de actividad <i>in situ</i>	22
IV.7.2 Cuantificación de la actividad GT en presencia del inhibidor	23
IV.8 Cuantificación enzimática de glucosa y fructosa	23

IV.9 Cuantificación de proteína	25
IV.10 Ensayos proteolíticos	25
IV.10.1 Ensayos de proteólisis limitada sobre la actividad GT	25
IV.10.2 Efecto del pH, NaN ₃ y acetato de zinc sobre la proteólisis de la actividad GT	25
IV.10.3 Evolución de la proteólisis sobre la actividad GT al subcultivar	26
V Resultados y discusión	27
V.1 Cinética de fermentación de <i>L. mesenteroides</i> B-512F	27
V.2 Desarrollo de una técnica para la determinación selectiva de una de las actividades GT	28
V.2.1 Efecto cualitativo de los inhibidores sobre la actividad GT	30
V.2.1.1 Efecto del EDTA sobre la actividad GT	30
V.2.1.2 Efecto del acetato de zinc sobre la actividad GT	31
V.2.2 Evaluación cuantitativa del efecto del acetato de zinc sobre la actividad GT	32
V.2.3 Cuantificación enzimática de glucosa y fructosa producidos por la actividad GT en presencia del inhibidor	35
V.3 Producción y caracterización de la actividad glicosiltransferasa al subcultivar a <i>L. mesenteroides</i> B-512F	36
V.3.1 Evolución de la actividad GT y GT con inhibidor al subcultivar a <i>L. mesenteroides</i> B-512F	36
V.3.2 Evolución de la actividad DS y LS	39
V.3.3 Caracterización electroforética de la actividad GT	40
V.4 Actividad proteolítica: Proteólisis de la actividad GT en <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512 al subcultivar	43
V.4.1 Proteólisis limitada de la actividad GT	43
V.4.2 Efecto del pH, NaN ₃ y Acetato de Zn sobre la proteólisis de la actividad GT	46
V.4.3 Evolución de la proteólisis sobre la actividad GT	48
VI Conclusiones	53
VII Bibliografía	54
VIII Anexos	57

Resumen

En este trabajo se desarrolló una técnica por medio de la cual se logró llevar a cabo la cuantificación selectiva de una de las actividades glicosiltransferasa (GT) (dextransacarasa (DS) y levansacarasa (LS)) producidas por la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. La técnica se basó en el método de cuantificación de azúcares reductores (DNS) y se determinó que a una concentración de 30 mM de acetato de zinc se presenta una inhibición del 77% de la actividad DS, mientras que la actividad LS conserva una actividad del 67%, con respecto a la actividad volumétrica control. No se encontró inhibidor ni concentración alguna en la que se conservara la actividad total de una y la inhibición total de la otra enzima con actividad GT. De esta forma se logró establecer que al transcurso de 10 resiembras de la cepa B-512F de *L. mesenteroides* la actividad DS y LS producida es variable e independiente entre ellas, en fermentaciones por lote en matraz. El análisis electroforético de las proteínas extracelulares de este estudio reveló que la variación de la actividad GT observada en esta cepa no se debe a la actividad proteolítica presente, dado que no se observó una disminución de las especies activas que se producen en cada resiembra.

Se logró llevar a cabo el procesamiento proteolítico sobre la DS, a pH 7.5 y 30°C, el cual produjo tres formas activas (165, 160 y 155 kDa) a partir del producto del gen *dsr-S*. En las condiciones evaluadas, no se logró observar la degradación total de la forma principal de 170 kDa de la DS.

La evaluación cualitativa de la actividad proteolítica al subcultivar la cepa, llevada a cabo mediante la proteólisis de la actividad GT, no mostró cambios en el patrón de las formas activas producidas por dicho procesamiento al transcurso de las resiembras, pero sí se presentaron diferencias en el grado de degradación a partir de la forma principal de la DS, principalmente, lo que hizo suponer que la actividad proteolítica producida por esta cepa al ser resembrada también es variable. En conclusión, la actividad enzimática con actividad DS, LS y proteolítica producidas por *L. mesenteroides* B-512F es variable cuando éste es cultivado en resiembras sucesivas.

I Introducción

En los últimos 25 años la producción de polisacáridos microbianos ha incrementado su importancia en la industria de la biotecnología, ya que surge como una alternativa a los polisacáridos extraídos a partir de fuentes naturales, debido a que pueden obtenerse mediante procesos tecnológicos a gran escala que aseguran producción y calidad constante del producto final, en comparación con los polisacáridos extraídos a partir de plantas y algas, los cuales se ven afectados, entre otros factores, por la variabilidad del clima, tipos de suelo, pérdidas en la cosecha, contaminación marina, lo cual es causa de fluctuaciones en la calidad, propiedades, suministro y precio final del producto.

La dextrana fue uno de los primeros biopolímeros producidos a nivel industrial (Groenwall, 1948), desde entonces se le han encontrado aplicaciones en el área de la medicina, tecnología de separaciones, biotecnológica y de los alimentos. Este biopolímero es producto de la reacción que cataliza la enzima dextransacarasa (DS), una glucosiltransferasa que transfiere un residuo glucosilo de la sacarosa a una molécula aceptora con la liberación simultánea de fructosa, sintetizando un polisacárido formado por unidades D-glucopiranosa con enlaces α -(1 \rightarrow 6) en un 95%. El principal microorganismo que se emplea para la producción de esta enzima es *Leuconostoc mesenteroides* de la cepa B-512F, una bacteria láctica en forma de cocos en cadena con metabolismo heterofermentativo. Durante los estudios realizados a la dextransacarasa a nivel de tecnología e ingeniería enzimática se observó que existía una pérdida en la producción de dextransacarasa al término de varias resiembras en la cepa de *L. mesenteroides* B-512F, lo cual condujo a una serie de investigaciones acerca del comportamiento fenotípico y fisiológico de este microorganismo. Hasta ahora se ha encontrado, efectivamente, que existe una variación en la producción de esta enzima al término de varias resiembras (Chacón, 2004). La polémica surge a partir de que *L. mesenteroides* también produce otra enzima extracelular llamada levansacarasa (LS), que al igual que la DS posee actividad glicosiltransferasa (GT), y de que actúa sobre el mismo sustrato, sólo que en este caso transfiere un residuo fructosilo de la sacarosa a una molécula aceptora, liberando glucosa, dando lugar a la formación de levana, un polisacárido compuesto por unidades D-fructopiranosilo.

Una de las técnicas utilizadas para medir la actividad DS es por medio de la cuantificación del total de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática, por ser ésta una técnica de bajo costo, rápida y reproducible. Si en la preparación enzimática tenemos DS y LS, se originará la producción de D-fructosa y D-glucosa, respectivamente, las que serán determinadas simultáneamente por el método de cuantificación de reductores. De esta forma el estudio antes mencionado (Chacón, 2004) atribuyó sus resultados únicamente a la actividad DS por ser ésta la que se produce en mayor cantidad en una fermentación. Sin embargo, se ha observado que al término de varias resiembras, puede ser tal la disminución de la actividad DS que la LS sería la predominante. Se encuentran reportados algunos sustratos que son específicos para la LS, pero son de alto costo, por lo que la implementación de una técnica sensible, reproducible y de bajo costo con la que se pueda determinar, selectivamente, la actividad de una de estas dos enzimas (LS y DS) es importante.

Por las razones anteriores, la primera parte de este estudio se enfocó a establecer las mejores condiciones experimentales, para la cuantificación selectiva de una de las actividades GT (DS y/o LS), mediante la cuantificación de azúcares reductores. Se logró, en primer lugar, conocer de manera más objetiva la relación que guarda la producción de una con respecto a la otra, y posteriormente, dando seguimiento a este estudio, se evaluó la producción cada una de estas enzimas al término de sucesivas resiembras. Con lo cual se aporta información que ayuda al estudio sistemático de este comportamiento.

Por otro lado, la actividad proteolítica producida por esta cepa, encontrada y caracterizada parcialmente dentro del grupo de trabajo del Dr. López-Munguía (Sánchez, 2000), a quien se le ha atribuido ser la responsable de las múltiples formas reportadas de la DS, dio pie a una nueva línea de investigación concerniente al procesamiento proteolítico que sufre la DS por efecto de dicha actividad. A fin de contribuir en el conocimiento de la actividad proteolítica producida por esta cepa y continuando con la línea del presente estudio, se hace necesario tener un primer acercamiento del comportamiento que presenta esta actividad cuando la cepa B-512F es resembrada. Por lo cual, en este estudio también se exploró la actividad proteolítica de la cepa B-512F, de manera que se buscó llevar a cabo el procesamiento de la DS a diferentes tiempos, a fin de lograr producir las diversas formas ya reportadas. De esta manera se obtuvo la evaluación cualitativa de dicha actividad al transcurso de diez resiembras de la cepa de *L. mesenteroides* B-512F,

mediante la proteólisis de la actividad DS, aun que quedó abierta la posibilidad que dicha actividad también afecte a la actividad LS. De esta manera, se aporta nueva información que contribuye al estudio de la actividad proteolítica producida por esta bacteria láctica.

II Antecedentes

II.1 *Leuconostoc mesenteroides*

El género *Leuconostoc* se encuentra dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), junto con los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* y *Pediococcus*. Dichas bacterias se caracterizan por producir ácido láctico como producto mayoritario durante la fermentación de carbohidratos, por esta razón estos organismos se han utilizado desde la antigüedad como agentes para la preservación de alimentos, entre los que se encuentran una gran variedad de productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados, actualmente todas las bacterias pertenecientes a estos géneros tienen una condición GRAS (por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) lo cual implica su libre uso en la producción de alimentos de consumo humano. Los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* han concentrado el interés y la inversión en la investigación sobre el estudio de las BAL debido a, principalmente, su uso mundial en el área industrial de los productos lácteos, en específico con la producción de quesos, yogurt y leches fermentadas, por tal motivo existe mucho menor información publicada acerca de los otros géneros de BAL.

De manera general, el género *Leuconostoc* comprende un grupo de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, no móviles, cocos Gram-positivos de 1 a 2 μm de diámetro, no formadoras de esporas, catalasa y oxidasa negativas. Son lácticas heterofermentativas, esto es, que fermentan carbohidratos para producir ácido láctico y cantidades considerables de ácido acético, alcohol etílico, dióxido de carbono (CO_2) y de manera ocasional ácido fórmico como productos finales de su fermentación. Son bacterias quimioorganotróficas, por lo que requieren de aminoácidos y factores de crecimiento complejos para su buen desarrollo. Este género no crece a pHs menores de 4.5, el pH óptimo de crecimiento microbiano es cercano a la neutralidad; al transcurso del cultivo el pH decae alcanzando valores inferiores a un pH de 5, por aumento de la concentración de ácidos orgánicos. Estos microorganismos son de vida libre y su hábitat lo constituyen las plantas, vegetales y los suelos; su población se ve afectada por factores como la temperatura y humedad. Pueden ser aislados tanto de estos medios como de vegetales fermentados y de otros productos (Axelsson, 1993).

Los microorganismos pertenecientes a este género son capaces de producir enzimas llamadas dextrantransferasas, las cuales al crecer en sacarosa como sustrato, participan en la síntesis de un exopolisacárido derivado de la glucosa y de alto peso molecular denominado dextrana. En *L. mesenteroides* de la cepa B-512F se ha reportado la presencia de actividad levansacarasa (Miller *et al*, 1986^a y Quirasco, 2000). Sin embargo, no se le ha dado mucha importancia, debido a que la actividad dextrantransferasa es la de relevancia industrial, pero se sabe de varios casos en el grupo de trabajo en que la actividad dextrantransferasa se pierde al término de sucesivas resiembras, haciéndose más evidente la actividad levansacarasa (López-Munguía, 2002).

Leuconostoc mesenteroides es capaz de utilizar diversas fuentes de carbono en su metabolismo además de la sacarosa como la arabinosa, fructosa, galactosa, maltosa, xilosa, glucosa, por mencionar algunos, sin embargo en *L. mesenteroides* B-512F se ha reportado que sólo en presencia de fructosa, glucosa y la sacarosa se induce la producción de la dextrantransferasa, obteniéndose la mayor inducción en presencia de sacarosa, mientras que en presencia de xilosa se considera el nivel de expresión basal (Quirasco, 2000).

II.2 Transferasas

Las transferasas son enzimas que catalizan el traslado de un grupo funcional específico desde un sustrato (donador) hacia otro (aceptor). El grupo que se transfiere puede ser de naturaleza variada. Las glucosiltransferasas y fructosiltransferasas pertenecen a este grupo de enzimas.

II.2.1 Glucosiltransferasa

Las glucosiltransferasas (GT) son enzimas extracelulares producidas principalmente por *Leuconostoc mesenteroides* y los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*; las GT catalizan la síntesis de polímeros de alto peso molecular compuestos por unidades D-glucosa (glucanos) a partir de la sacarosa. La energía necesaria para la catálisis es provista por el enlace original del sustrato y es almacenada en un intermediario covalente-enzima-

sustrato, por lo que no requieren de intermediarios de alta energía, ni de cofactores para llevar a cabo la transferencia de los residuos glucosilo (Monchois, 1999).

Cuando al medio de reacción se le añaden moléculas que presentan una alta eficiencia como aceptores, por ejemplo maltosa e isomaltosa principalmente, también se da la formación de oligosacáridos de bajo peso molecular (Koepsell, 1953). Los oligosacáridos con enlaces α -(1 \rightarrow 2) tienen aplicación en la industria alimentaria como compuestos prebióticos, ya que al no ser hidrolizados por las enzimas digestivas de los organismos monogástricos, pasan al intestino grueso donde son metabolizados por la flora microbiana presente (Djouzi, 1995), contribuyendo a mantener la población de este tipo de flora bacteriana benéfica para la salud.

II.2.1.1 Dextransacarasas

Las dextransacarasas (DS) (E.C.2.4.1.5), (α -1,6-glucan:D-fructosa-2-glucosiltransferasa) catalizan la transferencia del residuo glucosilo de la sacarosa (molécula donadora) a una molécula aceptora, con la liberación simultánea de fructosa, dando lugar a la síntesis de un polímero de alto peso molecular llamado dextrana, cuya reacción se ilustra en la Figura 1. Dichas enzimas son producidas por bacterias lácticas del género *Leuconostoc* y *Streptococcus*, las cuales producen DS de diferente naturaleza, originando glucanos de estructuras variadas.

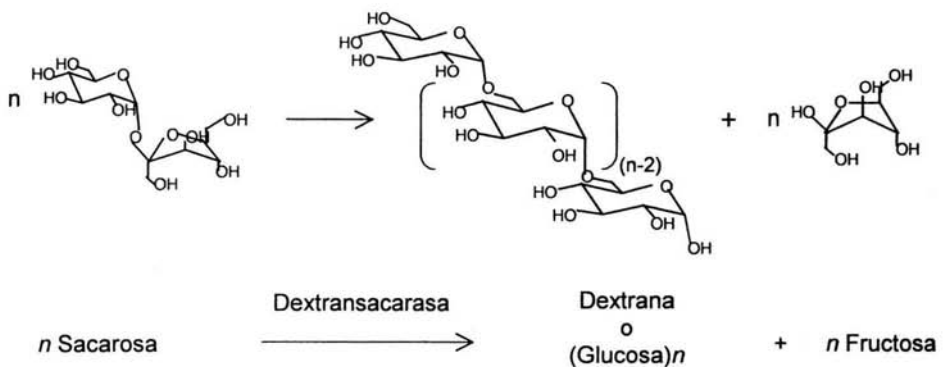


Figura 1. Reacción catalizada por la dextransacarasa.

II.2.1.2 Producción de la dextran sacarasa

La actividad DS en una fermentación de *L. mesenteroides* está asociada a su crecimiento, obteniéndose un máximo de actividad al final de la fase exponencial para posteriormente presentar una caída después de ese punto. Se encontró que el paso fundamental para la obtención del máximo de crecimiento celular y máxima actividad enzimática se obtuvo a partir de un cultivo alimentado (fed-bach); durante el crecimiento del microorganismo el medio de cultivo se mantuvo a pH 6.6-6.7, al llegar a la fase logarítmica de crecimiento se añadió continuamente ($20 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) una solución de sacarosa 1 g/mL obteniendo un máximo de actividad de 8.89 U/mL (A. Lopez and P. Monsan, 1980).

II.2.1.3 Purificación de la dextran sacarasa

La dextran sacarasa de *L. mesenteroides* B-512F es una enzima extracelular por lo que al término de la fermentación, la enzima se localiza en el caldo de fermentación. Al retirar las células, por centrifugación, se obtiene el sobrenadante que contiene la actividad enzimática, el cual, en ocasiones se concentra y purificar para llevar a cabo posteriormente la catálisis deseada. La concentración de la enzima puede obtenerse a partir de una operación de ultrafiltrado, mientras que para su purificación se ha reportado el uso de técnicas de cromatografía de permeación en gel (López-Munguía & Monsan, 1980). Sin embargo, se encontró que un sistema de concentración-purificación por extracción líquido-líquido con polietilén glicol (PEG, P.M. 1500) resulta en un mayor grado de purificación de la enzima en comparación a los de la cromatografía (Monsan, 1987). Dicho sistema se basa en que, cuando se agrega el PEG se forman dos fases debido a la incompatibilidad de dos polímeros, que termodinámicamente no pueden estar disueltos en la misma fase, cuando la enzima se encuentra en este sistema, migra preferentemente a una de las dos fases, mientras que los restos del medio de cultivo, que contienen otras proteínas y carbohidratos permanecen en la fase del PEG.

II.2.1.4 Peso molecular

Son diversos los trabajos publicados en lo concerniente al peso molecular de la DS de *L. mesenteroides* B-512F. Se han reportado una gran variedad de pesos moleculares desde 65 hasta los 188 kDa que presentan actividad DS, Tabla 1.

Tabla 1. Pesos moleculares reportados para la DS de *L. mesenteroides*

<i>Cepa de L. mesenteroides</i>	<i>Tamaño (kDa)</i>	<i>Referencia</i>
512F	188, 126, 65	Kobayashi y Matsuda (1980)
512F	174 y 156	Miller y Robyt (1986 ^b)
512F	185, 130 y 65	Willemont y col. (1988)
512F	177 y 158	Wilke-Douglas y col. (1989)
512FM	158	Fu y Robyt (1990)
512F	173 y 155	Sánchez M. (2000)
512F	170	Quirasco M. (2000)

En un inicio se propuso que el fenómeno de multibandeo que se presenta en una muestra analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) era ocasionado por la presencia de dextrana en las preparaciones enzimáticas. Kim y Robyt (1994^a) sugirieron que el polímero ocasionaba problemas en la migración de las proteínas en SDS-PAGE. Pero, tiempo después, por medio del uso de radiaciones ligeras de rayos X se mutó el gen que codifica para la DS de la cepa nativa y se logró su expresión constitutiva, produciendo la cepa B-512FMC que produce DS sin la necesidad de suministrar sacarosa como inductor, por lo cual la enzima queda libre de polímero (Kim y Robyt, 1994^b). Aun así en las preparaciones enzimáticas de esta nueva cepa se continuó observando múltiples bandas con actividad DS. Aunado a esto se demostró que el polímero no intervenía en la migración de las proteínas en geles de SDS-PAGE (Funane *et al*, 1995).

La presencia de diversas formas de la DS en *L. mesenteroides* B-512F y B-512FMC, se ha atribuido al resultado de un procesamiento proteolítico. En el grupo de trabajo del Dr.

López-Munguía se identificó por primera vez en extractos enzimáticos de estas cepas una proteasa a la cual se le atribuye ser la responsable de la variación del peso molecular de la DS (Sánchez, 2000). En dicho estudio se encontró que la cantidad de cada forma depende de la actividad proteolítica, condiciones y tiempo de almacenamiento, además de los métodos de producción y purificación aplicados.

Por otra parte, el gen identificado de la DS (*drs-S*) de *L. mesenteroides* B-512F codifica para una proteína de 1527 aminoácidos, lo que equivale a un peso molecular aproximado de 170 kDa (Wilke-Douglas *et al*, 1989 y Monchois *et al*, 1997). La caracterización de la enzima y de sus productos, así como los estudios de hibridación DNA-RNA realizados por la Dra. Quirasco (2000) indican que sólo se expresa un gen que codifica para la DS de la cepa B-512F, el *drs-S*. Esto dejó de lado la posibilidad de que el bandeo que se presenta en las preparaciones enzimáticas de esta cepa sea a causa de la expresión de varios genes que codifiquen para la síntesis de DS de diferentes pesos moleculares, reafirmando aun más la hipótesis de que el fenómeno de bandeo es producido por la actividad proteolítica presente en esta cepa.

II.2.1.2 Dextranas

El jugo de caña, al contener una alta cantidad de azúcar, tiende a convertirse de manera natural en un líquido viscoso o gelificado, debido a que se contamina con bacterias provenientes del aire o de las plantas. Este fenómeno ha causado sin duda mucho apuro en industrias azucarera o de la remolacha, debido a que provoca obstrucciones en filtros y tuberías, inhibe la cristalización y disminuye los rendimientos durante el refinado del azúcar. En 1861 Louis Pasteur estableció que el polímero viscoso que se encontraba en jugos de frutas era un polisacárido formado a partir de la actividad de microorganismos. Para 1874 Scheubler determinó su fórmula empírica $C_6H_{10}O_5$ y lo nombró dextrana por presentar rotación óptica positiva, además de encontrar que su estructura estaba muy relacionada con la del almidón. Van Tieghem fue el primero en nombrar a *Leuconostoc mesenteroides* como el causante de la producción de la dextrana. La síntesis enzimática de la dextrana sin células fue demostrada por Hehre y Sugg. En 1944 Hestrin y Shapiro-Avineri dieron el nombre de dextransacarasa a la enzima implicada en la síntesis de la dextrana, poco tiempo después fue clasificada dentro del grupo de enzimas

transglucosilasas. En 1937 Flower y colaboradores realizaron las primeras investigaciones acerca de la estructura química de la dextrana. Entre los años 1950 y 1970 varios grupos de investigadores se avocaron a la investigación de la estructura, propiedades y usos de este polímero.

Así, dextrana es el término que se le asigna a la serie de homopolisacáridos extracelulares de alto peso molecular, que consiste en unidades de α -D-glucopiranosas unidas principalmente por enlaces α -(1 \rightarrow 6) en la cadena principal y con un grado de ramificación variable que presenta enlaces α -(1 \rightarrow 3), α -(1 \rightarrow 4) ó α -(1 \rightarrow 2). Esta variabilidad en el tipo de enlace, produce cambios en la estructura de la dextrana, que junto con el tamaño de la cadena, hace que la solubilidad en el agua, así como sus propiedades fisicoquímicas se vean modificadas (Wales, 1953).

Sin embargo, son pocas las aplicaciones comerciales de la dextrana debido a que sus propiedades reológicas son menos interesantes en comparación con las xantanas o los alginatos, por tal razón, se han desarrollado productos de alto valor agregado basados en su inocuidad y comportamiento reológico. Comercialmente la dextrana de la cepa B-512F de *L. mesenteroides* ha sido la más utilizada. Por ejemplo, en el área de la medicina, una solución salina isotónica con dextrana (6% p/v) puede ser utilizada como sustituto de plasma sanguíneo, ya que la dextrana da propiedades de viscosidad, coloidal y presión osmótica a esta solución equivalente a las proteínas del suero sanguíneo. Esta solución puede ser administrada por vía intravenosa para el tratamiento de quemaduras y shock eléctrico, a fin de restaurar la presión y el volumen circulatorio sanguíneo, especialmente cuando es insuficiente la sangre disponible para este tipo de tratamientos (Gronwall, 1945 y 1957).

En los años sesentas, la dextrana fue introducida en el área de tecnología de separaciones por el Pharmacia Fine Chemical Limited con la marca registrada de Sephadex[®], el cual es un gel a base de dextrana utilizado para la purificación y separación de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Estos geles poseen un rango bien definido de separación de peso molecular entre los 5000-200000, e l derivado hidroxipropil del Sephadex ha sido utilizado para separar materiales en solventes orgánicos acorde a su peso molecular y para la separación de lípidos, ácidos grasos y esteroides entre otros (Sephadex, Pharmacia Fine Chemical Inc., 1964).

II.2.1.3 Estructura de las dextranas

Desde 1976 los estudios para dilucidar la estructura de las dextranas se basan en sus propiedades químicas (análisis por metilación, oxidación por periodato) y físicas (solubilidad). Estos trabajos fueron complementados mediante el análisis de ^{13}C -RMN, encontrándose que estos polímeros tienen una relación relativamente alta de enlaces α -(1 \rightarrow 6). El tipo de enlace y tamaño final de la dextrana depende del tipo de cepa productora del que se haya obtenido la enzima (Figura 2).

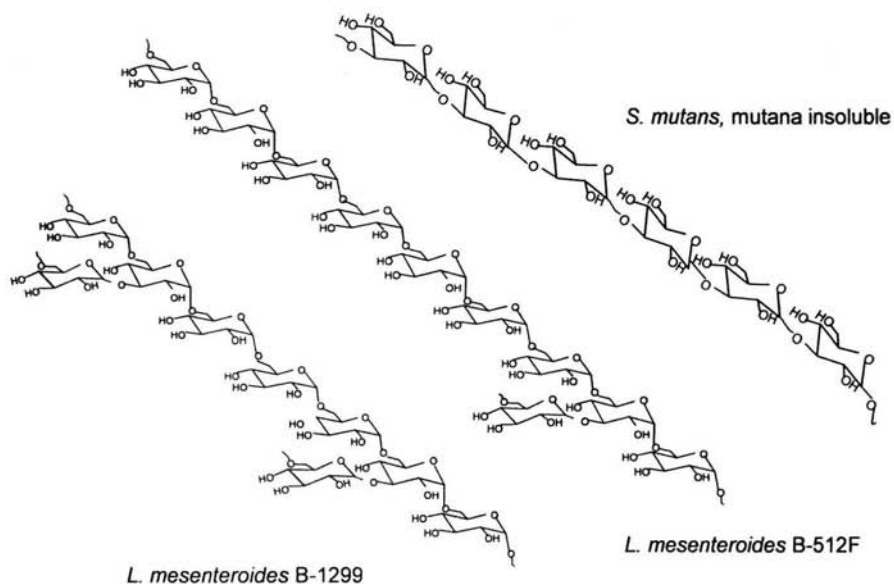


Figura 2. Representación de diferentes estructuras de dextranas sintetizadas por DS pertenecientes a diversas cepas.

En los últimos diez años, el aislamiento de los genes que codifican para la síntesis de dextransacarosas en los géneros *Leuconostoc* y *Streptococcus*, ha permitido su clonación en microorganismos no productores de este tipo de enzimas, logrando de esta manera establecer la relación entre la cepa productora, el gen o genes que posee y la estructura

final del glucano producido (Monchois, 1999). En la Tabla 2 se presentan las proporciones de enlace de algunas dextranas producidas a partir de la expresión de genes clonados en *E. coli*.

Tabla 2. Caracterización de varias dextranas sintetizadas a partir de dextranosa producidas por la expresión de genes clonados en *E. coli*. (Monchois, 1999)

<i>Cepa</i>	<i>Gene</i>	<i>Dextrana</i> ^a	<i>Tamaño (aa)</i>	<i>P.M.</i> ^b (10^3)
L. mesenteroides NRRL B-512F	dsr-S	5% α -(1→3)	1527	170
		95% α -(1→6)		
L. mesenteroides NRRL B-1299	dsr-A	15% α -(1→3)	1290	146
		85% α -(1→6)		
	dsr-B	5% α -(1→3)	1508	167
		95% α -(1→6)		
Streptococcus mutans GS5	gtf-B	87% α -(1→3)	1475	150
		13% α -(1→6)		
	gtf-C	85% α -(1→3)	1375	140
		15% α -(1→6)		
	gtf-D	30% α -(1→3)	1430	155
		70% α -(1→6)		

^a Proporción de enlaces en %

^b Peso molecular deducido a partir de la secuenciación de la proteína

II.2.2 Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FT) pertenecen al grupo de las glicosiltransferasas, las cuales han sido utilizadas para la síntesis de fructooligosacáridos, fructosidos y biopolímeros. Estas enzimas utilizan a la sacarosa como sustrato, transfiriendo el residuo de fructosa a una molécula aceptora, la energía que se libera del enlace glucosídico es transferida

hacia la formación del enlace fructosilo, cuya especificidad es dependiente de la fuente de la enzima. Los productos principales de las fuctosiltransferasas son dos tipos de polímeros: la levana polímero de enlaces en β -2,6-fructosa producido por la actividad de la levansacarasa, e inulina polímero de enlaces en β -2,1-fructosa producido por la actividad de la inulinsacarasa (Castillo & López-Munguía, 2004), dichos polímeros han sido foco de intensas investigaciones por sus interesantes propiedades como prebióticos y fibra soluble (Niness, 1999).

En los últimos años las FT han tomado gran relevancia por su capacidad de sintetizar fructooligosacáridos (FOS) a partir de la sacarosa, los cuales son azúcares que al no ser digeridos en el estómago ni en el intestino delgado estimulan selectivamente el crecimiento de bifidobacterias, trayendo importantes beneficios para la salud (Monsan, 1995).

II.2.2.1 Levansacarasa

La levansacarasa (LS) (E.C. 2.4.1.10) (β -2,6 fructan: D-glucosa-1-fructosiltransferasa) es una enzima que pertenece al grupo de las fructosiltransferasas y poseen características similares a las glucosiltransferasas sólo que en lugar de la glucosa en este caso transfieren un residuo fructosilo de la sacarosa a una molécula aceptora, liberan glucosa al medio de reacción y dan lugar a la formación de levana (Figura 3), un polisacárido de alto peso molecular compuesto por unidades D-fructopiranosilo. La levana, al igual que la dextrana, posee aplicaciones biotecnológicas propias, lo cual hace que sea útil para una gran variedad de aplicaciones, por ejemplo en el campo de los cosméticos, los alimentos y la industria farmacéutica (Belghith, 1996) y en el área de la medicina como agente hipocolesterolémico (Yamamoto *et al.*, 2000). La LS además de catalizar la formación del polímero de fructosa también lleva a cabo la síntesis de oligosacáridos de bajo peso molecular cuando en el medio de reacción se encuentran presentes moléculas aceptoras como la lactosa y la maltosa (Perez-Oseguera *et al.*, 1996).

Entre los organismos con mayor producción de LS se encuentra el género *Bacillus*, donde se han realizado una amplia gama de estudios encaminados a su aplicación biotecnológica, por ejemplo, en la producción de FOS. Dentro de las BAL se ha reportado

la presencia de actividad LS, sin embargo este conocimiento es aun muy limitado, sólo para el caso del género *Lactobacillus* se ha encontrado que cuando éste participa durante la fermentación del pan ácido produce levana, entre otros polisacáridos, lo cual da como resultado que el producto final posea propiedades reológicas similares a las que se presentan cuando se utilizan xantana o goma guar (Tieking, 2003), este hecho abre la posibilidad de usar estas BAL como sustitutos en el uso de estos aditivos. En el caso de *L. mesenteroides* B-512F sólo se ha reportado la presencia de esta enzima (Miller, 1986 y Quirasco, 2000), de hecho la presencia de actividad LS en esta BAL se considera como un obstáculo para diversos estudios en la DS, lo cual ocasiona que el estudio de la LS en *L. mesenteroides* B-512F sea aún menor en comparación con otras BAL que también presentan esta actividad.

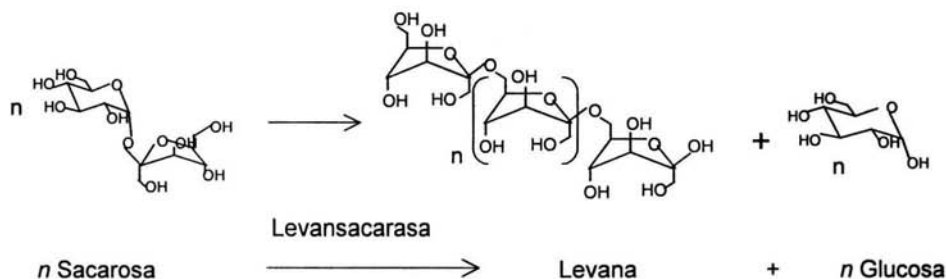


Figura 3. Reacción catalizada por la levansacarasa

II.3 Sistema proteolítico en BAL

El estudio de los sistemas proteolíticos en las BAL se originó a partir de que estos microorganismos son utilizados como cultivos iniciadores en la producción de leches fermentadas y/o en la elaboración de quesos. Debido a que el sistema proteolítico de estos microorganismos es esencial para su crecimiento en la leche y a que contribuye significativamente con el desarrollo de sabores en este tipo de productos (Law, 1997).

Los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* son los de mayor importancia para la elaboración industrial de productos lácteos. Por esta razón, el estudio de los sistemas proteolíticos en las BAL se ha enfocado principalmente en estos géneros. Dando como resultado que el conocimiento de estos sistemas en otros géneros de BAL sea limitado.

De manera general, el sistema proteolítico de las BAL está compuesto por tres elementos: a) Proteinasas: sirven para la producción de oligopéptidos de diferentes tamaños a partir de las proteínas de la leche. b) Peptidasas: sirven para degradar a los oligopéptidos, hasta llegar a producir pequeños peptidos y aminoácidos. c) El sistema de transporte: esta involucrado en translocar los pequeños peptidos y aminoácidos al citoplasma celular (Law, 1997).

Con el desarrollo de estos complejos sistemas enzimáticos, las BAL pueden obtener los aminoácidos necesarios para alcanzar una alta velocidad de crecimiento. Sin ellos, estas bacterias no podrían desarrollarse, debido a que, al ser organismos quimioorganotróficos no poseen la capacidad de sintetizar una gran cantidad de aminoácidos y por lo tanto, necesitan desarrollar sistemas enzimáticos que les permitan obtener la fuente de nitrógeno necesaria para su metabolismo. En la leche, por ejemplo, los aminoácidos que se encuentran libres resultan ser insuficientes para estas bacterias, así con la ayuda de estos sistemas proteolíticos, en conjunto con otros sistemas como son los de hidrólisis de lípidos, las LAB pueden obtener los componentes necesarios para su óptimo crecimiento (Macedo, 2000). Durante este proceso de obtención de nutrientes es donde se producen los olores y sabores que le confieren características sensoriales propias a cada uno de éstos productos lácteos.

Como ya lo hemos mencionado, el sistema peptido hidrolasa de *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. ha sido de gran interés en muchos estudios, sin embargo, poca atención ha recibido las peptidasas de *Leuconostoc* spp. a pesar de que este género de bacteria láctica es parte de los cultivos iniciadores que se utilizan en la fabricación de algunas variedades de quesos tipo alemán (Macedo, 2000). Los pocos estudios realizados hasta ahora se limitan a la cuantificación, por diversos medios aún no estandarizados, de la actividad proteolítica producida por cepas del género *Leuconostoc* obtenidas a partir de la caracterización de quesos de producción local (Herreros, 2003).

II.3.1 Actividad proteolítica en *L. mesenteroides* B-512F

Como ya se mencionó, la detección y parcial caracterización de la actividad proteolítica en esta cepa fue realizada en el grupo de trabajo del Dr. Agustín López (Sánchez, 2000). En dicho estudio se encontró que las condiciones óptimas de actividad enzimática son pH 8 y 50°C. Sin embargo a pH 5.2 y 30°C, condiciones habituales en la que se determina actividad DS en extractos enzimáticos obtenidos a partir de esta cepa, aún conserva el 13% de su actividad.

En el mismo estudio, se encontró que la actividad proteolítica alcanza su máxima actividad en etapas tempranas del cultivo, esto supone que esta actividad es necesaria para la obtención de nutrientes necesarios para su desarrollo. Este hecho puede hacer suponer que el sistema proteolítico de *L. mesenteroides* B-512F posea componentes similares en el modo de acción de sus enzimas con respecto a los sistemas ya reportados en *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. principalmente.

Siguiendo la misma línea de investigación, se evaluaron diversas fuentes de nitrógeno (Arguello-Morales, 2004). Destacando como resultado que cuando se suministra al medio de cultivo sulfato de amonio, casaminoácidos o triptona se obtiene la mayor concentración de actividad proteolítica.

Hasta ahora los esfuerzos en cuanto a la caracterización de la actividad proteolítica en *L. mesenteroides* B-512F van encaminados hacia los efectos que tiene esta actividad sobre la DS producida por esta cepa. Localizando los sitios en donde corta esta enzima para producir los diversos fragmentos observados de la DS, ya mencionados. Haciendo que la línea de investigación en esta área abra una gran cantidad de nuevos trabajos al respecto. Sin duda, el estudiar la actividad proteolítica producida al subcultivar esta cepa, por lo menos cualitativamente, como se plantea en este trabajo, aportará información al estudio global de esta área.

III Objetivos

Objetivo general:

Establecer la variabilidad de las actividades DS, LS y proteolítica de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F después de subcultivarlo.

Objetivos particulares:

Desarrollar una técnica adecuada por medio de la cual se determine selectivamente cada una de las actividades glicosiltransferasa (DS y LS) utilizando el método de cuantificación de azúcares reductores (DNS).

Caracterizar las actividades DS y LS producida por *L. mesenteroides* B-512F durante el transcurso de 10 resiembras.

Estudiar cualitativamente la actividad proteolítica producida por esta cepa al subcultivar, evaluada por medio de la proteólisis de la DS.

IV Materiales y métodos

IV.1 Microorganismo y medio de cultivo

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F se obtuvo de la colección del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) Peoria, Illinois. Las células se encontraban en una solución de glicerol al 15% (v/v) a -4°C contenidas en frascos viales, las cuales sirvieron como inóculos para las fermentaciones a nivel matraz realizadas.

La composición del medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo de *L. mesenteroides* B-512F

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
Sacarosa	40
Extracto de levadura	20
K_2HPO_4	20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
NaCl	0.01

IV.2 Obtención de los inóculos para cada resiembra

Los inóculos de cada fermentación partieron de la reactivación de un glicerol que contenía células sin haber sido resembradas anteriormente (10 mL del medio de cultivo a 30°C y con agitación a 100 r.p.m). De dicha reactivación se obtuvieron los glicerolos correspondientes a la resiembra 1. A partir de estos glicerolos se inocularon dos matraces, deteniendo la fermentación cuando, en cada uno de los matraces, el cultivo mostró entre 9.5 y 10 U de $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$, en ese momento se obtuvieron cinco glicerolos de cada matraz, los cuales corresponderían a las células de la resiembra número 2.

Sucesivamente se realizó este mismo procedimiento hasta llegar a la resiembra número 10.

IV.3 Cinética de crecimiento

Con la finalidad de caracterizar el crecimiento del microorganismo, se realizó una fermentación en lote, para lo cual se prepararon 50 mL de medio de cultivo, el cual se esterilizó en matraces de 250 mL para ser inoculado con 3 mL de las células almacenadas en glicerol. Se incubó a 30°C con agitación orbital a una velocidad de 200 r.p.m. Para determinar la cinética de crecimiento del microorganismo se determinó la turbidez del medio a 600nm (D.O._{600nm}), en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 3A UV/VIS. El aumento en la densidad óptica del medio se correlaciona directamente con el crecimiento del microorganismo.

IV.4 Análisis de enzimas GT de *L. mesenteroides* B-512F después de subcultivarlo

Una vez que las fermentaciones fueron detenidas y posterior a la obtención de los gliceroles de cada una de ellas, se separaron las células del sobrenadante por centrifugación a 17000xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante, de cada fermentación, conteniendo a las enzimas, se recuperó, se tomaron las muestras requeridas para la cuantificación de proteína total y al resto se le ajusto el pH adicionándole buffer de acetatos en una concentración final de 20 mM. Después de esto, el sobrenadante se separó en alícuotas de 1.5 mL que se almacenaron en congelación para su cuantificación posterior.

IV.5 Medición de actividad GT por aparición de reductores

La actividad glicosiltransferasa fue obtenida a partir de una fermentación en la que se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, separando las células del sobrenadante por centrifugación a 17000xg durante 15 min a 4°C, guardando la actividad extracelular y desechando la pastilla celular. La medición de la actividad glicosiltransferasa por aparición

de reductores se llevó a cabo en un medio de reacción cuya composición se muestra en la Tabla 4, el volumen final siempre fue de 10 mL.

Tabla 4. Composición del medio de reacción para medición de actividad glicosiltransferasa.

<i>Componente</i>	<i>Concentración final</i>
Buffer de acetatos pH 5.4	20 mM
Sacarosa	100 g/L
CaCl ₂	0.05 g/L
NaN ₃	1 g/L

La reacción se llevó a cabo al poner en contacto 5 mL de una solución de sacarosa (200g/L) al medio de reacción que contiene entre 500 μ L a 2000 μ L de sobrenadante según la cantidad de actividad enzimática presente. Los azúcares reductores liberados se determinaron por la técnica del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), reportada por Sumner y Howell, 1935.

Una unidad de actividad glicosiltransferasa (UGT) será definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de azúcar reductor por minuto a pH 5.4 y a 30°C, en una solución con 100 g/L de sacarosa, 0.05 g/L de CaCl₂ y 1 g/L NaN₃ en buffer de acetatos 0.02 M.

IV.6. Electroforesis y detección de actividad GT *in situ*

IV.6.1 Condiciones de electroforesis

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) fue realizada de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó una cámara Mini-PROTEAN® 3 Cell de BIO-RAD, a un voltaje constante de 75 V, con geles de acrilamida de 0.75 mm de

espesor. El gel concentrador se realizó al 4% y el de separación al 7% de poliacrilamida. Las muestras fueron mezcladas con solución de carga desnaturalizante (5x) que contenía Tris-HCl 0.3M, pH 6.8, SDS 0.05%, glicerol 50%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05%. La muestra en la solución de carga se calentó por 30 segundos. Para estimar el peso molecular de las bandas proteicas, se utilizaron estándares de alto rango de peso molecular para SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories).

IV.6.2 Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Posterior a la migración electroforética, se cortaron los carriles que se deseaba revelar por esta técnica. Una vez enjuagados con agua, se tiñeron durante 1 a 3 h o hasta alcanzar la coloración deseada, al incubar en una solución de ácido acético al 7% (v/v), metanol al 40% (v/v) y Azul de Coomassie R-250 al 0.025% (p/v). Posteriormente se efectuaron los lavados de los geles para eliminar el exceso del colorante con una solución de ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 10% (v/v).

IV.6.3 Detección de actividad GT *in situ*

Con la finalidad de eliminar el SDS y para recuperar el estado catalítico activo de las enzimas, el gel o los fragmentos correspondientes a un carril del gel, fueron lavados tres veces (20 min en baño de hielo y agitación) con una solución de Tritón X-100 al 0.1% (p/v). Posterior a esto los geles se incubaron en una solución de Tritón X-100 al 0.1% (p/v), NaN_3 1g/L, buffer de acetatos 20mM pH 5.4, sacarosa 100g/L, durante 20-24 h a 30°C y con agitación constante a 30 r.p.m. La aparición de bandas blancas correspondió a la síntesis de polímero por actividad glicosiltransferasa.

IV.6.4 Tinción con el reactivo de Schiff para revelar actividad GT *in situ*

Esta técnica se utilizó para teñir los geles de actividad *in situ*, por ser una técnica sumamente sensible, de esta forma se logró detectar de manera fácil y rápida los enlaces

glucosídicos de los carbohidratos y se evidenciaron todas las bandas productoras de polímero en el gel con una coloración rosada, sin importar lo sutiles que fueran.

Después de precipitar todo el polímero existente en los geles con etanol al 50% (30min), se sumergieron por otra hora en una solución de ácido periódico al 0.7% (p/v) y ácido acético al 5% (v/v). A este paso le siguieron tres lavados por 20 min cada uno de una solución de ácido acético al 15% (v/v). Posteriormente fueron teñidos, con el reactivo de Schiff (SIGMA), diluido 1:3 con H₂O, hasta alcanzar la coloración deseada, aproximadamente 1 h, en oscuridad, agitación y a temperatura ambiente. Al término de la coloración, se realizaron de 3 a 4 lavados con una solución de ácido acético-isopropanol-agua (10:25:65), hasta retirar del gel la mayor cantidad de color de fondo posible.

IV.7 Ensayos de inhibición con acetato de zinc y E.D.T.A.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, se eligieron dos inhibidores de la actividad DS: acetato de zinc y del E.D.T.A. El efecto de tales inhibidores se evaluó cualitativamente por el análisis de actividad *in situ* SDS-PAGE y cuantitativamente evaluando la actividad residual en ensayos en líquido.

IV.7.1 Efecto de los inhibidores por análisis de actividad *in situ*

Se realizó una electroforesis, en la cual se cargó la misma cantidad de muestra, obtenida a partir de una fermentación. Una vez realizada ésta, cada gel se dividió, dependiendo del número de condiciones a probar y se incubaron en una solución que contenían la concentración del inhibidor a evaluar; además de NaN₃ 1g/L, Buffer de acetatos 20mM pH 5.4, sacarosa 100g/L y Triton X-100 0.1% (p/v). Los geles control fueron incubados en presencia de CaCl₂ 0.05g/L en lugar del inhibidor.

Los geles fueron incubados en sendas soluciones por un periodo de 48 horas a temperatura ambiente y con agitación (35 rpm), para posteriormente revelar la actividad glicosiltransferasa no inhibida por la técnica de detección GT *in situ*.

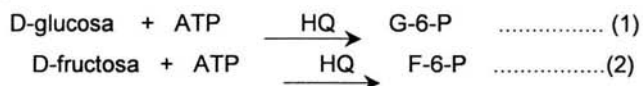
IV.7.2 Cuantificación de la actividad GT en presencia del inhibidor, ensayo en líquido.

Bajo las mismas condiciones de reacción antes descritas para la de determinación de actividad GT por aparición de reductores (sección IV.5), se evaluó esta actividad en presencia del inhibidor, sólo que en estos ensayos se sustituye el CaCl_2 por la concentración de inhibidor a evaluar. La formación de un precipitado blanco en el medio de reacción en el momento de adicionar el acetato de zinc, provoca interferencias en la cuantificación de actividad, por lo cual se estableció que para realizar la cuantificación de actividad GT en presencia de acetato de zinc, debe de realizarse una centrifugación (18500xg, 15 min, 4°C) para poder obtener el medio de reacción libre del precipitado, posterior a esto la cuantificación de actividad enzimática por liberación de azúcares reductores se lleva a cabo en las mismas condiciones señaladas.

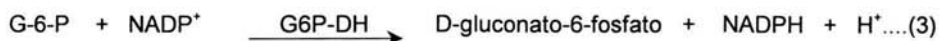
IV.8 Cuantificación enzimática de glucosa y fructosa

Se utilizó un Kit Enzimático (D-glucose/D-fructose UV method, con número de catálogo 139106, de la marca BOEHRINGER MANNHEIM) para la cuantificación de glucosa y fructosa, producto de la reacción catalizada por la LS y DS respectivamente.

El principio del Kit Enzimático es el siguiente; la D-glucosa y la D-fructosa son fosforiladas por la enzima hexoquinasa (HQ) en presencia de ATP (adenosina de trifosfato), dando como productos de la reacción la D-glucosa-6-fosfato (G-6-P) y D-fructosa-6-fosfato (F-6-P), con la simultánea formación de adenosina-5-difosfato (ADP), reacciones 1 y 2.

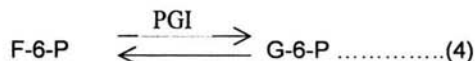


En presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) y NADP como agente oxidante (nicotinamida-adenina di nucleótido fosfato) la G-6-P es oxidada a D-gluconato-6-fosfato con la simultánea formación de NADPH, reacción 3.



La cantidad de NADPH formado en la reacción es estequiométricamente equivalente (1:1) a la formación de glucosa. El NADPH es detectado a una λ de 340nm en el espectrofotómetro, de esta forma la absorbancia leída esta relacionada con la concentración de glucosa presente en la muestra, de acuerdo con la ecuación A.

Finalmente la cuantificación de D-fructosa se logra cuando al mismo medio de reacción se añade la enzima fosfoglucosa-isomerasa (PGI), convirtiendo a la F-6-P a G-6-P, reacción 4.



La G-6-P formada es nuevamente convertida a D-gluonato-6-fosfato con la simultánea reducción de NADP⁺ a NADPH, aumentando nuevamente la lectura de la absorbancia, de tal forma que este incremento está directamente relacionado con la concentración de D-fructosa presente en la muestra, cuyo valor se obtiene a partir de la ecuación B.

Ecuaciones:

$$A. [D\text{-glucosa}] \text{ g/L} = (V \times PM) \times \Delta A_{D\text{-glucosa}} / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

$$B. [D\text{-fructosa}] \text{ g/L} = (V \times PM) \times \Delta A_{D\text{-fructosa}} / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

Donde:

V = volumen final (mL)

v = volumen de la muestra (mL)

PM = Peso Molecular de la molécula a analizar (Glucosa o fructosa) (g/mol)

d = longitud de paso de la celda

ϵ = valor del coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm (6.3)

Una unidad de actividad dextransacarasa (UDS) será definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de fructosa por minuto a pH 5.4 y a 30°C, en una solución con 100 g/L de sacarosa, 0.05 g/L de CaCl₂ y 1 g/L de NaN₃ en buffer de acetatos 0.02 M.

Una unidad de actividad levansacarasa (ULS) será definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de glucosa por minuto a pH 5.4 y a 30°C, en una solución con 100 g/L de sacarosa y 1 g/L de NaN₃ en buffer de acetatos 0.02 M.

IV.9 Cuantificación de proteína

La determinación de la concentración de proteínas totales del cultivo se realizó añadiendo por cada volumen de muestra un volumen solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v), posterior a esto, se congeló la mezcla por 24h. Al finalizar este tiempo se descongelaron las muestras y se centrifugaron a 9000 g, 10 min a 4°C, se recuperó la pastilla que contenía las proteínas precipitadas por el TCA, se desechó el sobrenadante, y se procedió a resuspender dicha pastilla en una solución de NaOH 0.1 N en el mismo volumen original de la muestra. Por último se procedió a realizar las diluciones necesarias para la determinación de proteína por el método de Lowry modificado (Peterson G.L., 1997), empleando como estándar albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA). La concentración de la curva estándar osciló entre 10-100 µg/mL de proteína.

IV.10 Ensayos proteolíticos

IV.10.1 Ensayos de proteólisis limitada sobre la actividad GT

Se utilizó el sobrenadante de la resiembra 1, ajustando el pH a 7 con una solución de NaOH 0.8 N, se incubaron a 30°C en baño de agua por tiempos variados, la reacción se detuvo añadiendo al medio solución se carga desnaturante (5x). Posterior a esto las muestra se aplicaron en paralelo en geles desnaturantes de poliacrilamida en las condiciones de electroforesis antes mencionadas. Posterior a la electroforesis se realizó el análisis del efecto de la proteólisis por análisis de actividad *in situ*, revelando esta actividad por la tinción con el reactivo de Schiff, sección IV.6.2 y IV.6.3 respectivamente.

IV.10.2 Efecto del pH, NaN₃ y acetato de zinc sobre la proteólisis de la actividad GT

Se utilizó sobrenadante de la resiembra número 1, a una alícuota se ajustó el pH a 7 y otra a pH 7.5 con solución de NaOH 0.8 N. El efecto del acetato de zinc y la NaN₃ fue determinado adicionando estas sales a muestras de sobrenadantes de la siguiente manera: una muestra con NaN₃ 10 g/L, una segunda muestra con acetato de zinc 30mM y por último una muestra con ambas sales en las misma concentración. Se incubó dichos

sobrenadantes a 30°C en baño de agua por tiempos variados, la reacción se detuvo con solución de carga desnaturizante (5x). El efecto del pH, NaN₃ y acetato de zinc se evidenció por medio del análisis de actividad *in situ*.

IV.10.3 Evolución de la proteólisis sobre la actividad GT al subcultivar

Se utilizaron los mismos sobrenadantes para la producción de las enzimas GT de *L. mesenteroides* B-512F al subcultivar. En todos los sobrenadantes se ajustó el pH a 7.5 con solución de NaOH 0.8 N, se incubaron a tiempos variados en baño de agua a 30°C, deteniendo la reacción con solución de carga desnaturizante (5x), evidenciando la evolución de la proteólisis por medio del análisis de actividad *in situ*.

V Resultados y discusión

V.1 Cinética de fermentación de *L. mesenteroides* B-512F

Con la finalidad de establecer el tiempo de cultivo en el que se encuentra el máximo de actividad GT, y así mantener las mismas condiciones en los cultivos posteriores, fue necesario caracterizar la cinética de crecimiento y la producción de la actividad total GT. Para lo cual, la cepa de *L. mesenteroides* se cultivo en las condiciones señaladas previamente. Se tomaron alícuotas por triplicado en intervalos de 30 a 60 minutos, dependiendo de la velocidad de crecimiento, para la evaluación de biomasa y para la cuantificación de la actividad GT por aparición de reductores. Los resultados se muestran en la Figura 4.

La actividad dextransacarasa en una fermentación de *L. mesenteroides* B-512F está asociada a su crecimiento, obteniéndose un máximo de actividad al final de la fase exponencial para posteriormente presentar una caída después de ese punto (Quirasco, 2000). Este comportamiento podría explicarse por dos efectos, el primero de ellos, a la actividad proteolítica producida por esta cepa, ya que el procesamiento proteolítico que sufre la DS ocasiona que ésta actividad disminuya después del final de la fase exponencial de crecimiento. Y por otro lado, el descenso del pH puede modificar del tal forma la estructura de la DS que ésta pierde su capacidad catalítica, aun cuando el pH nuevamente se ajuste al óptimo de la DS ésta no regresa a su estructura original.

Los resultados obtenidos corroboran el comportamiento en la producción de la actividad GT en una fermentación por lote en matraz. Se observó un incremento progresivo de la actividad GT hasta alcanzar un máximo para posteriormente presentarse una caída de actividad. De acuerdo con estos resultados se estableció que a una D.O. entre 9.5 y 10 es el punto en el que se detendrán todas las fermentaciones posteriores, esto con la finalidad de obtener el máximo de actividad GT en cada fermentación.

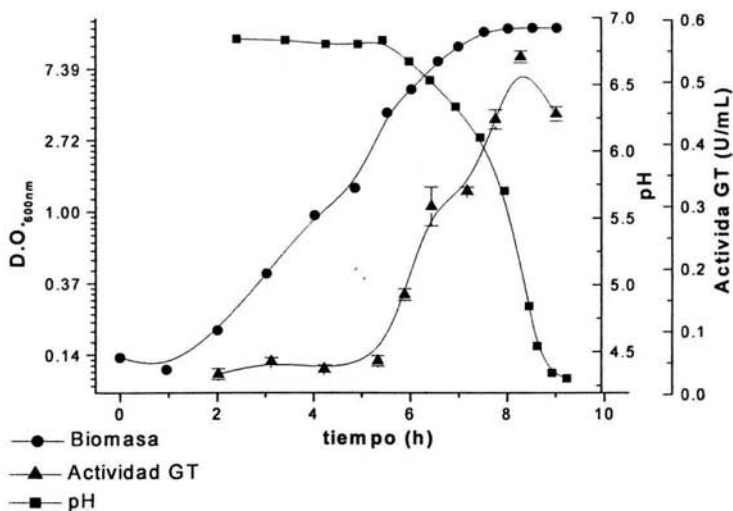


Figura 4. Cinética de crecimiento y producción de actividad glicosiltransferasa de *L. mesenteroides* B-512F. Cultivo en condiciones habituales de producción de DS (30°C, agitación orbital 200 rpm y 117 mM de sacarosa).

V.2 Desarrollo de una técnica para la determinación selectiva de una de las actividades GT

Una de las técnicas utilizadas para medir la actividad DS es por medio de la cuantificación total de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática. Sin embargo, esta técnica no permite diferenciar los azúcares reductores producidos. Si *L. mesenteroides* B-512F también produce LS (Miller, 1986^a y Quirasco, 2000) la cual actúa con el mismo sustrato que la DS (sacarosa), y libera también al medio de reacción un azúcar reductor (fructosa), entonces en una determinación habitual de actividad DS, a partir de extractos crudos de la cepa B-512F, se producirán ambos azúcares reductores: glucosa y fructosa. Como resultado de esto ambos azúcares serán determinados simultáneamente por el

método de cuantificación de reductores, sobreestimando así, la actividad DS producida (Figura 5).

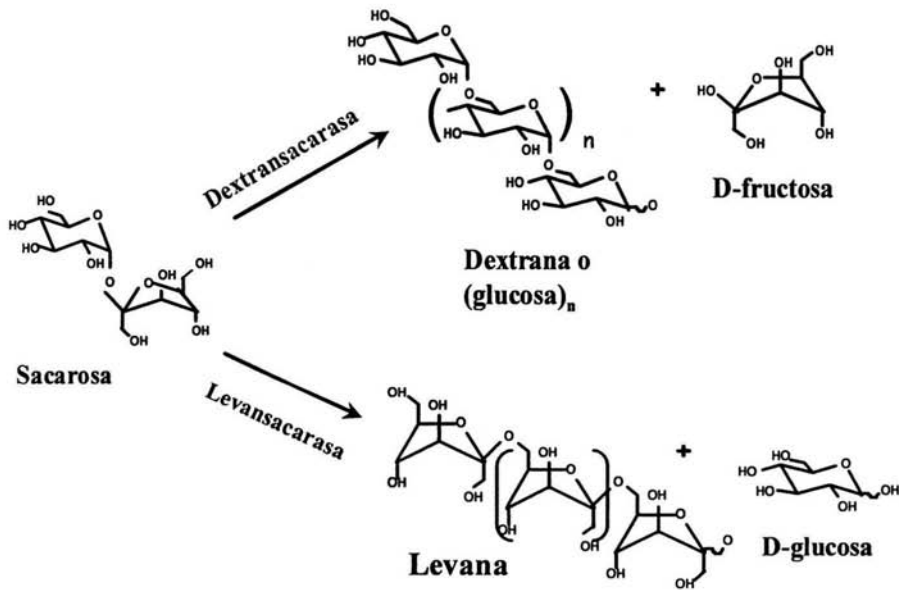


Figura 5. Reacciones catalizadas por la DS y LS. Ambas enzimas son producidas por *L. mesenteroides* B-512F.

Como es de nuestro interés conocer la evolución de cada una de las actividades por separado al subcultivar, es necesario desarrollar una técnica por medio de la cual se pueda determinar selectivamente la actividad de una de estas dos enzimas (DS y LS) mediante el método de cuantificación de azúcares reductores.

V.2.1 Efecto cualitativo de los inhibidores sobre la actividad GT

La finalidad de esta parte de la investigación fue determinar las condiciones (naturaleza, concentración) de un inhibidor para cuantificar selectivamente las actividades GT producidas por *L. mesenteroides* B-512F. Se ha reportado que cationes divalentes como el Zn^{2+} , así como el EDTA (etilen diamino tetrametil acético) provocan una inhibición en la actividad DS (Miller, 1986^c), sin que se tenga reporte de que alguno de ellos efectúe algún tipo de inhibición sobre la actividad LS. Dichos compuestos fueron seleccionados por ser éstos de uso común y de bajo costo, en comparación con otros compuestos, de mayor costo, que también se han reportado como inhibidores de la actividad DS, como el ácido D-glucurónico, por citar algún ejemplo. Por esta razón se realizaron varios ensayos de inhibición con diferentes concentraciones de estos dos inhibidores para establecer cuál era el ideal para obtener una inhibición de la DS sin que se viera afectada la actividad LS.

V.2.1.1 Efecto del EDTA sobre la actividad GT

En la Figura 6 se muestran los resultados para el efecto del EDTA en la actividad GT, la cual se evaluó por medio de actividad in situ en SDS-PAGE. En dicha figura se puede apreciar que existe una disminución en la formación del polímero correspondiente a las bandas de actividad DS (170 y 155 kDa*) al aumentar la concentración de EDTA, pero al mismo tiempo también se ve disminuida la formación del polímero en las bandas correspondientes a la actividad LS (116 y 97 kDa*). Los resultados muestran que el EDTA no es un inhibidor selectivo de alguna de las actividades GT, por lo que no pudo ser utilizado para los fines planteados.

* La relación entre las bandas con formación de polímero y la actividad enzimática correspondiente (DS o LS) se realizó con base en la literatura (Millier, 1986^a y Quirasco 2000).

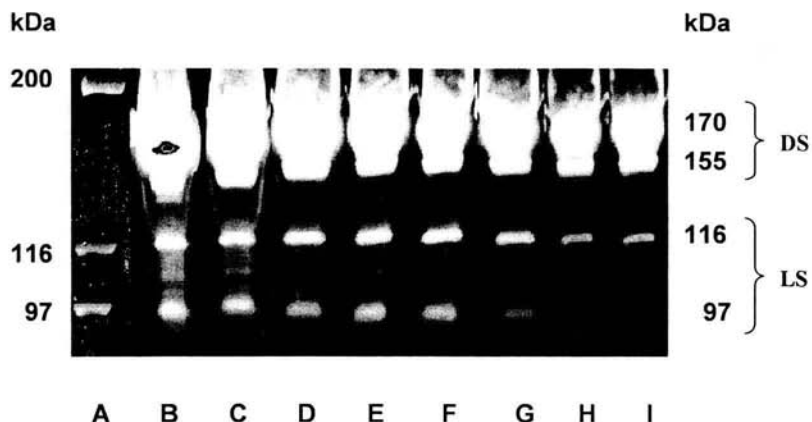


Figura 6. Geles de inhibición de la actividad DS y LS con EDTA. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente, por 48 h, en presencia de NaN_3 1g/L, buffer de acetatos 20Mm pH 5.4, sacarosa 100g/L y Triton X-100 0.1% (p/v). Se aplicaron 10 μl de solución de enzima con 0.54 U/mL. El gel control fue incubado en presencia de CaCl_2 0.05g/L en lugar del inhibidor. Carril A Marcador de peso molecular, B control. C a I con EDTA 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 15mM, respectivamente.

V.2.1.2 Efecto del acetato de zinc sobre la actividad GT

Los geles obtenidos de los ensayos de inhibición con acetato de zinc se presentan en la Figura 7, en los cuales se observa que a medida que aumenta la concentración de este compuesto el polímero formado en las bandas correspondientes a la actividad DS disminuye hasta el punto de inhibir toda actividad. Mientras que el polímero formado correspondiente a las bandas de actividad LS se observa en todas las condiciones probadas, aunque se detecta una ligera disminución en la intensidad de la producción a una concentración de 3 y 5 mM de acetato de Zn, la actividad DS desaparece prácticamente en comparación con la actividad control. Estos resultados indican, de manera cualitativa, que el acetato de zinc es un inhibidor que puede servir para medir selectivamente la actividad LS, por lo que se procedió a hacer la determinación cuantitativa de este efecto.

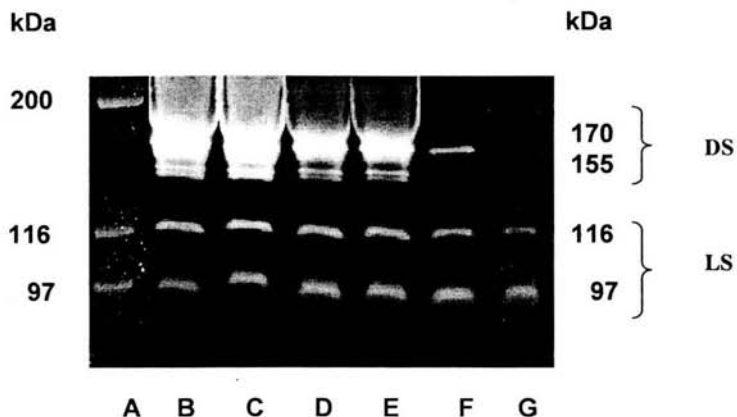


Figura 7. Geles de inhibición de la actividad DS y LS con acetato de zinc. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente, por 48 h, en presencia de NaN_3 1g/L, buffer de acetatos 20 mM pH 5.4, sacarosa 100g/L y Triton X-100 0.1% (p/v). Se aplicaron 10 μl de solución de enzima con 0.54 U/mL. El gel control fue incubado en presencia de CaCl_2 0.05g/L en lugar del inhibidor. Carril A Marcador de peso molecular, B control, C a G con acetato de Zn: 0.1, 0.5, 1, 3 y 5 mM respectivamente.

V.2.2 Evaluación cuantitativa del efecto del acetato de zinc sobre la actividad GT

La evaluación cualitativa del efecto de inhibidores demostró que el acetato de zinc puede utilizarse para el fin planteado, por lo que se procedió a evaluar cuantitativamente el efecto de este compuesto en las condiciones de reacción habituales para la evaluación de actividad GT por aparición de reductores, sólo que en este caso el CaCl_2 fue reemplazado por acetato de zinc. Las concentraciones de inhibidor evaluadas no son las mismas que en los ensayos cualitativos, debido a que los volúmenes de muestra son diferentes a los de un ensayo de actividad *in situ*, lo cual implica que la cantidad de enzima presente con actividad GT no sea la misma y por lo tanto se requiera de mayores concentraciones de este compuesto para producir un efecto inhibitorio. En la Figura 8 se observa de manera cuantitativa que la actividad GT disminuye al aumentar la concentración de acetato de zinc.

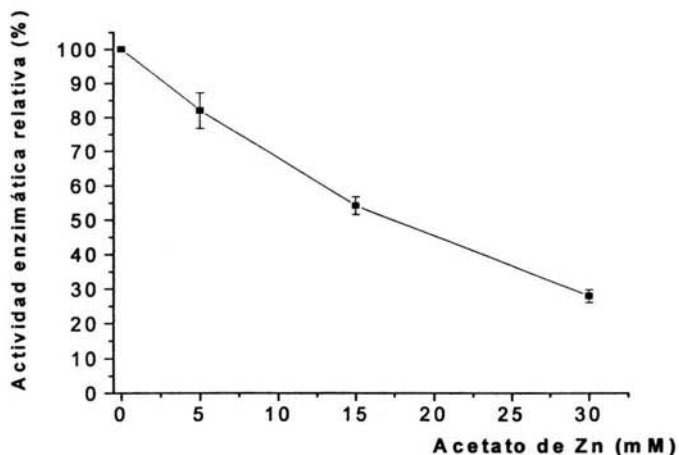


Figura 8. Efecto de la concentración de acetato de zinc sobre la actividad GT de *L. mesenteroides* B-512F. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C, buffer de acetatos 20 mM pH 5.4, sacarosa 100 g/L. La actividad control (0 mM de Acetato de Zn) se llevó a cabo en presencia de 0.05 g/L de CaCl₂.

Al realizar el ensayo anterior se observó que la adición de acetato de zinc al medio de reacción produce la aparición de un precipitado blanco, cuya cantidad es proporcional a la concentración de inhibidor. Dicho precipitado dificulta la medición de la actividad por aparición de reductores ya que imparte cierta turbidez que interfiere con la determinación de la absorbancia a 450nm, por el cual se procedió a modificar la técnica al realizar una centrifugación previa a la incubación con el sustrato (materiales y métodos IV.5.2), con la finalidad de eliminar tal precipitado. Al desconocer la naturaleza del precipitado formado, surgió la hipótesis de que éste pudiera contener parte de las enzimas con actividad GT, dando como consecuencia que la medición de dicha actividad sea subestimada. Para analizar esta situación, se llevó a cabo un análisis de actividad *in situ* a partir del medio de reacción tratado con diferentes concentraciones de inhibidor, después de que el precipitado fue eliminado por centrifugación. Cabe señalar que el análisis de actividad *in situ* se realizó bajo condiciones estándar, es decir, en presencia de Ca²⁺ y no con Zn²⁺. De esta manera si hubiese una pérdida de enzimas con actividad GT, proporcional a la cantidad de precipitado formado, el análisis reflejaría este resultado mediante la disminución en la formación de polímero de acuerdo a la pérdida de tales enzimas.

Los resultados del análisis se muestran en la Figura 9, en la que se puede observar que el polímero formado en las bandas correspondientes a la actividad DS y LS no disminuye con respecto a las bandas del carril control en el que no se adicionó inhibidor al medio de reacción. Con base en los resultados se concluye que no hay una pérdida de actividad GT cuando el Zn^{2+} es retirado del medio de reacción. La inhibición es reversible, esto es, ocurre solo en presencia del acetato de zinc, y al retirarlo, la actividad GT puede regresar a su estado original. La formación del precipitado pudiera deberse a la formación de una sal de baja solubilidad, $Zn_3(PO_4)_2$, que al sobrepasar su límite de solubilidad en solución provoca la precipitación de ésta. Sin embargo, hasta no realizar algún estudio encaminado a saber a composición de tal precipitado, no puede ampliarse mucho la discusión al respecto.

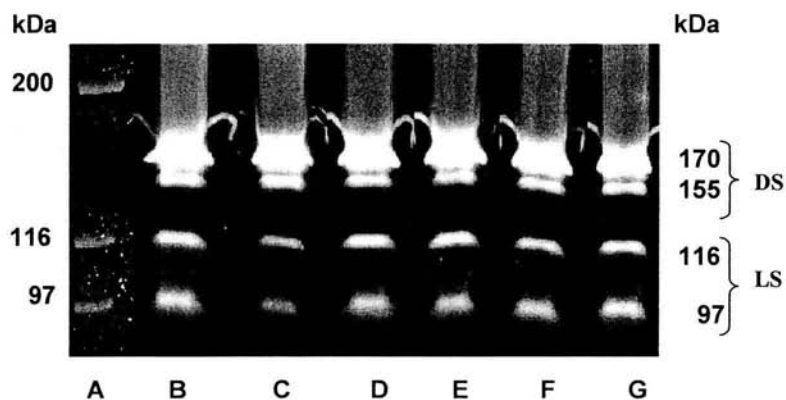


Figura 9. Análisis de actividad *in situ* a partir del medio de reacción después de haber retirado el precipitado formado. Carril A Marcador de peso molecular, B control (medio de reacción sin adición de inhibidor), C a G muestras obtenidas a partir del medio de reacción con 15, 10, 8, 5 y 3 mM de acetato de zinc, respectivamente.

V.2.3 Cuantificación enzimática de glucosa y fructosa producidos por la actividad GT en presencia del inhibidor

Una vez que se encontró de manera cuantitativa que la actividad GT sí disminuye al adicionar acetato de zinc al medio de reacción, para comprobar el grado de inhibición de cada GT, se determinaron las concentraciones de glucosa y fructosa por medio de un Kit enzimático D-Glucosa/D-Fructosa (Boehringer Mannheim®) producidas durante los primeros 30min de la reacción a 25, 30 y 35 mM de acetato de zinc. Dichos resultados, se presentan en la Figura 10 donde se observa que a partir de una concentración de 30 mM de acetato de zinc se logra disminuir sustancialmente la actividad DS. Se considera que la reacción llevada a cabo en presencia de 30 mM de acetato de zinc es la más conveniente para alcanzar el objetivo planteado, ya que a esa concentración se mantiene el 67% de la actividad LS, mientras que la actividad DS se ve inhibida en un 77%. La concentración de 35 mM disminuye demasiado la producción de reductores, lo que implica problemas a nivel experimental en su determinación por el método de DNS, por lo que no es conveniente.

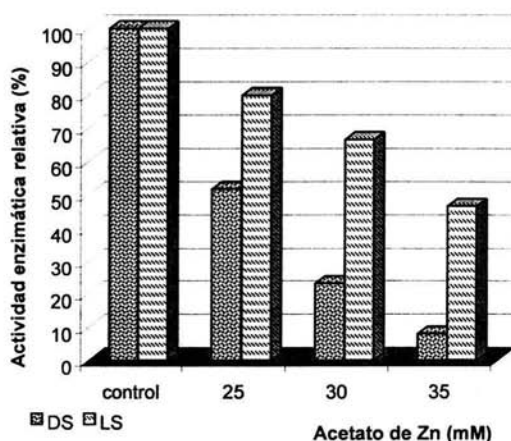


Figura 10. Análisis de actividad GT a diferentes concentraciones de inhibidor. Análisis realizado por medio de la cuantificación de glucosa y fructosa liberados durante la reacción (Kit enzimático).

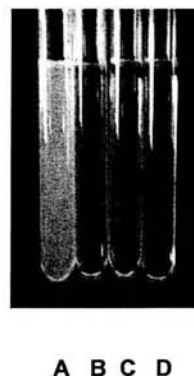


Figura 11. Formación de polímero a las 24 h de incubación a temperatura ambiente. A control. B 30mM. C 25mM. D 35mM Acetato de Zinc.

En la Figura 11 se observa la disminución en la producción de polímero al llevar a cabo la reacción en presencia de las diferentes concentraciones de inhibidor. Estos resultados indican que, para el caso de esta cepa en específico, la proporción DS:LS es 65:35 aproximadamente, lo cual indicaría que la actividad LS no es tan despreciable con respecto a la actividad DS. Sin embargo la DS al poseer también actividad invertasa (Monchois, 1999) al igual que la actividad LS (López-Munguía, 2004) haría que ambas actividades se estuvieran sobreestimando cuando la actividad de ambas enzimas se cuantifica únicamente por medio de la medición de la glucosa y la fructosa liberada, ya que de esta forma no se puede hacer diferencia entre la actividad tranferasa y la actividad hidrolítica que poseen ambas.

V.3 Producción y caracterización de la actividad glicosiltransferasa al subcultivar a *L. mesenteroides* B-512F

La experiencia de diversos grupos que trabajan con la cepa de *L. mesenteroides* B-512F indica que al resembrar esta cepa la producción en la actividad DS varía (Quirasco, 2000, Sánchez, 2000 y Del Moral, 2003). Con el objeto de estudiar esta variación, dentro del grupo de trabajo se estudió el cambio de la actividad DS al resembrar la cepa (Chacón, 2004), dicho estudio atribuyó los resultados únicamente a la actividad DS por ser ésta la que se produce en mayor cantidad en una fermentación. Sin embargo, se ha observado que al término de varias resiembras la actividad DS no es la predominante (López-Munguía, 2002). De esta forma el siguiente objetivo de nuestro estudio fue evaluar la actividad DS y LS durante varias resiembras, mediante la técnica desarrollada para la medición selectiva de una de las actividades GT.

V.3.1 Evolución de la actividad GT y GT con inhibidor al subcultivar a *L. mesenteroides* B-512F

Con base en los resultados obtenidos en la fase experimental previa, se determinaron las condiciones óptimas para los ensayos de medición selectiva de una de las actividades GT, las cuales son: buffer de acetatos 20 mM pH 5.4, sacarosa 100 g/L, 30 mM de acetato de zinc y 1.5 mL de muestra de sobrenadante a 30°C.

Se realizaron 10 fermentaciones sucesivas por duplicado (Materiales y métodos IV.2 y IV.4), las cuales se detuvieron cuando el cultivo presentó una D.O._{600nm} entre 9.5 y 10. Para cada resiembra se determinó, por triplicado en cada matraz, la actividad GT total y con igual número de repeticiones se determinó la actividad GT en presencia de acetato de zinc (Materiales y métodos IV.7.2) con la finalidad de establecer, posteriormente, la actividad DS y LS producidas al resembrar la cepa. Además se cuantificó, por sextuplicado en cada matraz, la concentración de proteína total y la proteína soluble del sobrenadante libre de células.

En la Figura 12 se muestra la evolución de la actividad GT y la actividad GT cuantificada en presencia del inhibidor, al subcultivar el microorganismo. Estos resultados corroboraron que la actividad GT producida por esta cepa es variable cuando es resembrada en cultivos por lote en matraz (Chacón, 2004). En cuanto a la actividad GT en presencia del inhibidor, la cual adjudicamos con un alto porcentaje a la LS, mostró que también presenta variabilidad significativa al resembrar esta cepa.

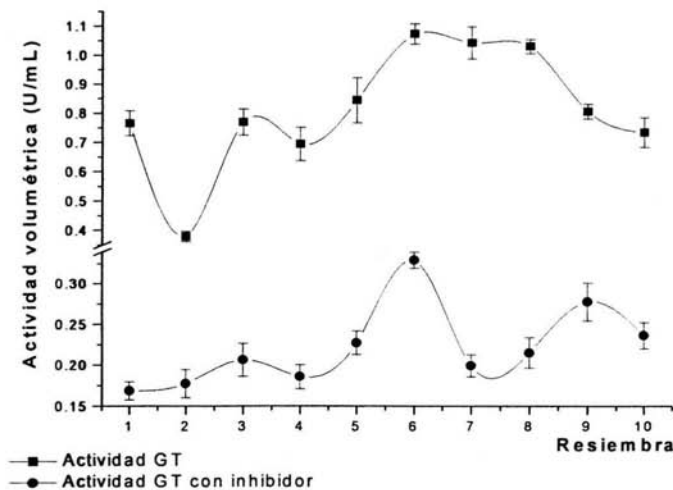


Figura 12. Evolución de la actividad GT y GT con inhibidor al subcultivar la cepa de *L. mesenteroides* B-512F. La actividad se midió cuando el cultivo presentó una D.O._{600nm} entre 9.5 y 10.

Cabe señalar que durante las diez fermentaciones realizadas, el cultivo presentó diferencias visuales en cuanto al color que observaba en las primeras resiembras, estos cambios dejan abierta la posibilidad de suponer que la causa de los mismos, sea por que el polímero sintetizado al transcurso de las resiembras también se vea modificado en su estructura.

De acuerdo al análisis de resultados con el paquete estadístico (*Statistics Program Social Science*, SPSS versión 8.0), se encontró que no hay diferencia significativa ($p= 95\%$) entre repeticiones pero que sí existe una variabilidad de la actividad GT y la actividad GT en presencia de inhibidor entre resiembras (Anexo I*). Además se observó que la tendencia en la variabilidad de estas actividades no es la misma, la disminución de la actividad GT no siempre es acorde con la disminución de la actividad GT en presencia de inhibidor y viceversa. Este hecho hace suponer que la actividad LS es totalmente independiente de la producción de la actividad DS y por lo tanto dichas enzimas no siguen la misma evolución en su producción cuando la cepa es resembrada.

Se observa que en la resiembra 2 la actividad GT es significativamente más baja con respecto a las demás y que las resiembras 6, 7 y 8 forman un grupo de actividad significativamente mayor. Respecto a la actividad GT con inhibidor, sobresalen las resiembras 6 y 9 con una actividad significativamente mayor.

Por otro lado, la cuantificación de la concentración de proteína total (Figura 13) sirvió para obtener la actividad específica en cada resiembra. Cabe mencionar que la concentración de proteína total y la concentración de proteína presente en el sobrenadante también muestra una variabilidad entre resiembras (Anexo II*). Es interesante hacer notar que la cantidad de proteína soluble total por resiembra en algunos casos es muy alta, lo que provocó en gran medida la disminución en la actividad específica.

*La comparación de los datos experimentales de cada ensayo se realizó por un análisis de varianza (ANOVA); el nivel de significancia se obtuvo de acuerdo a la prueba de Fisher y para comparar la actividad enzimática entre resiembras de cada condición se realizó la prueba de rango múltiple de DUNCAN.

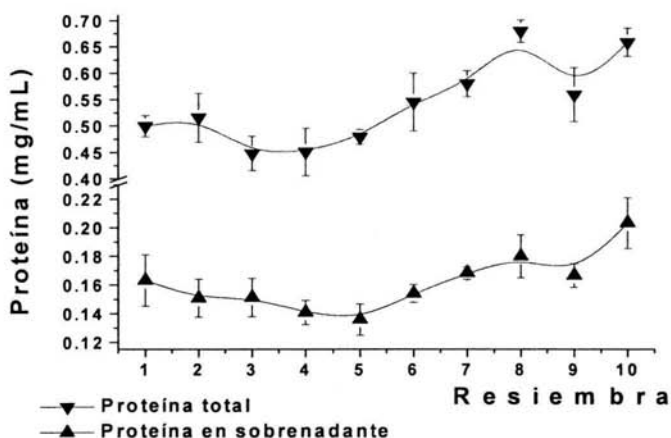


Figura 13. Proteína total y proteína en sobrenadante perteneciente a cada resiembra. La concentración de proteína fue analizada mediante la Técnica de Lowry modificado.

V.3.2 Evolución de la actividad DS y LS

La Figura 14 presenta la evolución de la actividad específica DS y LS al subcultivar la cepa. Dichos datos se obtuvieron a partir de los datos anteriormente expuestos, para cada resiembra se consideró que la actividad GT cuantificada en presencia del inhibidor corresponde a la actividad LS, mientras que la actividad DS se obtuvo por diferencia entre la actividad GT total y la actividad GT inhibida.

Al analizar los resultados, resalta que en la resiembra 2 la actividad de ambas enzimas es muy parecida, la actividad DS disminuye drásticamente. Mientras que en las resiembras 5, 6 y 7 son las que presentan mayor actividad DS. De esta forma los señalamientos en el sentido de que al resembrar esta cepa la actividad DS varía, quedan de manifiesto en estos resultados. La cepa B-512F presenta variabilidad en la producción de actividad DS, en algunas ocasiones se presenta una disminución tal de actividad que llega a estar al mismo nivel que la LS.

En la misma figura aparecen los resultados obtenidos a partir de la cuantificación enzimática de azúcares reductores (Materiales y métodos IV.8) para determinar la actividad LS y DS. Se analizaron los mismos sobrenadantes utilizados para la cuantificación de la actividad GT y GT inhibida por aparición de reductores de algunas resiembras. Dichos valores validan de manera general la metodología empleada, por lo cual podemos decir que la técnica propuesta es adecuada y los resultados son confiables.

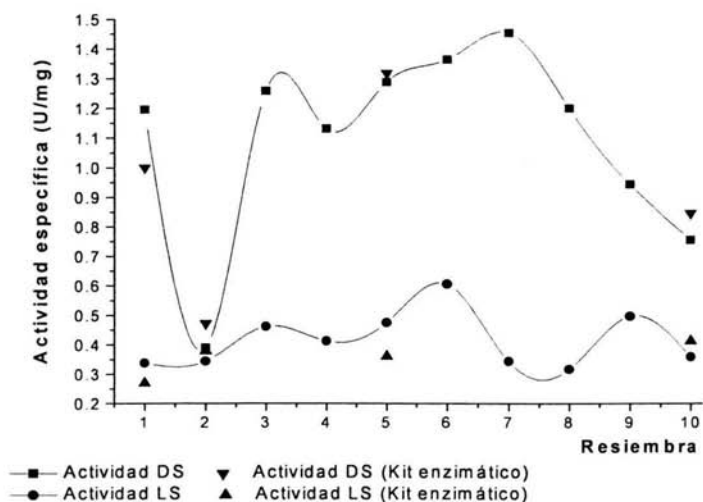


Figura 14. Actividad específica DS y LS al subcultivar a *L. mesenteroides* B-512F.

V.3.3 Caracterización electroforética de la actividad GT

Con el objetivo de saber si el fenómeno de variabilidad de la actividad GT podría ser observado en un análisis electroforético, además de conocer el perfil y patrón de las enzimas que poseían actividad GT presentes en las preparaciones enzimáticas descritas con anterioridad, se llevó a cabo un análisis de actividad *in situ* de los sobrenadantes de cada una de las diez resiembras.

La Figura 15 muestra el análisis electroforético de la producción de polímero *in situ* con tinción de Schiff correspondientes a las diez fermentaciones. En todos los carriles se ajustó la concentración de proteína a 1 μ g de proteína por pozo para evidenciar el efecto de variabilidad enzimática.

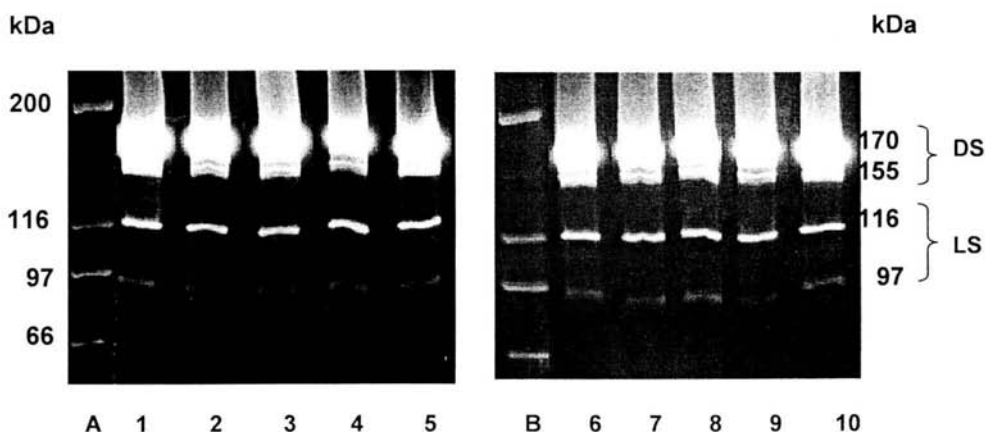


Figura 15. Perfil electroforético de proteínas con actividad glicosiltransferasa pertenecientes a cada resiembra. Gel de actividad SDS-PAGE. Cada pozo contiene 1 μ g de proteína de sobrenadante. Carril A y B Marcadores de peso molecular. Carriles 1-10 producción de polímero *in situ* a partir del sobrenadante de cada resiembra.

Aparentemente todas las bandas de la Figura 15 presentan una actividad similar. Sin embargo, la observación del gel permite apreciar una diferencia en lo que respecta al grosor del polímero producido, sobre todo en el caso de la banda de DS de 170 kDa. Esto es debido a que la formación de polímero genera un crecimiento en ambas caras del gel que la imagen en dos dimensiones no permite apreciar.

De igual manera la Figura 16 presenta el análisis de actividad de las diez resiembras, sólo que en este caso se ajustó a un volumen constante de 10 μ L de muestra de sobrenadante por pozo. Como resultado se presentó el mismo comportamiento del gel antes descrito.

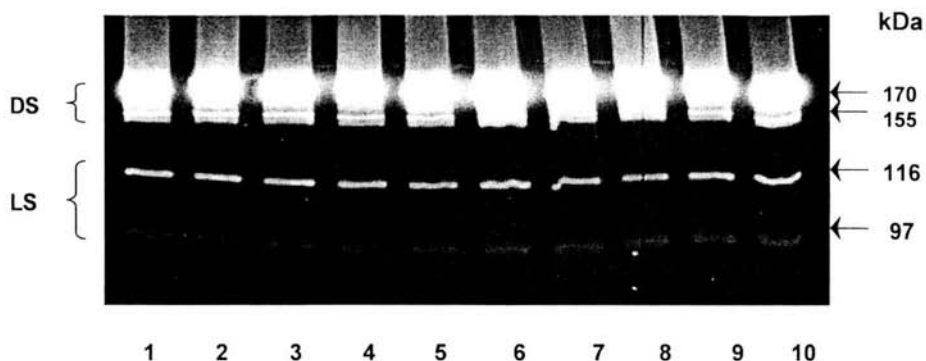


Figura 16. Perfil electroforético de proteínas con actividad glicosiltransferasa pertenecientes a cada resiembra. Gel de actividad SDS-PAGE. Cada pozo contiene 10 μ L de muestra. Carril A y B Marcadores de peso molecular. Carriles 1-10 producción de polímero *in situ* a partir del sobrenadante de cada resiembra.

Estos resultados coinciden con lo reportado previamente (Chacón, 2004). Los resultados de este ensayo son más bien cualitativos, por lo que no reflejan los cambios que sí fueron apreciables cuando se determinaron velocidades iniciales, por ejemplo en las resiembras dos y siete.

Finalmente, con la figura anterior podemos señalar que la variación de la actividad DS y LS al subcultivar a *L. mesenteroides* B-512F no puede ser por efecto de la actividad proteolítica producida por esta cepa, dado que no existe una disminución de las especies activas que se producen en cada resiembra, es decir, las formas principales de la DS y LS permanecen constantes con el transcurso de todas las resiembras y no se observa la aparición de formas activas de menor peso molecular.

V.4 Actividad proteolítica: Proteólisis de la actividad GT en *Leuconostoc mesenteroides* B-512F al subcultivar

Dado que los resultados anteriores, constituyen indicios de que la actividad extracelular producida por *L. mesenteroides* B-512F al subcultivar es variable, se planteó la hipótesis de que la actividad proteolítica producida por esta cepa también pudiese presentar dicho comportamiento. Por lo cual se decidió evaluar la actividad proteolítica en esta cepa de manera indirecta, mediante de la proteólisis de la actividad GT, esperando que el grado de degradación de ambas enzimas (DS y LS) reflejara el aumento o disminución de esta actividad entre resiembras.

V.4.1 Proteólisis limitada de la actividad GT

Muestras de sobrenadante se sometieron a hidrólisis proteolítica endógena por diferentes tiempos. El sobrenadante se neutralizó (Materiales y métodos IV.10.1), de tal manera que se alcanzara un pH cercano al óptimo reportado para esta actividad (Sánchez, 2000).

Los resultados de dicho ensayo se muestran en la Figura 17, donde se corrobora la degradación de la DS por efecto de un procesamiento proteolítico durante el almacenamiento a pH neutro. Dicha degradación muestra que la actividad proteolítica es en sitios específicos, ya que siempre se obtienen las bandas del mismo tamaño. Estos resultados muestran que la proteólisis, favorecida a pH neutro, produce dos bandas activas de la DS además de las generalmente observadas en un ensayo de actividad *in situ*. Ya que se observa claramente que la forma de 155 kDa, presente en todos los ensayos de actividad *in situ*, incrementa su intensidad al aumentar el tiempo de incubación, hecho que podría deberse a la degradación de la DS de 170 kDa. Pero además, dos nuevas bandas de 160 y 165 kDa aparecen e incrementan su tamaño conforme el tiempo de incubación aumenta. Cabe señalar que la forma de 165 kDa comienza a aparecer desde el tiempo cero, lo cual indica que esta es la primera forma que se produce por efecto de la actividad proteolítica, dicha forma se produce desde el momento en que se neutraliza el sobrenadante, ya que desde ese momento se favorece la actividad proteolítica.

En la Figura 18 se muestra la fotografía de un gel en la zona de las bandas de actividad DS, en los que se aprecia claramente la degradación de la forma de mayor peso molecular por efecto de la actividad proteolítica.

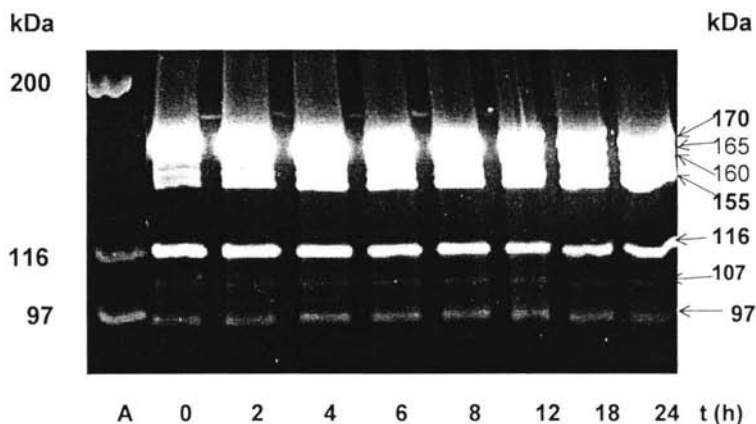


Figura 17. Análisis de actividad *in situ* de la degradación de las proteínas con actividad GT a diferentes tiempos y a pH 7. Carril A Marcador de peso molecular, los siguientes carriles corresponden a los tiempos de incubación en que se llevó a cabo la proteólisis.

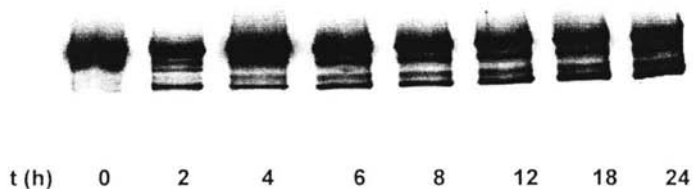


Figura 18. Degradación de la DS. Gel de actividad *in situ* producido por la degradación de la DS a diferentes tiempos.

Al transcurso del tiempo de incubación analizado, no se observó la desaparición de ninguna de las especies principales reportadas, ni DS ni LS. A diferencia de lo reportado (Del Moral, 2004), en donde la forma principal de la DS pierde el 86% de actividad a las 6 h de incubación, nuestros resultados mostraron que esta forma de la DS se conserva

hasta ese tiempo de incubación, e incluso a las 24 h no se observó una pérdida de actividad en la forma principal de la DS. La diferencia entre estos resultados son una muestra de que la actividad proteolítica producida por esta cepa también puede presentar el fenómeno de variabilidad dependiendo del número de resiembras. Los resultados antes mostrados se obtuvieron a partir de extractos enzimáticos producidos por la resiembra 1, y en los reportados por Del Moral (2004), no se hace mención del número de resiembras al que fue sometido el cultivo madre y se podría suponer que en dichos extractos la actividad proteolítica era mayor a la que presentaba nuestra resiembra 1.

Por otro lado, algunas de las especies encontradas coinciden con las formas que posiblemente se pueden obtener a partir de la predicción de los sitios de corte de la proteasa sobre la DS (Arguello-Morales *et. al*, 2004). En dicha publicación se predicen dos tamaños (147 y 137 kDa) los cuales podrían coincidir con las dos formas de menor peso (160 y 155 kDa) observadas en los resultados anteriores de la degradación de la DS. Esto puede ser ya que el método de evaluación de peso molecular por SDS-PAGE tiene un margen de error alto, como lo demuestran recientes estudios (Goetz, 2004), el margen de error puede ser hasta del 15%. Por lo que se puede inferir que las formas obtenidas por nosotros coinciden con las predicciones hechas.

Las nuevas bandas que se observan en el área de actividad LS (Figura 19), comprendida entre los 116 y 97 kDa, podrían indicar que esta enzima también sufre degradación por efecto de la actividad proteolítica, sin embargo no hay una disminución evidente en la intensidad de la banda de 116 kDa (actividad LS). Sólo con un ensayo de actividad específico para actividad fructosiltransferasa puede asegurarse que estas bandas son producto de la degradación de la actividad LS, dejando la posibilidad que dichos fragmentos pudiesen tratarse también de fragmentos de menor peso procedentes de la degradación de la DS.



Figura 19. Degradación en el área de actividad LS. Gel de actividad *in situ* producido por la posible degradación de la LS a diferentes tiempos. El gel fue obtenido a partir de extractos de la resiembra 1, al cual se ajustó el pH a 7.

Por último, hay que señalar que se encontró una muy tenue banda en aproximadamente los 45 kDa, imposible observar a través de la fotografía, la cual pudiese tratarse de la forma observada de 48 kDa por Sánchez y col. (2000).

V.4.2 Efecto del pH, NaN₃ y acetato de zinc sobre la proteólisis de la actividad GT

Una vez que la proteólisis de la actividad GT había quedado de manifiesto en el ensayo anterior, se buscó realizar el mismo ensayo observando dicho efecto en periodos más largos. Sin embargo, las muestras después de las 24 h de incubación comenzaron a presentar turbiedad en el medio, lo cual propició que las muestras después de ese periodo de incubación no pudiesen ser sometidas a un análisis electroforético. Para evitar la formación de turbiedad, se decidió realizar nuevamente el ensayo en presencia de azida de sodio y acetato de zinc (sección IV.10.2), suponiendo que ésta se presentaba en el medio después de las 24 h de incubación era producto del crecimiento de microorganismos y/o por la formación de polímero debido a la actividad GT presente.

Los resultados mostraron que, en presencia de NaN₃ y acetato de zinc, la turbiedad disminuyó, ya que apareció hasta las 72 h de incubación. De dichas muestras se realizó un análisis de actividad *in situ*, los resultados se presentan en la Figura 20. Se observa que la actividad proteolítica a pH 7.5 es más activa que a pH 7, la formación de polímero correspondientes a las bandas de actividad DS y LS 170 y 116 kDa respectivamente a pH 7.5 presentan una mayor pérdida de intensidad (se degradan más) en comparación con su correspondiente a pH 7 (difícil de apreciar en la fotografía). Por otro lado, se observó que la adición de azida de sodio y acetato de zinc ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad proteolítica. El catión Zn²⁺ ya fue estudiado y reportado como inhibidor de la actividad proteolítica en esta cepa (Sánchez, 2000), pero de manera sorpresiva la azida

de sodio muestra un mayor efecto inhibitorio sobre la actividad proteolítica de *L. mesenteroides* B-512F que el ejercido por el Zn^{2+} . En presencia de ambos compuestos, los resultados muestran que la banda de 170 kDa de la DS se conserva ya que se observa una menor degradación para llegar a la forma de 155 kDa. Mientras que para la actividad LS el efecto es más notorio, a pH 7.5 las bandas de 116 kDa se conservan aun más.

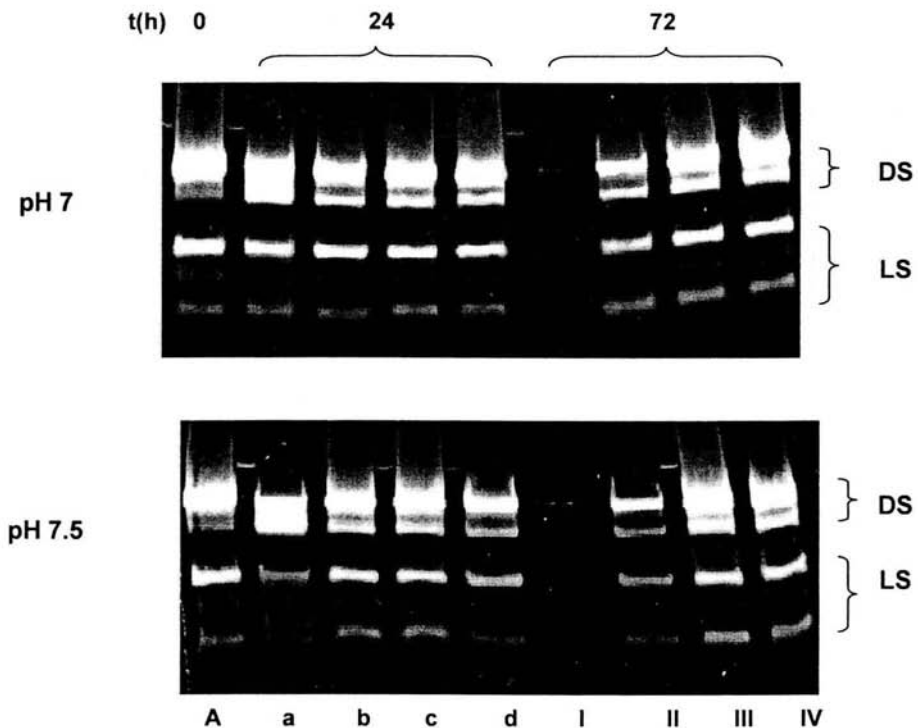


Figura 20. Efecto del pH, NaN_3 y Acetato de zinc sobre la proteólisis de la actividad GT. Carriles: A, a y I controles (sin adición de sales), b y II muestras con NaN_3 1g/L, c y III muestras con acetato de Zn 30 mM, d y IV muestras con NaN_3 1g/L y acetato de zinc 30 mM.

V.4.3 Evolución de la proteólisis sobre la actividad GT

El análisis de la proteólisis sobre la actividad GT al subcultivar a *L. mesenteroides* B-512F se realizó ajustando los sobrenadantes de cada resiembra a pH 7.5, se incubaron a una temperatura de 30° C y se tomaron alícuotas a las 6 y 12 h ya que no se logró evitar la formación de turbiedad en la mayorías de las muestras después de las 12 h de incubación (Materiales y métodos IV.10.3). En la Figura 21 se muestran los resultados del análisis de actividad *in situ* de las diez resiembras, en donde se alcanzan a observar pequeñas diferencias entre ellas. Resalta que las resiembras 1 y 2 presentaron la mayor degradación en las bandas correspondientes a la actividad DS, mientras que las resiembra 4 y 9 presenta el menor grado de degradación en la misma actividad. En todas las resiembras se observó que la formación de polímero correspondientes a la banda de actividad DS de 155 kDa aumenta a costa de la disminución de la forma principal de 170 kDa. En las diez resiembras analizadas no se observó la degradación total de la forma principal de la DS de 170 kDa, lo cual plantea la necesidad de obtener muestras en periodos de incubación mayores, sin la formación de turbidez, para lograr observar este efecto, aunado con la evaluación en cultivos con un mayor número de resiembras.

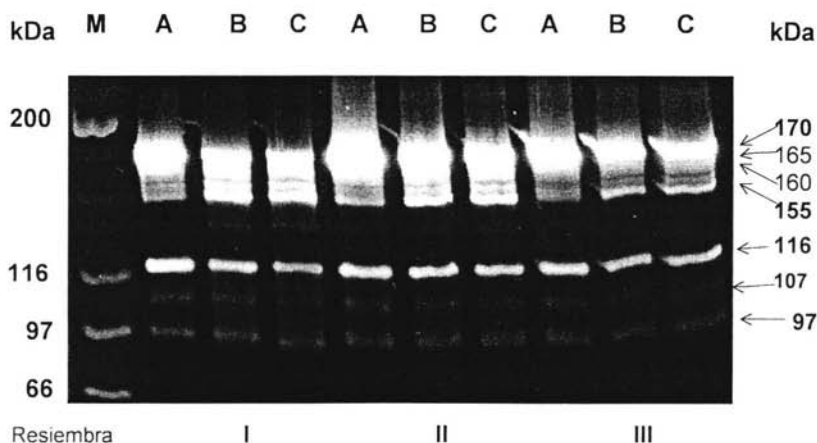


Figura 21. Proteólisis de la actividad GT al subcultivar a *L. mesenteroides* B-512F. Análisis de actividad *in situ*. Se corrió 10 μ L de muestra por carril. La proteólisis se llevó a cabo a pH 7.5. Los números romanos indican el número de resiembra. Carril M Marcador de peso molecular, Carriles A t = 0 h, Carriles B t = 6 h, Carriles C t = 12 h de incubación.

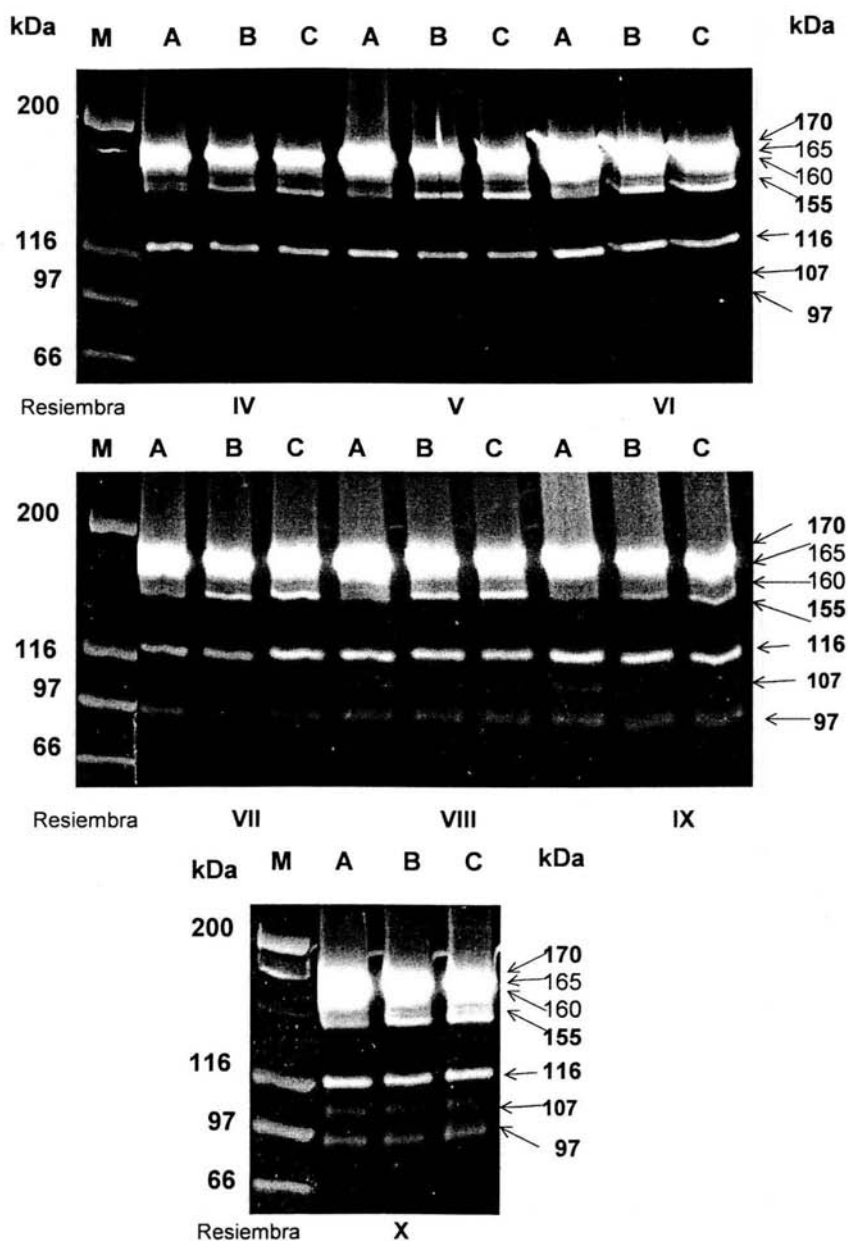


Figura 21 (continuación). Proteólisis de la actividad GT al subcultivar a *L. mesenteroides* B-512F. Análisis de actividad *in situ*. Se corrió 10 μ L de muestra por carril. La proteólisis se llevó a cabo a pH 7.5. Los números romanos indican el número de resiembra. Carril M Marcador de peso molecular, Carriles A t = 0 h, Carriles B t = 6 h, Carriles C t = 12 h de incubación.

Además del análisis de actividad *in situ* se realizó un análisis electroforético con tinción de azul de Coomassie de algunas de las resiembras. La Figura 22 muestra que al aumentar el número de resiembras disminuye la aparición de bandas. Esto puede relacionarse con los resultados anteriores de actividad *in situ*, en donde aparentemente la actividad proteolítica es mayor en las primeras resiembras, por lo cual dicha actividad provoca una mayor hidrólisis de las proteínas presentes en el muestra, dando como resultado un aumento tanto de intensidad como del número de bandas en los carriles pertenecientes a las primeras resiembras.

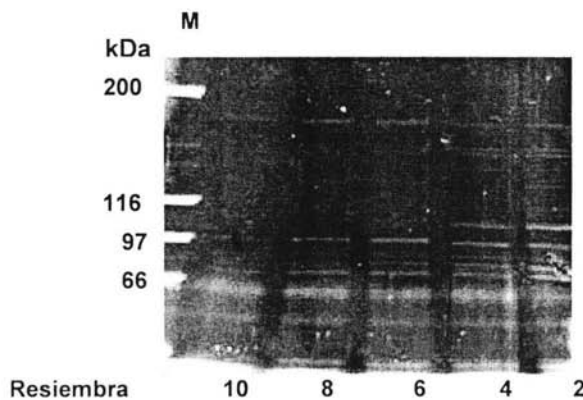


Figura 22. Análisis electroforético de proteínas de varias resiembras a partir de sobrenadantes incubados por 12 h a pH 7.5 y 30° C. Gel SDS-PAGE. 10 μ L de muestra por pozo. Tinción con Azul de Coomassie, Carril M Marcador de peso molecular, Carriles 10-2 sobrenadantes incubados 12 h a pH 7.5 y 30° C de resiembras.

Para corroborar que las bandas que aparece eran producto de la actividad proteolítica presente en cada alícuota extracelular, se realizó un nuevo análisis electroforético de cada resiembrá al tiempo cero y al término de 12 h de incubación. La Figura 23 muestra que sólo en las resiembras 1 y 2 se logró apreciar claramente que las bandas formadas eran producto de la actividad proteolítica. Al tiempo cero sólo aparecen las bandas correspondientes a la proteína de la DS, mientras que a las 12 h de incubación se presenta la formación de un gran número de bandas. La explicación de este resultado puede estar en que la actividad proteolítica hidrolizó proteínas presentes en los extractos enzimáticos que al tiempo cero no entraron en el gel de electroforesis, posiblemente

debido a su gran tamaño por estar unida al polímero, y por lo tanto no se lograban observar en el análisis electroforético. Para el resto de las resiembras si se alcanzan a observar la formación de nuevas bandas con respecto a sus controles, sin embargo tanto el número como la intensidad de estas es variable entre ellas. Nuevamente esto hace alusión a que la actividad proteolítica producida por esta cepa al ser resembrada es variable. Cabe señalar que las muestras no se concentraron lo cual pudo contribuir a que las bandas no se apreciaran con claridad en todos los casos.

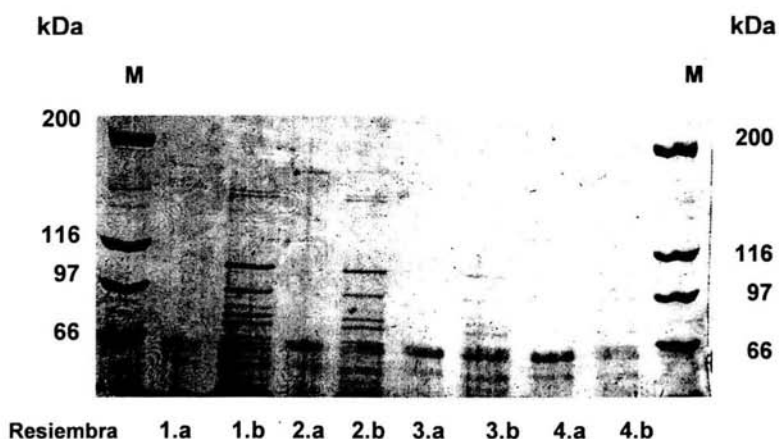


Figura 23. Análisis electroforético de proteínas de todas las resiembras a partir de sobrenadantes para evaluación de actividad proteolítica. Gel SDS-PAGE. 10 μ L de muestra por pozo. Tinción con Azul de Coomassie, Carriles M Marcador de peso molecular, Carriles a t = 0 h y carriles b =12 h a pH 7.5 y 30° C.

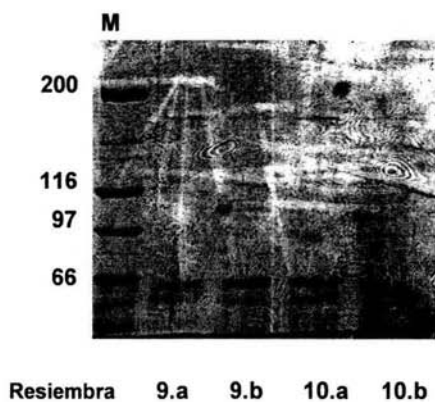
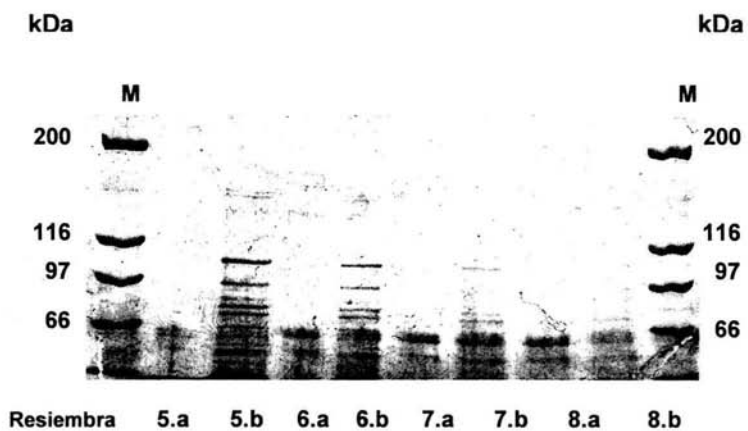


Figura 23 (continuación). Análisis electroforético de proteínas de todas las resiembras a partir de sobrenadantes para evaluación de actividad proteolítica. Gel SDS-PAGE. 10 μ L de muestra por pozo. Tinción con Azul de Coomassie, Carriles M Marcador de peso molecular, Carriles a t = 0 h y carriles b =12 h a pH 7.5 y 30° C.

VI Conclusiones

Se corrobora que la actividad GT está asociada al crecimiento de *L. mesenteroides* B-512, existe un máximo de actividad al final de la fase exponencial de crecimiento, presentándose una caída después de ese punto debido al descenso del pH.

Se evidenció la presencia de dos formas de DS y dos LS cuyos pesos moleculares coinciden con los reportados en la literatura (170, 155, 119 y 95 respectivamente).

No se encontró un inhibidor específico, ni concentración alguna en la que se presentara el cien por ciento de actividad de una de las enzimas y la inhibición completa de la otra con los inhibidores probados.

A una concentración de 30 mM de acetato de zinc se encontraron las mejores condiciones para la medición selectiva de la LS producida por *L. mesenteroides* B-512F por medio de la técnica de cuantificación de azúcares reductores, ya que a mayores concentraciones de inhibidor se disminuye demasiado la producción de reductores, lo que implica problemas a nivel experimental en su determinación por el método de DNS.

Existe variación de la actividad DS y LS al resembrar la cepa. La producción de la actividad LS es independiente de la actividad DS producida por esta cepa.

La variación de la actividad GT observada en esta cepa, al subcultivarla, no se debe a la presencia de actividad proteolítica.

Se observa un procesamiento proteolítico sobre la DS que produce 3 especies activas de menor peso molecular a partir del producto del gen *dsr-S*.

En las condiciones evaluadas, no se logra la degradación total de la forma de 170 kDa de la DS y no existe un cambio en el patrón de proteólisis al transcurso de las resiembras.

La evaluación cualitativa de la actividad proteolítica al subcultivar la cepa, mediante la proteólisis de la actividad GT, hace suponer que ésta también es variable.

VI Bibliografía

- ❑ **Arguello-Morales Martha, Sánchez González Mónica, Canedo Mariana, Quirasco Maricarmen, Farrés Amelia and López-Munguía Agustín. 2004.** Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. (Artículo en prensa).
- ❑ **Axelsson Lars. 1993.** Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology En: Von Wright A., Salminen, S. Lactic Acid Bacteria. Chap 1. 1st. Edt. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. 1-63 pp,
- ❑ **Belghith H., Song K.B., Kim C.H. and Rhee S.K. 1996.** Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. Biotechnol. Lett. 18: 467-472.
- ❑ **Castillo E. and López-Munguía A. 2004.** Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. Journal of Biotechnology. 114 : 209-217.
- ❑ **Chacón Romero Mariana. 2004.** Estudio de la variabilidad fenotípica de bacterias lácticas de interés industrial. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F.
- ❑ **Del Moral Ventura Sandra. 2004.** Degradación proteolítica de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Tesis de Maestría. IBT, UNAM, Cuernavaca Morelos.
- ❑ **Djouzi Z. and Andrieux C. 1995.** Degradation and fermentation of α -glucosaccharides by bacterial strains from human colon: in vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats, J. Appl. Bacteriol. 79, 117-127,
- ❑ **Flickinger M. and Drew S. 1999.** Enciclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, biocatalysis and bioseparation, Vol. 2, A Wiley-Interscience Publication, pp 803-821.
- ❑ **Fu D. and Robyt J.F. 1990.** A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM dextransucrase. Prep.Biochem. 20 : 93-106.
- ❑ **Funane K. M., Yamahada M., Shiraiwa M., Takahara H., Yakamoto N., Ichishima E. and Kobayashi M. 1995.** Aggregated form of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* B-512F and its constitutive mutant. Biosci. Biotech. Biochem., 59 : 776-780.
- ❑ **Goetz H., Kuschel M., Wulff T., Sauber C., Miller C., Fisher S. and Woodward C. 2004.** Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. J. Biochem. Biophys. Methods. 60: 281-293.
- ❑ **Groenwall A. and Ingelman B. 1948.** Manufacture of infusion and injection fluids. U.S. Pat. 2,437-518.
- ❑ **Gronwall A. 1957.** Dextran and it uses in colloidal infusion solutions. Academic press, New York, p.156.

- ☐ **Gronwall A. and Ingelman B. 1945.** Acta Phys. Scad. 7, 97.
- ☐ **Herreros M.A., Fresno J. M., González Prieto M. J. and Tornadizo M.E. 2003.** Technological characterization of acid lactic bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). International Dairy Journal. 13: 469-479.
- ☐ **Kim D. and Robyt J. F. 1994^a.** Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. Enzyme Microb. Technol. 16 : 659-664.
- ☐ **Kim D. and Robyt J. F. 1994^b.** Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranucrase. Enzyme Microb. Technol 16 : 1010-1015.
- ☐ **Koepsell H. J., Tsuchiya H. and Hellman M. 1953.** Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. J. Bio. Chem. 200, 793-801.
- ☐ **Kobayashi M. y Matsuda K. 1980.** Characterization of multiple forms and main component of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biochim Biophys. Acta 614: 42-62.
- ☐ **Laemmli U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- ☐ **Law Jean and Haandrikman Alfred. 1997.** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Int. Dairy Journal 7: 1-11.
- ☐ **López A. and Monsan. 1980.** Dextran synthesis by immobilized dextranucrase. Biochimie. 62: 323-329.
- ☐ **López-Munguía Agustín. 2002.** Comunicación personal.
- ☐ **López-Munguía Agustín. 2004.** Comunicación personal.
- ☐ **Macedo A., Vieira M., Pocas R. and Malcata X. 2000.** Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. International Dairy Journal 10: 769-774.
- ☐ **Miller W. Arthur, Steven H. Eklund and Robyt J. F. 1986^a.** Milligram to gram scale purification and characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512, Carbohydrate research. 147: 119-113.
- ☐ **Miller W. Arthur and Robyt J. F. 1986^b.** Activation and inhibition of dextranucrase by calcium. Biochim. Biophys. Acta. 880 : 32-39.
- ☐ **Miller W. Arthur and Robyt John F. 1986^c.** Inhibition of dextranucrase by Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, and Tris. Archives of Biochemistry and Biophysics, 248: 579-586.
- ☐ **Monchois V., Rемаud-Simeon M., Russell R.R.B., Monsan P. and Willemot R.M. 1997.** Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

dextranase (DSRS) and identification of amino acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 465-472.

- ❑ **Monchois Vincent, René É-Marc Willemot and Pierre Monsan. 1999.** Glucanases: mechanism of action and structure-function relationships, *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 131-151,
- ❑ **Monsan P. and Paul F. 1995.** Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 187-192.
- ❑ **Monsan P., F. Paul, D. Auriol, and Lopez A. 1987.** Dextran synthesis using immobilized *L. mesenteroides* dextranase. *Methods in enzymology.* 136:239-254.
- ❑ **Niness K.R. 1999.** Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 129, 1402S-1406S.
- ❑ **Perez-Oseguera M.A., Guereca L. and Lopez-Munguia A. 1996.** Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 465-471.
- ❑ **Quirasco Baruch Maricarmen. 2000.** Caracterización genética de la dextranasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., pág. 56.
- ❑ **Sánchez González Mónica Noel. 2000.** Origen y propiedades de las diversas formas observadas de la dextranasa de *L. mesenteroides* B-512F, Tesis Doctorado, IBT, UNAM, Cuernavaca Morelos.
- ❑ **Sephadex. 1964.** Pharmacia Fine Chemical Inc. New York.
- ❑ **Summer J.B. and Howell. 1935.** A method of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108:51-54.
- ❑ **Tieking M., Korakli M., Ehrmann A., Ganzle M. and Vogel R. 2003.** In Situ Production of Exopolysaccharides during Sourdough Fermentation by Cereal and Intestinal Isolates of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2): 945-952.
- ❑ **Wales M. et al. 1953.** *J. Polym.Sci.* 10:229.
- ❑ **Willemont R.M., Monsan P. and Durand G. 1988.** Effects of dextran on the activity and stability of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 8 : 169-172.
- ❑ **Wilke-Douglas M., Perchorowicz, J.T., Houck and Thomas, B.R. 1989.** Methods and compositions of altering physical characteristic of fruit products, US Patent WO 89/12386.
- ❑ **Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Lizuka M., Saeki S. and Yamaguchi H. 2000.** Hypercholesterolemic effects of levan in rats. In: Nishinari, K. (Ed.), *Hydrocolloids (Part II)*. Elsevier Science, The Netherlands, pp. 399-400.

VIII Anexos

Anexo I

Análisis estadísticos

Prueba de rango múltiple (según DUNCAN)

Actividad GT										Actividad GT con inhibidor												
Resiembra	2	4	10	1	3	9	5	8	7	6	Resiembra	1	2	4	7	3	8	5	0	9	6	
2											1											
4	β										2											
10	β										4											
1	β	β									7	β	β									
3	β	β									3	β	β	β								
9	β	β	β								8	β	β	β								
5	β	β	β	β	β						5	β	β	β	β	β						
8	β	β	β	β	β	β	β				10	β	β	β	β	β	β					
7	β	β	β	β	β	β	β	β			9	β	β	β	β	β	β	β	β			
6	β	β	β	β	β	β	β	β			6	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	

β denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 0.05

*Test de homogeneidad
Rangos de 0.05 de nivel

Actividad GT		Actividad GT con inhibidor	
Grupo	Resiembras	Grupo	Resiembras
1	2	1	1, 2 y 4
2	4 y 10	2	4 y 7
3	10, 1 y 3	3	7, 3 y 8
4	1, 3 y 9	4	8 y 5
5	9 y 5	5	5 y 10
6	8, 7 y 6	6	9
		7	6

*Los grupos formados con las agrupaciones de resiembra se hicieron con base en sus medias (mayores o menores) y éstas no difieren más allá de los pequeños intervalos o rangos de significancia de sus medias del grupo de tal tamaño.

Anexo II

Análisis estadísticos

Prueba de rango múltiple (según DUNCAN)

Proteína soluble total										Proteína soluble en sobrenadante											
Resiembr	3	4	5	1	2	6	9	7	10	8	Resiembr	5	4	2	3	6	1	9	7	8	10
3											5										
4											4										
5		β									2		β								
1		β	β								3		β								
2		β	β	β							6		β	β							
6		β	β	β	β	β					1		β	β	β	β					
9		β	β	β	β	β					9		β	β	β	β	β				
7		β	β	β	β	β	β				7		β	β	β	β	β				
10		β	β	β	β	β	β	β	β		8		β	β	β	β	β	β	β	β	
8		β	β	β	β	β	β	β	β		10		β	β	β	β	β	β	β	β	β

β denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 0.05

*Test de homogeneidad Rangos de 0.05 de nivel

Proteína soluble total		Proteína soluble en sobrenadante	
Grupo	Resiembras	Grupo	Resiembras
1	3 y 4	1	5 y 4
2	4 y 5	2	4, 2 y 3
3	5 y 1	3	2, 3 y 6
4	1 y 2	4	6 y 1
5	6 y 9	5	1, 9 y 7
6	9 y 7	6	8
7	10 y 8	7	10

*Los grupos formados con las agrupaciones de resiembbras se hicieron con base en sus medias (mayores o menores) y éstas no difieren más allá de los pequeños intervalos o rangos de significancia de sus medias del grupo de tal tamaño.