

00566

24<sup>o</sup>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE  
GLUCOSILTRANSFERASAS DE  
Leuconostoc Mesenteroides**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRIA EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

( INGENIERIA DE ALIMENTOS )

P R E S E N T A :

ENRIQUE DURAN PARAMO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUCCION .....	5
II. GENERALIDADES .....	12
II.1. DEXTRANAS .....	12
A. SINTESIS DE DEXTRANA .....	16
B. MECANISMO DE SINTESIS ENZIMATICA DE DEXTRANA .....	19
C. REACCIONES DE ACEPTOR .....	23
D. FORMACION DE RAMIFICACIONES .....	26
II.2. DEXTRANSACARASA .....	28
II.3. PRODUCCION DE DEXTRANSACARASA .....	31
A. FUENTE DE DEXTRANSACARASA .....	31
B. FERMENTACION CONVENCIONAL .....	32
C. FERMENTACION DISCONTINUA .....	37
II.4. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA .....	37
A. EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO CON POLIETILENGLICOL .....	38
III. MATERIALES Y METODOS .....	41
III.1. PRESERVACION DE LAS CEPAS .....	41
III.2. PRODUCCION DE LA DEXTRANSACARASA .....	41
III.3. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA .....	46
III.4. SINTESIS ENZIMATICA DE DEXTRANA .....	48
III.5. DETERMINACION DE CONSTANTES CINETICAS .....	49
III.6. DETERMINACION DE pH Y TEMPERATURA OPTIMOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA .....	49
III.7. REACCIONES DE ACEPTOR .....	50
III.8. HIDROLISIS ENZIMATICA DE DEXTRANA .....	50
III.9. ANALISIS DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC) .....	50
IV. RESULTADOS Y DISCUSION .....	52
PARTE I. PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LA DEXTRANSACARASA DE <u>Leuconostoc mesenteroides</u> NRRL B-1498 .....	52
IV.1. PRODUCCION DE LA DEXTRANSACARASA B-1498 .....	53
A. FERMENTACION EN MATRAZ .....	53
B. FERMENTACION RETROALIMENTADA .....	54
IV.2. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA B-1498 .....	54
IV.3. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA DEXTRANSACARASA B-1498.....	57
A. DETERMINACION DE pH Y TEMPERATURA OPTIMOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA .....	58
B. SINTESIS DE DEXTRANA B-1498 .....	58
C. REACCIONES DE ACEPTOR CON LA DEXTRANSACARASA B-1498.....	60
D. HIDROLISIS ENZIMATICA DE DEXTRANA B-1498 .....	62

<b>PARTE II. PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LA DEXTRANSACARASA</b>	
DE <u>Leuconostoc mesenteroides</u> NRRL-B-523 .....	64
<b>IV.4. PRODUCCION DE LA DEXTRANSACARASA B-523 .....</b>	<b>65</b>
A. FERMENTACION EN MATRAZ .....	65
B. FERMENTACION RETROALIMENTADA (FED-BATCH) .....	66
<b>IV.5. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA B-523 .....</b>	<b>66</b>
A. CENTRIFUGACION CONTINUA .....	66
B. EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO .....	68
C. ELECTROFORESIS .....	70
<b>IV.6. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA DEXTRANSACARASA B-523 .....</b>	<b>72</b>
A. DETERMINACION DE pH Y TEMPERATURA OPTIMOS DE ACTIVIDAD ..	72
B. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS .....	72
C. SINTESIS DE DEXTRANA B-523 .....	78
D. MEDICION DE VISCOSIDAD APARENTE DURANTE LA SINTESIS	
DE DEXTRANA B-523 .....	81
E. SINTESIS DE DEXTRANA B-523 EN PRESENCIA DE ACEPTORES ....	83
F. HIDROLISIS ENZIMATICA DE PRODUCTOS DE ACEPTOR DE LA	
DEXTRANSACARASA B-523 .....	86
G. HIDROLISIS ENZIMATICA DE DEXTRANA B-523 .....	89
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>VI. REFERENCIAS .....</b>	<b>94</b>

## PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE GLUCOSILTRANSFERASAS DE

### Leuconostoc mesenteroides.

#### RESUMEN

Las enzimas glucosiltransferasas y en particular las dextrantransferasas obtenidas de cepas de Leuconostoc mesenteroides, son importantes en los procesos de síntesis debido a que producen polisacáridos, conocidos como dextranas, las cuales presentan diversas aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y química. Además, estas enzimas permiten la producción de diversos oligosacáridos con gran potencial de aplicación industrial.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la caracterización de las glucosiltransferasas producidas por dos cepas de Leuconostoc mesenteroides: NRRL B-1498 y NRRL B-523, estableciendo comparaciones de los resultados obtenidos con la cepa industrial NRRL-B512F.

Estas dos cepas tienen particular interés ya que la primera (B-1498) presentó, en estudios preliminares, características similares a la B-512F, pero con niveles de producción enzimática muy superiores, mientras que la segunda (B-523) es una cepa productora de una glucosiltransferasa con capacidad de sintetizar dextrana insoluble.

En primera instancia, se realizaron comparaciones a nivel de producción enzimática y características químicas de las dextranas producidas. Posteriormente, se compararon los productos obtenidos tanto en reacciones

de síntesis con aceptores, como en reacciones de hidrólisis con dextranasas, de los polisacáridos correspondientes. Finalmente, se caracterizaron las enzimas en términos de sus propiedades catalíticas.

Los resultados mostraron que la dextransacarasa B-1498 tiene un comportamiento muy similar al de la dextransacarasa B-512F, pero con niveles de producción cinco veces más altos, lo que representa una gran ventaja para el proceso de producción actual.

Por otro lado, se confirmó la producción de dextrana insoluble por la dextransacarasa B-523 y se observó que esta enzima presenta características catalíticas diferentes a la B-512F. Sin embargo, se encontró cierta similitud tanto en los productos de reacción con aceptores, como en los de hidrólisis con dextranasa, lo que hace suponer que la insolubilización se debe a un mecanismo característico de esta enzima que ocurre en el curso de la reacción.

## PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSYLTRANSFERASES

### FROM Leuconostoc mesenteroides.

#### ABSTRACT

Glucosyltransferases and, in particular, dextransucrases obtained from Leuconostoc mesenteroides strains are enzymes important for the processes of synthesis of the polysaccharides known as dextrans, which have several applications in the pharmaceutical, the chemical and the food industry.

In this work the characterization of glucosyltransferases produced by two strains of Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1498 and NRRL B-523 was performed and the results obtained were compared to the industrial strain NRRL B-512F.

These two strains are specially interesting. The first one (B-1498) showed, in preliminary studies, characteristics similar to B-512F, but presented much higher enzyme production levels. The second strain (B-523) is a glucosyltransferase producer with the ability to synthesize insoluble dextran.

Initially, enzymatic production and chemical characterization of the dextrans produced by the different strains were compared. Later on the products obtained in reaction synthesis with acceptors were compared, as well as the products of dextransase hydrolysis of the corresponding polysaccharides. Finally, the enzymes were characterized in terms of their catalytic properties.

The results showed that the dextransucrase B-1498 has a very similar behavior to the dextransucrase B-512F, but with five times the production level. This represents a great advantage for the current production process.

In the other hand, production of insoluble dextran by the B-523 was confirmed, and this enzyme showed different catalytic properties from B-512F. However, a certain similarity was found in the acceptor reaction products and the products from dextransase hydrolysis for both enzymes. This leads us to suppose that insolubilization is due to a mechanism characteristic of this enzyme during the reaction course.



## I. INTRODUCCION

Los procesos biológicos se realizan en gran medida mediante reacciones catalizadas por ciertas moléculas de naturaleza proteínica conocidas como enzimas. Desde su descubrimiento por Payen y Persoz en 1833, el conocimiento de las enzimas evolucionó lentamente y todavía a principios de siglo se cuestionaba no sólo su forma de actuar sino su misma existencia.

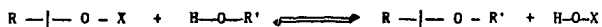
La experiencia en la utilización de microorganismos como fuente de enzimas para uso industrial, se inició en los años cuarenta posterior al desarrollo de procesos para producir antibióticos en gran escala. Hoy en día esta es una industria bien desarrollada con ventas anuales de biocatalizadores de cerca de 600 millones de dólares anuales, siendo la mayor parte de ellos de origen microbiano. Para su aplicación, las enzimas pueden emplearse en forma aislada, o bien dentro de los microorganismos intactos para el caso de enzimas intracelulares. En ambos casos las bioconversiones tienen la ventaja de presentar mayor especificidad en las reacciones químicas necesarias para rendir el producto deseado, con un máximo de control sobre la calidad y los rendimientos y un mínimo de subproductos indeseables.

En nuestros días el uso de enzimas se ha extendido a numerosos campos tales como el alimentario, el farmacéutico, el textil o el tratamiento de efluentes.

Actualmente se conocen más de 3,000 enzimas, la caracterización de éstas resulta necesaria para el entendimiento del mecanismo de acción, para la búsqueda de nuevas aplicaciones y para el máximo aprovechamiento de su actividad catalítica. Las enzimas que catalizan las reacciones de hidrólisis son predominantes en el conjunto de enzimas de aplicación industrial existiendo actualmente un gran potencial para enzimas que catalizan otro tipo de reacciones como es el caso de los procesos de síntesis.

La clasificación de las enzimas se basa principalmente en la reacción química catalizada. De éstas, un grupo de particular interés es el de las glicosiltransferasas, que catalizan la reacción de transferencia de residuos glicosil de moléculas donadoras a aceptoras diferentes al agua.

La reacción de transglicosilación puede ser expresada de la siguiente manera:



donde R es una aldosa transferida del donador glicosil R-O-X a la molécula aceptora H-O-R' (tanto el donador como el aceptor pueden ser disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, etc.).

Las enzimas que catalizan tales intercambios de enlaces glicosídicos, ocupan una posición clave en las actividades biológicas de las células, debido a que producen diversos polisacáridos y oligosacáridos con funciones importantes para las células, algunos de los cuales presentan interés industrial.

Dentro de este grupo de enzimas se encuentran las glucosiltransferasas, siendo la dextransacarasa o sacarosa:1,6- $\alpha$ -D-glucan-6- $\alpha$ -D-glucosiltransferasa (E.C.2.4.1.5) la enzima más estudiada de este grupo. Esta proteína es producida extracelularmente por un gran número de bacterias pertenecientes a la familia Lactobacillaceae (Alsop, 1983).

La dextransacarasa cataliza la reacción de transferencia de unidades de glucosa a partir de sacarosa, formando un polímero de glucosa denominado dextrana, como lo muestra la figura 1.

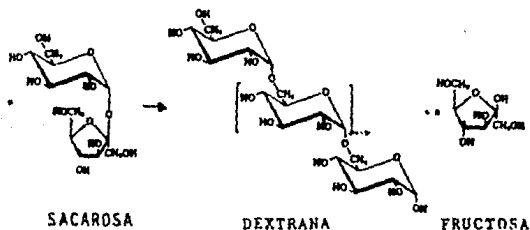


FIGURA 1.- SINTESIS DE DEXTRANA

Es importante señalar que esta reacción es irreversible y que no necesita intermediarios fosforilados, ya que la energía necesaria para la condensación de los residuos glucosilos es proporcionada por la hidrólisis de la sacarosa (Hassid y Neufeld, 1962).

Las dextranas son polisacáridos compuestos por unidades de D-glucosa, unidas con enlaces  $\alpha(1-6)$  en su cadena principal y con ramificaciones conteniendo cantidades variables de enlaces  $\alpha(1-2)$ ,  $\alpha(1-3)$  y  $\alpha(1-4)$ .

Hasta la fecha, la dextrana es el polisacárido microbiano más estudiado y su producción a nivel industrial se ha llevado a cabo utilizando la bacteria láctica Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512P. Esta cepa produce una dextrana que contiene 95% de enlaces  $\alpha(1-6)$  y 5% de enlaces  $\alpha(1-3)$ , siendo así la dextrana más conocida y de la que más artículos se han publicado (Rohyt y Walseth, 1979).

Las aplicaciones de la dextrana en la industria son numerosas y podrían ser objeto de un estudio particular. Las aplicaciones difieren según las propiedades de la dextrana y éstas dependen del tamaño de las cadenas. Las dextranas de la cepa industrial tienen pesos moleculares que llegan hasta los 200 millones de daltons. Dextranas de bajo peso molecular pueden ser producidas bajo ciertas condiciones de reacción.

Las dextranas de peso molecular superior a 25 millones han sido propuestas como agentes viscosantes en la industria petrolera, particularmente en la perforación de pozos. De igual forma son utilizadas en la industria alimentaria como agentes de textura o gelificantes; en la industria

farmacéutica como tamiz molecular para el aislamiento y purificación de productos biológicos (Sephadex); así también se utilizan como sustancia de encapsulación y vector de medicamentos.

La dextrana de bajo peso molecular ( $75,000 \pm 25,000$ ) puede ser empleada como sustituto de plasma sanguíneo. El mercado actual más importante corresponde al complejo Hierro-dextrana empleado como medicamento para el tratamiento de la anemia.

Una aplicación industrial particular se ha abierto a oligosacáridos de bajo peso molecular, donde la enzima dextranasa puede llegar a jugar un papel importante. En las síntesis de dextrana, se ha observado que la presencia de ciertas moléculas (que actúan como aceptores), provoca que la dirección normal de síntesis de polímero sea modificada, favoreciendo la producción de oligosacáridos de diversos grados de polimerización. Esta característica ha aumentado el interés no sólo en el estudio de la glucosiltransferasa clásica (proveniente de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512P) sino también en la caracterización de nuevas enzimas, con énfasis en el tipo de oligosacáridos que sintetizan y en la variedad de oligosacáridos que podrían producir en tales reacciones.

En este contexto, el contar con una gama de enzimas glucosiltransferasas con diversas características tanto de índole estructural en el producto, como de capacidad para producir oligosacáridos de peso molecular controlado e inclusive de llevar a cabo reacciones de ramificación, abriría nuevas perspectivas en la química de carbohidratos.

En función de este interés, la Facultad de Química de la UNAM y la compañía BioEurope en Francia, acordaron la realización de un proyecto de investigación en el campo de las glucosiltransferasas, con el objetivo de caracterizar enzimas provenientes de diferentes microorganismos.

El presente trabajo forma parte de dicho proyecto y tiene como objetivos particulares el de caracterizar las glucosiltransferasas producidas por las cepas B-1498 y B-523 de Leuconostoc mesenteroides pertenecientes a la colección NRRL (Northern Regional Research Laboratory) de Peoria, Illinois (USA).

## II. GENERALIDADES.

### II.1. DEXTRANAS

Las dextranas son una clase de polisacáridos sintetizados a partir de sacarosa por enzimas provenientes de bacterias (dextransacarasas, glucosiltransferasas o glucansacarasas), las cuales forman D-glucanos con enlaces glucosídicos  $\alpha(1-6)$  continuos en las cadenas principales y una cantidad variable de ramificaciones con enlaces  $\alpha(1-2)$ ,  $\alpha(1-3)$  o  $\alpha(1-4)$ . El término "dextrana" fue usado por Scheibler en 1874 (Alsop, 1983), cuando encontró que el espesamiento del jugo de caña era causado por un carbohidrato que tenía una rotación óptica positiva. Previamente Pasteur en 1861 había demostrado que esta viscosidad era producida por la acción de microorganismos; posteriormente Van Tiegen en 1878 aisló a uno de esos microorganismos denominándolo Leuconostoc mesenteroides.

La formación de dextrana fue reconocida como el resultado de la transformación de soluciones de sacarosa en soluciones viscosas, geles y material floculento precipitado.

Las dextranas presentan un gran problema en la industria azucarera, debido a que ocasionan bloqueos en las tuberías y filtros, inhiben la cristalización del azúcar, reducen los rendimientos y distorsionan las medidas de rotación específica usadas en la estandarización y determinación de la pureza del azúcar.

Muchas dextranas han sido estudiadas y propuestas para usos industriales como sustituto de plasma sanguíneo, tamicos moleculares, anticoagulantes, aditivos en alimentos, explosivos y gomas de alta viscosidad entre otros. Sin embargo, actualmente muy pocos usos han sido desarrollados, representando así el grupo de polisacáridos que ha sido más extensamente investigado pero que ha aportado muy poco al desarrollo industrial (Alsop, 1983).

La mayoría de los trabajos relacionados con las dextranas han sido realizados con cepas de Leuconostoc mesenteroides y en particular la cepa NRRL B-512F, que fue aislada en 1943 por Benedict en el Northern Regional Research Laboratory (NRRL) en Peoria, IL, USA, la cual se convirtió en el microorganismo de elección para la producción industrial y estudio de las dextranas. Esta cepa produce una dextrana que contiene 95% de enlaces  $\alpha(1-6)$ -D-glucopiranosídicos y 5% de  $\alpha(1-3)$ . Actualmente es producida y comercializada en los Estados Unidos, en Cuba y en el Oeste de Europa.

Jeanes en 1954 revisó el tipo de dextrana producida por 96 bacterias, principalmente del grupo Leuconostoc sp. y Streptococcus sp. En el enfoque usado en este trabajo las dextranas producidas directamente por fermentación, fueron caracterizadas de acuerdo con los principales tipos de enlaces presentes en el polisacárido (empleando técnicas de oxidación con periodato), a su viscosidad, a su solubilidad y a su rotación específica. Se encontró que, los polímeros tenían una gran cantidad de enlaces  $\alpha(1-6)$  con cantidades variables de enlaces  $\alpha(1-3)$  y  $\alpha(1-4)$ , dependiendo del tipo de microorganismo. Sin embargo la



clasificación de Jeanes no tomó en cuenta una serie de factores determinantes para la caracterización, no evidentes en ese tiempo. Las dextranas fueron analizadas después de la síntesis durante la fermentación, donde las condiciones son tales que varias enzimas con diferentes características pudieron estar presentes; además no todas las glucosiltransferasas son extracelulares y la dextrana podría ser diferente si la síntesis se lleva a cabo con enzimas purificadas; y aún más, las síntesis de dextranas realizadas durante fermentaciones tuvieron condiciones óptimas para el crecimiento celular y no las óptimas para la síntesis de dextrana. En trabajos posteriores, ha quedado demostrado que si bien las condiciones de reacción no afectan la estructura química, sí pueden afectar el peso molecular (Paul et al., 1986).

Las diferencias entre las dextranas caracterizadas por Jeanes (1954) y las producidas en estudios posteriores con diferentes cepas, permiten concluir que las características estructurales de las dextranas dependen de la cepa en cuestión. La naturaleza de los tipos de enlaces en las ramificaciones de varias dextranas fue objeto de un estudio posterior empleando análisis de merilación (Tabla 1) (Robyt, 1986). Algunas cepas producen polisacáridos insolubles y algunas forman más de un clase de polisacárido, los cuales son separados por fraccionación diferencial con etanol y denominados fracción menos soluble (L) y fracción más soluble (S) dependiendo de la concentración de alcohol a la cual precipiten, generalmente 36-37% y 40-44% respectivamente.

TABLA 1. CLASIFICACION DE DEXTRANSAS DE ACUERDO AL MICROORGANISMO.

DEXTRANA	SOLUBILIDAD	% EN L A C E S				
		$\alpha(1-6)$	$\alpha(1-3)$	$\alpha(1-3)Er$	$\alpha(1-2)Er$	$\alpha(1-4)Er$
L.m. B-512F	S	95	5			
L.m. B-742	S	50		50		
L.m. B-742	L	87				13
L.m. B-1299	S	65			35	
L.m. B-1299	L	66		1	27	
L.m. B-1355	S	54	35	11		
L.m. B-1355	L	95		5		
S.m. 6715	S	64		36		
S.m. 6715	I	4	94	2		

L.m. Leuconostoc mesenteroides

S.m. Streptococcus mutans

S soluble

L ligeramente soluble

I insoluble

Er enlace ramificado

Fuente: Robyt, 1986.

Desde 1976, el grupo de Seymour del Centro Médico de Texas en Estados Unidos, ha trabajado en la determinación de la estructura de dextranas producidas por varias cepas de Leuconostoc mesenteroides y Streptococcus mutans usando metilación, oxidación con periodato y resonancia magnética nuclear de carbono (C-n.m.r.) (Seymour et al. 1976 - 1980).

Seymour y Knapp en 1980 señalan que las dextranas pueden ser divididas en tres clases con base a sus características estructurales. Las clase I son dextranas que contienen una cadena principal de residuos glucosídicos consecutivos unidos con enlaces  $\alpha(1-6)$  con ramificaciones en las posiciones 2, 3 o 4. Las clase II son las dextranas que contienen enlaces consecutivos  $\alpha(1-3)$  y  $\alpha(1-6)$  y ramificaciones en los enlaces  $\alpha(1-3)$ . Por último la clase III son dextranas que contienen enlaces consecutivos  $\alpha(1-3)$  y ramificaciones en enlaces  $\alpha(1-6)$ . La Figura 2 esquematiza la estructura de las dextranas.

#### A. SINTESIS DE DEXTRANA.

La síntesis de dextrana a partir de sacarosa es llevada a cabo por la dextransacarasa. Esta síntesis difiere de la del glucógeno y almidón en que no requiere de intermediarios fosforilados. En efecto, la energía necesaria para la condensación de los residuos glucosídicos es proporcionada por la hidrólisis del enlace osídico de la sacarosa, debido a que la energía libre de hidrólisis es de  $-6.6$  kcal/mol y la energía necesaria para la formación de un enlace  $\alpha(1-6)$  en la dextrana es

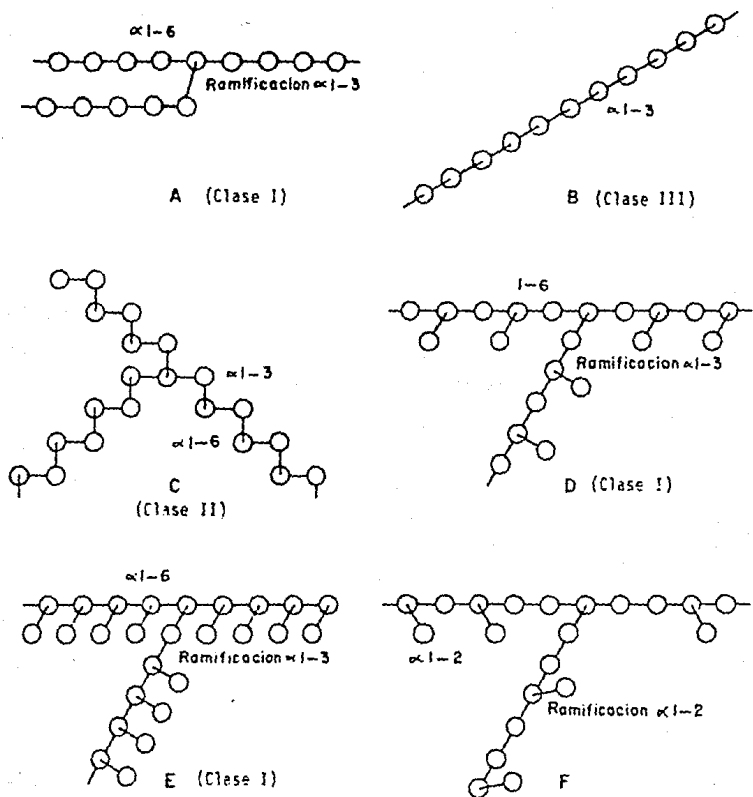


FIGURA 2 .- ESTRUCTURA DE LAS DEXTRANAS.

A.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-512 F
B.- <u>Streptococcus mutans</u>	
C.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-1355
D.- <u>Streptococcus mutans</u>	
E.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-742
F.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-1299

de 2.0 kcal/mol (Hassid y Neufeld, 1962). De esta forma, la reacción de síntesis de la dextrana (Fig. 1) es irreversible a causa de la gran diferencia entre las energías de hidrólisis y condensación (Hehre, 1946).

Los primeros trabajos sobre síntesis enzimática de dextrana, se llevaron a cabo por Hehre en 1946, quien observó que existía una relación entre la dextrana y el azúcar reductor producidos y que esta producción estaba asociada a la hidrólisis de sacarosa.

Posteriormente Brock Neely y Nott (1962), indicaron que la dextranasa es inducida por la sacarosa y que aparentemente la porción fructofuranosa de la sacarosa es la que provoca que la inducción tenga lugar.

Por otra parte, Luzio y Mayer (1983) demostraron la capacidad de la dextranasa para catalizar la ruptura de la sacarosa y la formación de los enlaces glucosídicos  $\alpha(1-6)$  de la dextrana. Así también observaron que en los primeros momentos de la reacción de síntesis, la ruptura de la sacarosa era más rápida que la formación de dextrana y que conforme la reacción se desarrollaba, la relación disminuía rápidamente hasta un punto donde la formación de la dextrana era la actividad predominante sobrepasando dos veces la velocidad de ruptura.

Estos investigadores concluyeron que la hidrólisis de la sacarosa era competitiva con la polimerización y con la transferencia de residuos D-glucosídicos, presentándose evidencia de que una sola enzima catalizaba las tres reacciones; así propusieron la existencia de una forma D-glucosilada de la enzima que era común a las tres actividades.

Por otro lado, aunque la sacarosa es el sustrato específico para la dextransacarasa, se ha encontrado que el fluoruro de  $\alpha$ -D-glucopiranosil y el p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido son también sustratos para la enzima, aunque generan velocidades de reacción mucho más lentas que la obtenida con sacarosa (Robyt, 1986).

Por lo que al origen de la dextrana se refiere, Hehre (1946), demostró que las dextranas sintetizadas enzimáticamente en un ambiente libre de células, eran idénticas serológica y químicamente a las dextranas elaboradas en cultivos con bacterias de los cuales deriva la enzima.

#### B. MECANISMO DE SINTESIS ENZIMATICA DE DEXTRANA.

Se puede considerar la acción catalítica de la dextransacarasa como una combinación de reacciones que hacen intervenir al sustrato y a las moléculasceptoras al lado de los sitios activos de la enzima. En este caso, tres actividades pueden estar asociadas al sitio activo de la enzima: el enlace y la hidrólisis del sustrato y la transferencia de grupos  $\alpha$ -D-glucopiranosil a una molécula aceptora.

El equipo de Robyt de la Universidad del Estado de Iowa (1974-1979) publicó una serie de trabajos que demuestran el mecanismo de acción catalítica de la dextransacarasa de Leuconostoc mesenteroides. Ese mecanismo hace intervenir un complejo enzimático activo entre la dextransacarasa, la glucosa y la dextrana. La glucosa es enlazada entre la

enzima y la dextrana por un ataque nucleofílico del oxígeno ligado al carbono 6 de la glucosa, sobre el carbono 1 de la dextrana, para formar un enlace glucosídico  $\alpha(1-6)$ . Un grupo nucleofílico del sitio activo de la enzima es entonces liberado y permite la hidrólisis de la sacarosa, así como la formación de un complejo glucosil-enzima. El oxígeno ligado al carbono 6 de esa glucosa repite el mecanismo, atacando al carbono 1 de la dextrana (Fig. 3)

Este mecanismo implica la existencia de dos grupos catalíticos equivalentes sobre la enzima: X1 y X2. Inicialmente los dos grupos atacan a dos moléculas de sacarosa dando 2 complejos glucosídicos. A continuación, el oxígeno ligado al carbono 6 de uno de estos 2 grupos efectúa un ataque nucleofílico sobre el carbono 1 del otro grupo, formando el enlace  $\alpha(1-6)$ . Se lleva a cabo al mismo tiempo otro ataque nucleofílico a una nueva molécula de sacarosa, de tal manera que la cadena en crecimiento va desplazándose de uno a otro de los grupos catalíticos. El mecanismo se repite nuevamente con el ataque del oxígeno del carbono 6. en esta ocasión, de la tercera unidad de glucosa sobre el carbono 1 de la segunda unidad.

La terminación de la cadena se realiza cuando la fructosa alcanza la concentración suficiente para competir con el complejo glucosil-enzima de uno de los sitios activos. En este caso, la dextrana es liberada y el crecimiento de la cadena es detenido (Fig. 4). En este mecanismo un grupo hidroxilo de la molécula aceptora, efectúa un ataque nucleofílico sobre el carbono 1 de la dextrana.

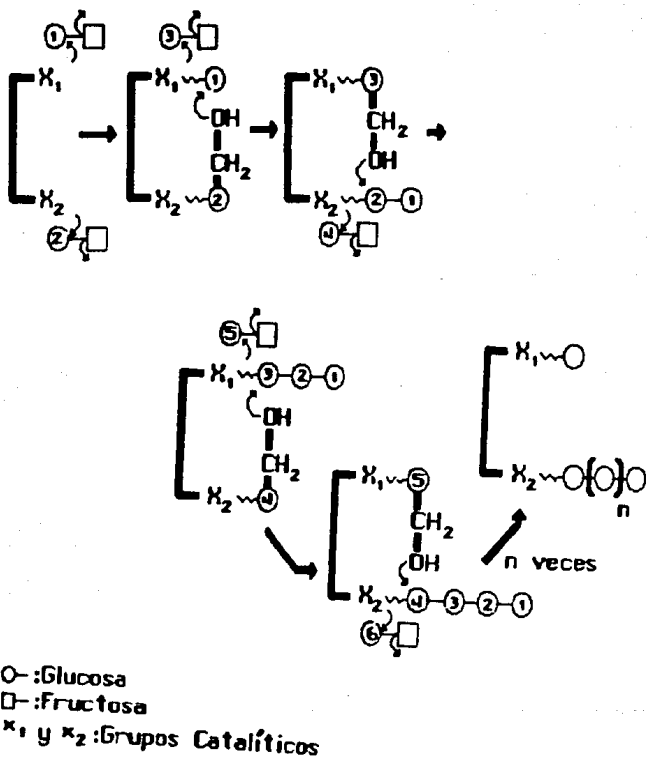


FIGURA 3.- MECANISMO DE SINTESIS ENZIMATICA DE DEXTRANA



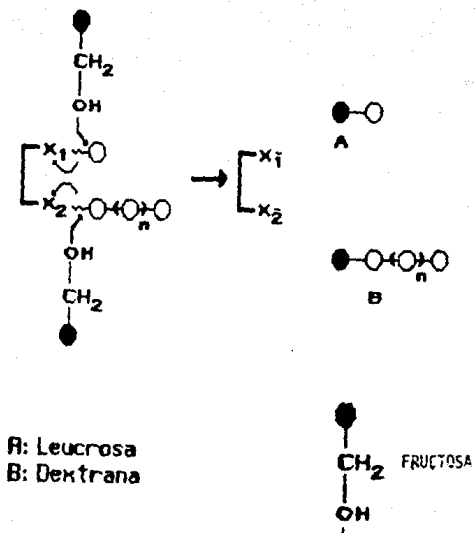


FIGURA 4.- MECANISMO DE TERMINACION DE LA CADENA DE DEXTRANA ( REACCION DE ACEPTOR ).

### C. REACCIONES DE ACEPTOR.

Cuando al sistema sacarosa-dextranasa se le añaden otros carbohidratos diferentes a la sacarosa, el grupo D-glucosil de la sacarosa es desviado de la síntesis de dextrana y es incorporado al carbohidrato añadido llamado aceptor. Cuando el aceptor es un azúcar de bajo peso molecular, tal como un monosacárido, disacárido o trisacárido, el producto es también de bajo peso molecular, incrementándose sólo por el peso molecular del grupo D-glucosil añadido. Algunos de estos productos son a su vez aceptores, y en estos casos, el resultado es una serie de productos aceptor homólogos (Robyt y Walseth, 1978).

No obstante, con otros azúcares, los productos obtenidos se clasifican como aceptor pobre o no aceptor. Tal es el caso de la reacción de la D-fructosa como aceptor para formar el disacárido leucrosa (5-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-fructopiranososa), el cual ya no actúa como aceptor (Robyt y Walseth, 1978).

Se ha observado que una gran diversidad de carbohidratos pueden actuar como aceptores. La tabla 2 muestra algunos de ellos con los productos resultantes de la acción de la dextranasa de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F.

TABLA 2. ACEPTORES Y PRODUCTOS DE ACEPTOR DE LA REACCION DE DEXTRANSACARASA DE Leuconostoc mesenteroides B-512F CON SACAROSA.

ACEPTOR	PRODUCTOS GENERADOS
D-Glucosa	series de isomaltodextrinas
D-Fructosa	leucrosa e isomaltulosa
D-Manosa	$\alpha$ -D-glucopiranosil-B-D-manopiranosido
D-Galactosa	$\alpha$ -D-glucopiranosil-B-D-galactofuranosido
Isomaltosa	series de isomaltodextrinas
Maltosa	panosa y homólogos superiores de isomaltodextrina
Lactosa	2(Gluc)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-lactosa
Dextrana B-512F	$\alpha$ (1-3)-dextranosil-dextrana o $\alpha$ (1-3)-glucopiranosil-dextrana

Fuente: Robyt, 1986.

Los estudios relacionados con el mecanismo de reacciones de aceptor (Robyt y Walseth, 1978), demuestran que éste interactúa con el intermediario enzima-glucosil o enzima-dextranosil para liberar las unidades D-glucosil o dextranosil del sitio activo de la enzima, con la formación de un enlace covalente entre la D-glucosa o la dextrana y el aceptor. La reacción de aceptor termina la polimerización de la dextrana, liberándola del sitio activo.

Durante la síntesis de dextrana, a partir de sacarosa por la dextransacarasa B-512, los disacáridos leucrosa e isomaltulosa son formados siempre como subproductos, resultantes de las reacciones de aceptor de la D-fructosa liberada de la sacarosa en la reacción de polimerización. Adicionalmente existiría una actividad invertasa asociada a la enzima si el agua actúa como aceptor y libera la unidad D-glucosil del sitio activo de la enzima.

La maltosa es considerada el aceptor más efectivo en la reacción con dextransacarasa. Sus productos son miembros de la serie isomaltodextrin-maltosa con grados de polimerización de 3 a 6, desviando más del 75% de las unidades D-glucosil de la sacarosa a la formación de estos productos (Robyt y Eklund, 1983); entre ellos se encuentra un triolósido llamado panosa ( $\alpha(1-6)$ -D-glucosilmaltosa), como sus homólogos isomalto - oligósidos.

Los trabajos de Tsuchiya et al. (1953) y de Oriol (1982), han puesto de manifiesto los factores que afectan el peso molecular de las dextranas sintetizadas enzimáticamente y enfatizan el efecto que tiene la relación sustrato-aceptor, en el grado de polimerización de la dextrana sintetizada.

Por otra parte, Hehre en 1953, demostró que las dextranas de peso molecular pequeño actúan como aceptores de una forma más eficiente que la maltosa o la glucosa, para la modificación de la síntesis de dextrana, aunque esta relación posteriormente fue estudiada con mayor profundidad por Paul et al. (1984, 1986), demostrando que la adición de aceptores tal como la maltosa al medio de síntesis de dextrana, resulta en un aumento significativo en la velocidad de reacción y favorece la producción de oligosacáridos, debido a que la transferencia de los residuos glucosídicos al aceptor añadido es más rápida que al complejo enzima-dextranosil.

#### D. FORMACION DE RAMIFICACIONES.

La biosíntesis de enlaces  $\alpha(1-3)$  (ramificaciones) de la dextrana de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F, fue estudiada en 1976 por Robyt y Taniguchi. Estos autores demostraron que este tipo de enlaces, se producen cuando un grupo hidroxilo del carbono 3 de la dextrana libre en solución, efectúa un ataque nucleofílico al carbono 1 del grupo glucosil o del grupo dextranosil del complejo glucosil-enzima o dextranosil-enzima. De esta forma se libera a la glucosa o a la dextrana y se forma un enlace ramificado entre la dextrana aceptora y la glucosa o la dextrana de la enzima (Fig. 5). Esta reacción detiene el crecimiento de la dextrana y cuando el aceptor es la misma dextrana, provee un mecanismo para la síntesis de enlaces ramificados.

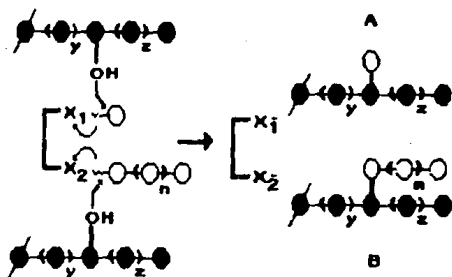


FIGURA 5.- MECANISMO DE FORMACION DE RAMIFICACIONES

- A : DEXTRANA CON UNIDAD GLUCOPIRANOSIL UNIDA CON ENLACE  $\alpha(1-3)$   
 B.- DEXTRANA CON CADENA RAMIFICADA EN (1-3)  
 Y y Z : NUMERO INDEFINIDO DE UNIDADES GLUCOPIRANOSIL UNIDAS EN  $\alpha(1-6)$

Braswell et al. (1962) mostraron que durante el curso de la reacción de síntesis enzimática de dextrana B-512F, la velocidad de ramificación se incrementa paralelamente al peso molecular de la dextrana, mientras que la viscosidad intrínseca del medio de reacción disminuye a causa de la variación del grado de ramificación.

## II.2. DEXTRANSACARASA.

La dextransacarasa es una glucosiltransferasa, que cataliza la reacción de síntesis de dextrana a partir de sacarosa. Varios microorganismos son capaces de producirla en forma extracelular, principalmente entre los géneros Leuconostoc, Streptococcus y Lactobacillus.

La cepa más estudiada productora de dextransacarasa es Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F. Este microorganismo en condiciones favorables, excreta al medio de cultivo la enzima.

Estudios sobre la composición de la dextransacarasa B-512F han mostrado que esta enzima está constituida por ácido aspártico (12.52%), glicina (13.38%), ácido glutámico (10.41%), lisina (10.01%), arginina (9.67%) y alanina (8.81%). Así mismo, la enzima muestra un peso molecular de 280,000 daltons. (Ebert y Schenk, 1968).

En general, la dextransacarasa de Leuconostoc mesenteroides tiene un óptimo de actividad a pH de 5 y a 30°C. Los valores de  $K_m$  para la sacarosa son del orden de 0.01 a 0.001 M.

En 1979, Robyt y Walseth realizaron la hidrólisis ácida de la dextranosa B-512F purificada y mostraron que se trata de una glicoproteína, cuya fracción carbohidrato está principalmente constituida por D-manosa así como por trazas de glucosa y galactosa.

Algunos iones metálicos inactivan a la dextranosa B-512F, sin embargo, el calcio restaura la actividad enzimática. Por este motivo se ha pensado que la enzima existe bajo la forma de una metaloenzima con el calcio (Brock Neely, 1960).

De igual forma, Robyt y Walseth (1979), observaron que la dextranosa B-512F purificada y almacenada a 4°C perdía rápidamente su actividad mientras que el almacenamiento a -15°C reducía aproximadamente el 60% de la actividad enzimática en un período de 20 días. Sin embargo demostraron que la adición de 4 mg/ml de dextrana estabilizaba a la enzima, manteniendo su actividad original durante el mismo período de tiempo.

Estos mismos autores demostraron que la dextranosa B-512F purificada, presenta dos bandas con actividad dextranosa en electroforesis sobre gel de poliacrilamida y que existe un fenómeno de agregación de la enzima, aparentemente producido por interacciones entre las mismas moléculas de la enzima y que no es debido al complejo que forma la enzima con la dextrana.

Por otro lado existen algunos estudios sobre la caracterización de dextranosas producidas por otras cepas de Leuconostoc, como es el caso del trabajo realizado por Kobayashi y Matsuda (1975) sobre la caracterización de las dextranosas de Leuconostoc mesenteroides



NRRL B-1299. Estos investigadores encontraron que la cepa B-1299 presentaba 2 enzimas relacionadas con esa actividad, con pesos moleculares de 69,000 para la enzima I y 79,000 para la enzima II, determinados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, estas dos enzimas no presentaron subunidades estructurales. La enzima I mostró un pH óptimo de actividad de 6.3 - 6.5, mientras que la enzima II de 5.5 a 5.9. Se reportaron, así mismo, valores de Km para la sacarosa de 10.7 y 250 mM para las enzimas I y II respectivamente. El polímero sintetizado por la enzima II está constituido por una cadena principal de enlaces  $\alpha(1-6)$  que constituye el 66% de los enlaces totales, 27% de enlaces  $\alpha(1-2)$  y un 1% de  $\alpha(1-3)$ . La dextrana producida por la enzima I está constituida por un 65% de enlaces  $\alpha(1-6)$  lineales y 35% de enlaces ramificados  $\alpha(1-2)$ .

Côté y Robyt (1982) estudiaron las glucansacarasas de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1355 y observaron que el microorganismo produce dos enzimas que sintetizan dos  $\alpha$ -D-glucanos diferentes. Separaron los polímeros llamándolos fracción L y S; la fracción L resultó ser una dextrana similar a la que produce la cepa B-512F con un 95% de enlaces  $\alpha(1-6)$  y 5% de enlaces ramificados  $\alpha(1-3)$ . La fracción S fue denominada "alternan" debido a que su estructura estaba compuesta de una secuencia alternada de enlaces  $\alpha(1-6)$  y  $\alpha(1-3)$  y el polímero fue resistente a la hidrólisis con endodextranasa. Por tal motivo, la enzima que sintetizó la fracción S fue llamada alternansacarasa que presentó un pH óptimo de actividad de 5.5.

### II.3. PRODUCCION DE DEXTRANSACARASA.

El proceso tradicional de producción de dextransacarasa se lleva a cabo por el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F en soluciones de sacarosa fortificada con nutrimentos y manteniendo condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo. Durante la fermentación líquida la bacteria crece fermentando la sacarosa y excretando la dextransacarasa al medio de cultivo, de donde posteriormente puede ser purificada.

#### A. FUENTES DE DEXTRANSACARASA.

Como se mencionó anteriormente, una variedad de bacterias pertenecientes al grupo Lactobacillaceae producen la dextransacarasa. El microorganismo típico para la producción de esta enzima es Leuconostoc mesenteroides, esta bacteria es miembro de la familia Streptococcaceae, género Leuconostoc. Las células pueden ser esféricas pero frecuentemente son lenticulares y usualmente existen en pares y en cadenas. Es gram positivo y anaerobio facultativo, no presenta movilidad y no forma esporas. Sus colonias son pequeñas, generalmente menores de 1 mm de diámetro. Los cultivos en caldos nutritivos presentan una turbidez uniforme y algunas cepas forman largas cadenas que tienden a sedimentarse. La temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 30 °C, es no patogénico, y requiere ácido nicotínico, tiamina, biotina, ácido pantoténico, así como los aminoácidos valina y ácido glutámico para su crecimiento.

El crecimiento de este microorganismo depende de la presencia de un carbohidrato fermentable: la glucosa es fermentada por la vía hexosa monofosfato produciendo ácido láctico, dióxido de carbono y etanol. Existe también un metabolismo aerobio oxidativo, que produce dióxido de carbono, ácido láctico y acético. No es un microorganismo proteolítico y algunas cepas formadoras de dextrana contienen dextranasa unida a la pared celular. Aunque en algunas cepas se presenta quitina capsular, no se forma una verdadera cápsula bacteriana (Garvie, 1966). Su crecimiento se realiza a valores de pH de 5 a 7 y las cepas productoras de dextrana pueden ser aisladas de la caña de azúcar.

### **B. FERMENTACIÓN CONVENCIONAL.**

Durante la fermentación convencional ocurren 3 fases:

1. Fase de crecimiento del microorganismo.
2. Fase de producción de la enzima.
3. Fase de reacción entre la enzima y la sacarosa produciendo dextrana.

En los estudios de Tsuchiya et al. (1952) sobre los efectos de ciertos factores del medio de cultivo en la producción de dextranasa, se demostró que la sacarosa es esencial para la producción de la enzima. El microorganismo puede crecer teniendo como fuente de carbono glucosa, fructosa o maltosa, pero sin inducción de la dextranasa.

Durante el curso de la fermentación, el pH del medio de cultivo decrece debido a que el microorganismo produce ácido láctico al fermentar la sacarosa.

El efecto de la concentración inicial de sacarosa fue estudiado también por Tsuchiya, habiendo determinado que el rendimiento de la enzima es óptimo a concentraciones de sacarosa del 5%. Sin embargo, a estos niveles la viscosidad del medio es alta por la producción de dextrana, lo que dificulta la separación de las células al concluir la fermentación. De esta manera definió una concentración óptima de sacarosa del 2% para producir la enzima.

Así también, determinó un pH inicial de 6.7 para la máxima producción de enzima y observó que los iones amonio ejercen un efecto desfavorable sobre el crecimiento del microorganismo y por lo tanto, sobre la producción de la dextransacarasa. Por esta razón recomendó la utilización de soluciones de NaOH o KOH para controlar el pH del medio de cultivo.

Dentro del intervalo de temperatura de 20 a 29°C, Tsuchiya et al. (1952) observaron el máximo rendimiento enzimático a 23 °C, alcanzando una actividad final de dextransacarasa de 40 a 70 UDS/ml (UDS = Unidades dextransacarasa).

Hasta hace poco estas condiciones se consideraban como las óptimas para la producción de dextransacarasa. Sin embargo, el sistema empleado por López y Monsan (1979), resultó en niveles mucho más elevados de dextransacarasa. Se reportan 180 UDS/ml, mientras que Alsop (1983) reproduciendo el método

de Schneider obtuvo 300 UDS/ml. Las elevadas concentraciones de dextran-sacarasa, se obtuvieron gracias a la cuidadosa optimización de las condiciones del proceso, y en particular al control de los niveles de sacarosa durante la fermentación. Dichas concentraciones se mantuvieron alrededor de 0.5 a 1.0% por adición continua de sacarosa, particularmente durante la fase de crecimiento donde la producción de la enzima es inducida.

#### pH DEL MEDIO DE FERMENTACION.

Koepsell et al. (1952) determinaron un pH óptimo de 6.5 - 7.0 para la producción de la enzima y un pH de 5.0 - 5.2 para la máxima actividad enzimática así como para la estabilidad, pues a pH de 6.7 la enzima es muy inestable.

Alsop (1983), sugiere que la fermentación se lleve a cabo regulando el pH a 6.7 para favorecer la producción de enzima y que al término de la fermentación, el pH del medio se ajuste a un valor de 5.2 para favorecer la estabilidad enzimática.

### TEMPERATURA.

La regulación de la temperatura de la fermentación es un parámetro crítico e interdependiente del pH. Así aunque Koepsell (1952) mostró que el pH 6.7 es óptimo para el crecimiento, este valor es aplicado para una temperatura de 23 °C. La temperatura óptima para el crecimiento de Leuconostoc es de 29 a 30°C, pero este valor es muy alto para una máxima productividad de enzima. Como se puede ver, la combinación ideal de temperatura y pH óptimos es extremadamente crítica para la obtención de máximos rendimientos de la enzima.

### AIREACION.

Jeanes et al. (1948), observaron que la aireación del medio de cultivo desfavorecía la formación de dextrana aparentemente sin afectar la producción de enzima. Como consecuencia, se evitaba el aumento de viscosidad en el medio y la separación de células se realizaba fácilmente.

Alsop (1983), reporta que mediante la aireación se incrementa el crecimiento del microorganismo y por consecuencia la producción de la enzima.

## NUTRIMENTOS.

El medio de crecimiento para Leuconostoc mesenteroides y de producción de dextransacarasa, deberá contener sacarosa como fuente de carbono, una fuente de nitrógeno orgánico, generalmente sólidos de agua de remojo de maíz o extracto de levadura, que adicionalmente provean de factores de crecimiento necesarios para el microorganismo. Además, es necesaria una fuente de fosfato, normalmente  $K_2HPO_4$ , que tiene la capacidad adicional de amortiguar el pH del medio de cultivo. Por otra parte es importante adicionar elementos traza para asegurar un buen desarrollo de la bacteria. Koepsell y Tsuchiya (39) reportaron la utilización de una mezcla de minerales, conocida como "sales R", que incluye sales de magnesio, manganeso, hierro y sodio. En estudios más recientes se introdujo el empleo de cloruro de calcio al 0.005% para obtener una mayor estabilidad de la enzima (López y Monsan, 1980). Así también, la adición de un detergente no-iónico como el Tween-80 a concentración de 0.1% ha demostrado estabilizar completamente a la dextransacarasa, según datos reportados por Miller y Robyt (1984); además de que este tensoactivo ayuda a la permeabilización de la pared celular del microorganismo, favoreciendo la excreción de la enzima al medio de cultivo.

### C. FERMENTACION DISCONTINUA.

Tomando en cuenta que la sacarosa juega un doble papel en la producción de dextran sacarasa, como sustrato y como inductor de la enzima, A. López (1979) realizó una serie de experimentos que lo condujeron a la obtención de altos rendimientos de enzima. López produjo la dextran sacarasa B-512F, partiendo de un medio de sacarosa al 2% y añadiendo en forma continua durante el crecimiento del microorganismo, una solución de sacarosa de 1kg/l a razón de 20 g/l\*h. De esta forma la fermentación se prolongó por 10 horas y se obtuvieron 180 UDS/ml, debido a que la velocidad de adición fue muy semejante a la velocidad de consumo de sustrato.

Los estudios hasta aquí reportados se refieren a la dextran sacarasa B-512F. Sin embargo en los escasos reportes sobre producción de dextran sacarasa B-523 y dextran sacarasa B-1498 se utiliza el mismo medio de cultivo.

### II.4. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA.

Las técnicas convencionales utilizadas para la purificación de enzimas, se basan principalmente en propiedades fisicoquímicas de las partículas, tal es el caso de la carga eléctrica en la electroforesis, el peso molecular en la cromatografía de exclusión en gel, las fuerzas de atracción entre moléculas en la extracción líquido-líquido. Entre estas técnicas, la extracción líquido-líquido resulta de particular interés para la purificación de dextran sacarasa.



En los procesos biológicos, la extracción con solventes orgánicos es utilizada sólo en casos muy específicos, debido a que las biomoléculas son generalmente dañadas por tal tratamiento. Las grandes diferencias en tensión superficial y constante dieléctrica entre soluciones acuosas y solventes orgánicos, causa el desdoblamiento de las biomoléculas por la exposición al mismo tiempo a los dos solventes (Mattiasson, 1983); de esta forma, los sistemas acuosos resultan como alternativa para la separación de enzimas.

#### A. EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO CON POLIETILENGLICOL.

Las moléculas de tamaño importante y solubles en un mismo solvente, conducen frecuentemente a la aparición de fases líquidas inmiscibles. Este fenómeno es llamado "incompatibilidad de polímeros". La razón de la incompatibilidad es la incapacidad de la cadena polimérica para penetrar dentro de la estructura del otro polímero. Por lo tanto, si se mezcla un polímero A con un polímero B a ciertas concentraciones, no se obtienen mezclas homogéneas sino grandes agregados de macromoléculas con una fuerte tendencia hacia la separación de fases (Kula, 1979).

Entre los sistemas bifásicos más conocidos, se encuentra el sistema dextrana-poli(etilenglicol) (PEG). En este sistema, la separación de fases en agua, es la consecuencia de la desestabilización del sistema por la introducción de dos especies moleculares, una de las cuales presenta un carácter hidrofóbico netamente superior al otro. El polímero hidrofóbico

(en este caso el PEG) impone una disminución de la entropía del agua alrededor de los grupos CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, quedando el sistema soluble gracias a las funciones éter y alcohol.

La separación de fases comienza cuando el nivel energético de moléculas de agua, ligadas a la dextrana, es superior al nivel energético de las moléculas libres asociadas entre ellas. De esta forma, el comportamiento de los polímeros en solución, puede caracterizarse por un diagrama de fases como el que se presenta en la figura 6. En este sistema, la dextranasa es obtenida en la fase rica en dextrana, ya que la enzima se encuentra ligada a las cadenas de polímero naturalmente existentes en la fermentación.

La distribución de moléculas entre las dos fases es caracterizada por el coeficiente de partición (K part), definido como la relación de las concentraciones en la fase superior (C sup) y la fase inferior (C inf).

$$K \text{ part} = C \text{ sup} / C \text{ inf}$$

En el sistema dextrana-PEG, el coeficiente de partición de algunas enzimas varía ligeramente con la temperatura; los valores del coeficiente de partición usualmente son más altos a baja temperatura, pero el trabajar a temperatura ambiente favorece el decremento de la viscosidad del sistema y posteriormente resulta más fácil la recuperación de la fase dextrana. De esta manera, la extracción en sistemas acuosos, ofrece una técnica

### DIAGRAMA DE FASES

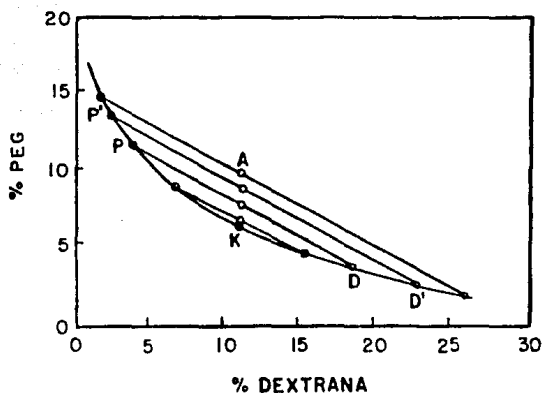


FIGURA 6.- DIAGRAMA DE FASES DEL SISTEMA DEXTRANA-POLIETILENGLICOL

Las líneas PD o P'D' representan la composición de las dos fases en equilibrio.  
 Los puntos P y P' representan la composición de la fase rica en polietilenglicol.  
 Los puntos D y D' representan la composición de la fase rica en dextrana.  
 El punto A representa la composición total del sistema.  
 K es el punto crítico.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### III. 1. PRESERVACION DE LAS CEPAS.

Las cepas fueron obtenidas de la colección NRRL (Northern Regional Research Laboratory) de Peoria, IL. (USA). Los liofilizados fueron disueltos en 50 ml del medio reportado por López y Monsan, 1980 (medio A, tabla 3) y fueron incubados a 30°C durante 12 horas. Posteriormente se tomaron muestras de 1 ml de este cultivo en viales, se les añadió 1 ml de glicerol al 30% y se preservaron en congelación a -15°C. Cada vial se utilizó como iniciador de un inóculo.

#### III.2. PRODUCCION DE DEXTRANSACARASA.

##### MEDIO DE CULTIVO.

Se tomó como base el medio de cultivo reportado por López y Monsan (1980), para el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F (medio A, Tabla 3) y se probó otro medio de cultivo (medio B) agregando maltosa y Tween 80 al medio A (Tabla 3).

TABLA 3. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

M E D I O    A*	
( g / l )	
SACAROSA	20
EXTRACTO DE LEVADURA	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub>	0.2
CaCl <sub>2</sub>	0.05
NaCl	0.01
MnSO <sub>4</sub>	0.01
FeSO <sub>4</sub>	0.01

M E D I O    B *	
( g / l )	
M E D I O    A	
+	
MALTOSA	10
TWEEN 80	1

\* El pH del medio de cultivo se ajusta a 6.9 con ác. orto-fosfórico.

### DESARROLLO DEL INOCULO.

Para el desarrollo del inóculo se tomó una muestra de la cepa preservada (vial congelado) y se inoculó en un matraz con 50 ml del medio de cultivo A, se incubó a 30°C en una incubadora con agitación recíprocante Mod. R-25 de New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA a 100 rpm y durante 12 h; de esta forma se realizan los inóculos para iniciar cada fermentación.

### CONDICIONES DE FERMENTACION.

Se realizaron fermentaciones líquidas en matraces Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de 200 ml del medio A y B bajo las siguientes condiciones:

- 10% de inóculo
- Temperatura controlada a 29°C
- Agitación de 100 rpm
- pH inicial del medio de cultivo de 6.9 (sin control)
- Tiempo aproximado de fermentación 7 - 9 h

También se realizaron fermentaciones retroalimentadas como las descritas por A. López (1979), en dos tipos de fermentadores. Primeramente se utilizó un fermentador de 0.5 l BioFlo Mod. C30 de New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA, con controlador de pH Mod. pH-22 y posteriormente se

utilizó un fermentador de 4 l de volumen de trabajo, de Lh Fermentation 2000 Series I; estas fermentaciones se realizaron bajo las siguientes condiciones:

- 10% de inóculo
- Temperatura controlada a 29°C
- Agitación de 600 rpm
- Aireación de 1 vvm
- pH controlado a 6.9, con una solución de sacarosa 400g/l en NaOH 2N
- Tiempo aproximado de fermentación: 7 - 9 h

#### CONTROLES DURANTE LA FERMENTACION.

Durante la fermentación se tomaron muestras cada hora y el crecimiento celular se determinó por densidad óptica a 650 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 3A Perkin Elmer Mod. 41. A estas muestras se ajustó el pH a 5.2 con ácido orto-fosfórico y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min y al sobrenadante se le midió la actividad de dextransacarasa presente.

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La actividad dextranasa presente se estimó por medición de los azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática, en presencia de 10% de sacarosa a 30°C y pH = 5.2, por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Sumner y Howell (1935).

Una unidad dextranasa (UDS) está definida como la cantidad de enzima que convierte 1 mg de sacarosa en dextrana en una hora a 30°C y pH 5.2 (determinada por el incremento en el poder reductor calculado como fructosa) (Koeppell et al., 1952).

La actividad enzimática ha sido igualmente expresada por Kaboli y Reilly (1980), como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de azúcar reductor en 1 minuto (U) a pH 5.2 y 30°C. La equivalencia entre estas dos definiciones de actividad es la siguiente: 1 U = 20.52 UDS.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo midiendo la velocidad inicial de producción de fructosa. En una celda de vidrio enchaquetada, a 30 °C y con agitación magnética, se pone en contacto 10 ml de una solución enzimática diluida en buffer de acetatos pH 5.2 de forma que presente una actividad entre 10 y 40 UDS/ml, con 2 ml de una solución de sacarosa de 600 g/l para obtener una concentración final de sacarosa de 100 g/l.



## DETERMINACION DE PROTEINA.

La determinación de proteína soluble, tanto de los sobrenadantes de fermentación como de las preparaciones enzimáticas, se realizó siguiendo el método de Lowry modificado por Peterson (1977).

### III.3. PURIFICACION DE DEXTRANSACARASA.

Al término de la fermentación, se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.2 con ácido orto-fosfórico y se centrifugó para separar el material celular a 12.000 rpm. durante 15 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada Janetzki K24. Mod. MLW. Cuando se realizaron fermentaciones de 4 l. se utilizó una centrífuga continua marca Sharpless a una velocidad de 15,000 rpm con un flujo de 100 ml/min.

## EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.

Dadas las ventajas que ofrece la extracción líquido-líquido con PEG en este sistema y basándonos en los estudios de Paul et al, (1983), en el presente trabajo se eligió este método para la purificación de la dextransacarasa. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se purificó mediante una extracción líquido-líquido, utilizando polietilenglicol 1500 (PEG 1500).

Se preparó una solución de PEG 1500 a 500 g/l y se añadió lentamente al sobrenadante con agitación constante, hasta alcanzar la separación de fases. La fase inferior rica en dextrana (asociada a la dextransacarasa) se resuspendió en una solución amortiguadora de acetato de sodio (0.05 M, pH 5.2) constituyendo así la solución enzimática que se mantuvo a temperatura de congelación hasta ser utilizada.

#### ELECTROFORESIS.

Se realizaron electroforesis en placa sobre gel de poliacrilamida al 7.5% , pH 8.3 , en condiciones desnaturizantes por el método reportado por Weber y Osborn (1969), utilizando dodecilsulfato de sodio y B-mercaptoetanol, para la determinación del peso molecular de las proteínas presentes en la preparación enzimática de la dextransacarasa B-523.

Así también se realizaron electroforesis similares pero en condiciones no desnaturizantes.

#### III.4. SINTESIS ENZIMATICA DE DEXTRANA.

La síntesis de dextrana se realizó en un volumen de reacción de 100 ml a una concentración de sacarosa de 100 g/l a 30°C en buffer acetatos pH 5.2, con una concentración enzimática de 20.52 UDS/ml.

La conversión de sacarosa a dextrana fue monitoreada por la determinación de azúcares reductores libres en el medio de reacción por el método del DNS antes mencionado (Summer y Howell, 1935).

En el caso de la dextransacarasa B-523, la síntesis de dextrana fue seguida también por la determinación de la viscosidad aparente del medio de reacción, con un viscosímetro Brookfield, Mod. RVT de Brookfield Engineering Lab. con una aguja del No. 3 a una velocidad de 100 rpm y una temperatura de 25°C.

Cuando la reacción de síntesis terminó, se realizó una precipitación fraccionada añadiendo lentamente etanol al 99% con agitación constante, para separar la dextrana sintetizada.

Para el caso de la dextransacarasa B-523, al término de la síntesis, el medio de reacción se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min para separar el polisacárido insoluble formado, posteriormente al sobrenadante se le realizó la precipitación fraccionada ya mencionada.

Después de precipitar el polisacárido, la solución se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y el polímero precipitado fue secado en una estufa de vacío a 20 in de Hg y 30°C.

### III.5. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA DEXTRANSACARASA.

Para la determinación de las constantes cinéticas se realizaron una serie de reacciones enzimáticas a diferentes concentraciones de sustrato siguiendo los métodos clásicos de cinética enzimática.

### III.6. DETERMINACION DEL pH Y TEMPERATURA OPTIMOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Se realizaron una serie de reacciones enzimáticas a diferentes valores de pH y temperaturas con un volumen de reacción de 5 ml, una concentración de sacarosa de 100 g/l y una actividad enzimática de 20.52 UDS/ml. Se midieron las velocidades iniciales de reacción por el monitoreo de los azúcares reductores liberados durante el curso de la reacción.

### III.7. REACCIONES DE ACEPTOR.

Las reacciones de aceptor se realizaron de la misma forma que las reacciones de síntesis de dextrana, añadiendo además maltosa como aceptor a concentraciones de 10, 25 y 50 g/l, para obtener una relación sacarosa/maltosa de 10, 4 y 2 respectivamente. Durante el curso de cada reacción se tomaron muestras a las que se les determinaron azúcares reductores libres. Las muestras se filtraron y fueron analizadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

### III.8. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE DEXTRANA.

Para la caracterización de los polímeros producidos se realizaron hidrólisis enzimáticas de la dextrana, preparando soluciones de 10 g/l en buffer acetatos pH 5.4 y se añadieron 60 U/ml de la endodextranasa comercial Amano (Enzimas y Productos Químicos, SA de CV). La reacción de hidrólisis se desarrolló a 55°C. Durante el curso de la reacción se tomaron muestras cada hora, se filtraron y se analizaron por HPLC.

### III.9. ANALISIS DE CARBOHIDRATOS POR (HPLC).

Los azúcares involucrados en la síntesis de dextrana con aceptores así como en la hidrólisis de dextrana, fueron analizados por HPLC en fase inversa. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Beckman (Mod. 332, Gradient Liquid Chromatograph, Beckman Instruments Inc.), una columna

Altex Ultrasphere-ODS C18 (4.6 x 25 cm) con agua como sistema eluyente, un detector de índice de refracción Altex (Mod. 156, Beckman Instruments Inc.), un integrador Spectra-Physics (Mod. SP4270) y un graficador LKB Bromma (Mod. 2210).

Algunas muestras de productos de síntesis de dextrana con aceptores fueron eluidas con un sistema agua:metanol (96:4). Las condiciones de corrida son presentadas en cada cromatograma del siguiente capítulo de resultados.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

##### PARTE I. PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LA DEXTRANSACARASA

##### DE Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1498 (DS 1498).

Esta cepa fue seleccionada de la colección NRRL por el interés en el tipo de dextrana que produce; según el reporte de Jeanes et al., 1954, esta cepa produce 2 tipos de dextranas de diferentes características, que pueden ser separadas por precipitación fraccionada con etanol; de esta manera, a una concentración de 36-37% de alcohol precipita una fracción L llamada "menos soluble" que contiene 94% de enlaces  $\alpha(1-6)$  y 4% de  $\alpha(1-3)$ . Jeanes asegura que existe aparte una fracción S llamada "más soluble" que precipita a 40-44% de alcohol y que contiene 62% de enlaces  $\alpha(1-6)$ , 27% de enlaces  $\alpha(1-4)$  y 11 % de  $\alpha(1-3)$ . Sin embargo, el trabajo realizado por Seymour et al. en 1979 sobre las dextranas de la cepa B-1498, muestra que la fracción S está constituida por aproximadamente 50% de enlaces  $\alpha(1-6)$  y otro tanto de enlaces  $\alpha(1-3)$  y propone que la estructura es una secuencia alternada de residuos glucosídicos unidos en enlaces  $\alpha(1-6)$  y  $\alpha(1-3)$ . Por otra parte, con respecto a la fracción L, los resultados de Seymour et al. (1979) concuerdan perfectamente con los reportados por Jeanes et al.(1954).

#### IV.1. PRODUCCION DE DEXTRANSACARASA B-1498 (DS 1498).

##### A. FERMENTACION EN MÀTRAZ.

Se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer, utilizando tanto el medio A como el medio B. La figura 7 muestra el desarrollo de las dos fermentaciones por medición del crecimiento microbiano y la variación de pH.

Al término de las fermentaciones se observó un mayor crecimiento en el medio suplementado con maltosa (medio B) obteniéndose 8.9 mg de biomasa/ml, mientras que en el medio normal (medio A) se obtuvo 7.5 mg/ml de medio de cultivo. Sin embargo, la actividad enzimática de la fermentación con medio normal fue de 176.7 UDS/ml mientras que en la suplementada con maltosa se obtuvieron 156.8 UDS/ml. Lo interesante de esta cepa es que la actividad de 176.7 UDS/ml representa un valor cinco veces superior a la actividad obtenida con la cepa industrial B-512F producida en las mismas condiciones.

Por otra parte el crecimiento del microorganismo estuvo de acuerdo al modelo de Monod y tuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.67 1/h que resultó ser muy semejante a la velocidad a la cual se desarrolla la cepa B-512F (0.59 1/h).



## B. FERMENTACION RETROALIMENTADA.

Basándonos en los resultados obtenidos en las fermentaciones en matraz, se realizó una fermentación retroalimentada de 0.5 l. utilizando el medio de cultivo tradicional (medio A). El pH de la fermentación fue controlado a 6.9 con una solución alcalina de sacarosa, para favorecer el crecimiento del microorganismo y la producción de la enzima. La figura 8 presenta el crecimiento del

microorganismo en relación a la actividad enzimática producida. Como se puede observar, se obtuvieron hasta 230 UDS/ml a las 6 horas de fermentación, sin embargo, hay un decremento en la actividad hasta un valor de 210 UDS/ml en la siguiente hora de fermentación. En base a los resultados obtenidos, se observa un aumento del 30% en la actividad enzimática con respecto a la fermentación en matraz.

## IV.2. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA B-1498 (DS 1498).

El sobrenadante de fermentación libre de células y a un pH de 5.2 fue sometido a una extracción líquido-líquido con polietilenglicol. Se agregó paulatinamente la solución de PEG-1500 al 50% y se observó una perfecta separación de fases a una concentración final de 16.9% de PEG. La fase inferior rica en dextrana, donde se encuentra concentrada la enzima, fue recuperada por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min y resuspendida en 160 ml de buffer pH 5.2, constituyendo de esta forma una solución enzimática de 650 UDS/ml obteniéndose un rendimiento de casi el 100%. Los resultados se muestran en la tabla 4.

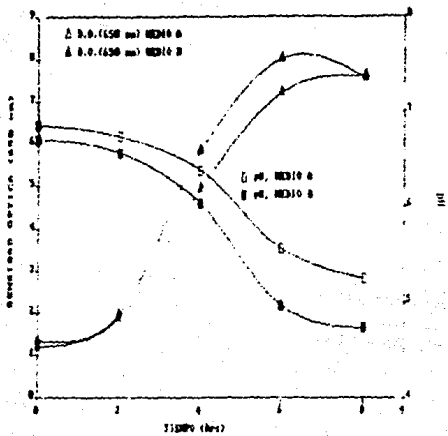


FIGURA 7.- FERMENTACION EN MATRAZ. L. mesenteroides NRRL B-143E

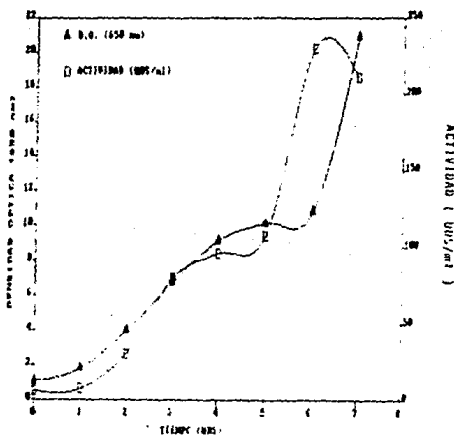


FIGURA 8.- FERMENTACION FED-BATCH: ( FED-BATCH )  
L. mesenteroides NRRL B-143E, medio A

TABLA 4. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA B-1498 POR EXTRACCION LIQUIDO - LIQUIDO CON PEG.

	SOBRENADANTE	FASE PEG	FASE DEXTRANA
VOLUMEN (ml)	500	750	160
ACTIVIDAD (UDS/ml)	210	0.42	650
CONCENTRACION DE PROTEINA (mg/ml)	4.16	----	5.21
ACTIVIDAD ESPECIFICA (UDS/mg prot)	50.4	----	124.7
RENDIMIENTO DE PURIFICACION (%)	----	----	99
FACTOR DE PURIFICACION	----	----	2.47

Como se puede observar, este método es excelente para la purificación de dextransacarasa, habiéndose recuperado en este ensayo casi la totalidad de la actividad enzimática y concentrándose 3 veces, con un factor de purificación de 2.47 veces. Esta técnica genera niveles de purificación muy elevados, debido a que la dextransacarasa siempre tiene dextrana adherida covalentemente, de forma que en estos sistemas PEG-dextrana la enzima migra a la fase dextrana mientras que otras proteínas pasan a la fase PEG. En este caso el 60% de las proteínas son eliminadas en la fase PEG.

#### IV.3. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA DEXTRANSACARASA B-1498.

Después de producir la dextransacarasa y de purificarla se trabajó con la solución enzimática concentrada para caracterizar el comportamiento de la enzima.

**A. DETERMINACION DEL pH Y TEMPERATURA OPTIMOS DE ACTIVIDAD  
ENZIMATICA (DS 1498).**

Se realizaron una serie de reacciones de síntesis enzimática con la DS 1498, variando la temperatura y el pH del medio de reacción. Se encontró que la temperatura óptima de actividad enzimática fue de 30°C y que el pH óptimo fue de 5.2. Estos parámetros son exactamente iguales a las condiciones óptimas de actividad enzimática para la DS 512F (Figuras 9 y 10).

**B. SINTESIS ENZIMATICA DE DEXTRANA B-1498.**

Las reacciones de síntesis de polímero fueron llevadas a cabo con la enzima DS 1498 así como con la DS 512F simultáneamente, ambos tipos de reacción fueron efectuadas a 30°C con una solución de sacarosa de 100 g/l pH 5.2 y una actividad enzimática de 20.52 UDS/ml.

Las dos reacciones de síntesis presentaron un aumento considerable en la viscosidad del medio de reacción durante el curso de la conversión de sacarosa a dextrana. Al término de esta reacción, la primera comparación entre los polímeros fue hecha en términos de la concentración de etanol a la cual precipitan. Se prepararon soluciones de polímero al 5% con el medio final de la síntesis, realizando la dilución apropiada. Se efectuó una precipitación fraccionada agregando poco a poco etanol y agitando vigorosamente. No se observó ningún precipitado a la

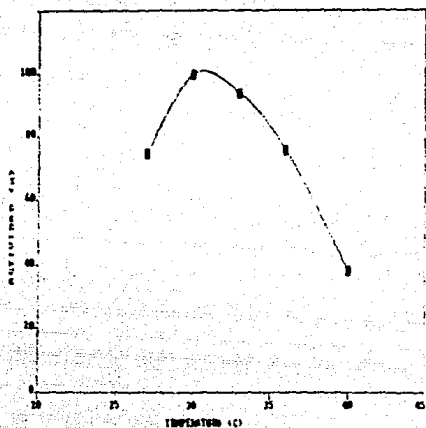


FIGURA 9. - TEMPERATURA OPTIMA DE ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA B-1498 .

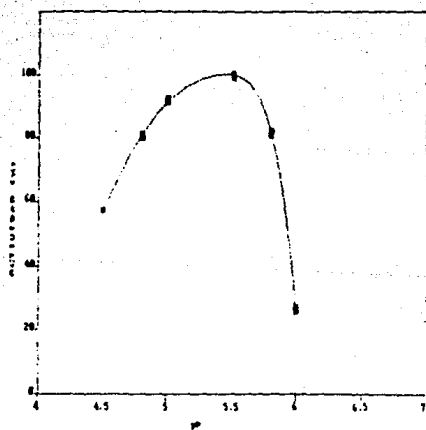


FIGURA 10. - pH OPTIMO DE ACTIVIDAD, DEXTRANSACARASA B-1498

concentración de etanol de 36-37% (en este punto, de acuerdo con Jeanes et al., 1954, debería precipitar el polímero denominado "fracción L"): A una concentración de 43% de etanol, precipitó toda la dextrana B-1498. El polímero se separó por centrifugación y al sobrenadante se le continuó añadiendo alcohol, sin que se observase precipitación alguna.

La conclusión después de varias precipitaciones es que la dextrana B-1498 precipitó casi a la misma concentración que la dextrana B-512F, es decir a 43.5% de etanol. Los polímeros precipitados fueron secados bajo un vacío de 20 in de Hg a 30°C. El rendimiento de la precipitación fraccionada fue de 95%.

#### C. REACCIONES DE ACEPTOR CON LA DEXTRANSACARASA B-1498

(DS 1498).

Los productos de la reacción de aceptor por la DS 1498 y DS 512F con maltosa a 50 g/l como aceptor, a una relación Sacarosa/Maltosa (S/M) = 2, fueron analizados por HPLC. Los cromatogramas de estas reacciones de aceptor se presentan en la figura 11, en la que se observa que los productos de las reacciones de aceptor son exactamente los mismos para ambas enzimas. Se forman los oligodextranos denominados DP3 (panosa), DP4 y DP5 resultantes de la transferencia de una, dos y tres moléculas de glucosa respectivamente en enlaces  $\alpha(1-6)$  a la maltosa.

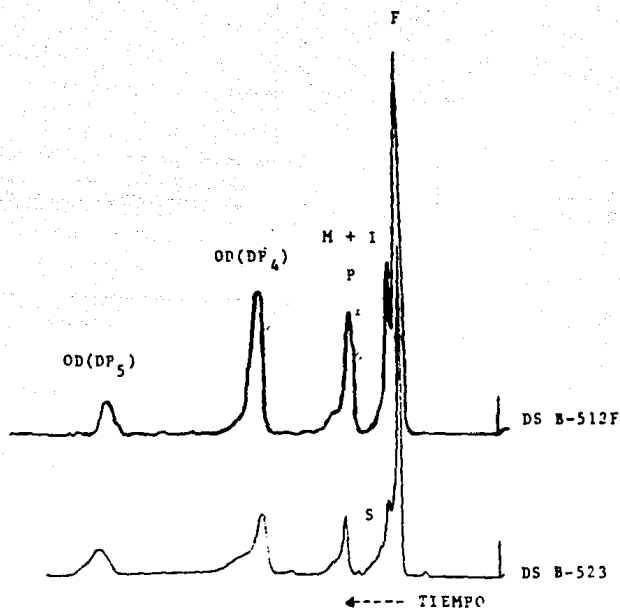


FIGURA 11.- CROMATOGRAMAS DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE ACEPTOR ( MALTOSA 5%) CON DEXTRANSACARASA B-512 F y B-1498.

CONDICIONES: - Inyección 10 ul , Flujo 1 ml/min.  
 Eluyente: agua, 64 IR  
 Velocidad del papel 5 mm/min.

NOTA : F= FRUCTOSA  
 M= MALTOSA  
 I= ISOMALTOSA  
 S= SACAROSA

P= PANOSA  
 OD= OLIGODEXTRAN  
 DP= GRADO DE POLIMERIZACION



Estos resultados obtenidos y el antecedente de Jeanes et al., 1954 de que esta dextrana presenta una estructura muy semejante a la dextrana B-512F, nos hace pensar que estamos tratando con una enzima de características muy similares.

#### D. HIDROLISIS ENZIMATICA DE DEXTRANA B-1498.

La tercera comparación entre las dextranasacarasas B-512F y B-1498, se realizó en términos de los productos de hidrólisis de la dextrana tratada con dextranasa. Se realizaron hidrólisis simultáneas utilizando endodextranasa Amano que fue agregada a soluciones de polímeros B-1498 y B-512F al 1%. La figura 12 presenta el cromatograma de los productos de la hidrólisis enzimática: en ambos casos (dextranas de las cepas B-1498 y B-512F) el producto obtenido de la hidrólisis enzimática es isomaltosa. Con una actividad dextranasa de 68.6 U/ml, a las 6 horas de hidrólisis, se generó un poder reductor expresado como glucosa de 4.6 y 4.4 mg/ml para las dextranas B-512F y B-523 respectivamente.

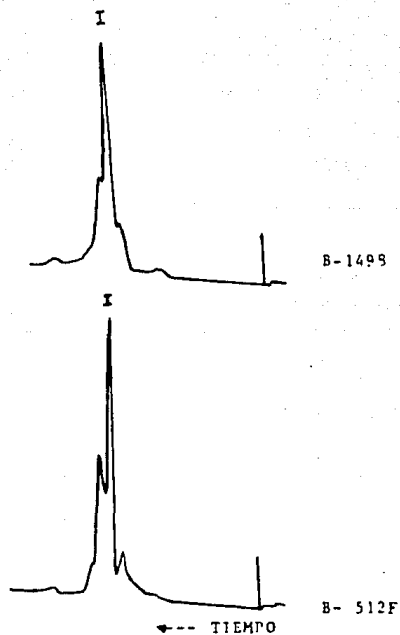


FIGURA 12.- PRODUCTOS DE HIDROLISIS ENZIMATICA DE DEXTRANAS B-1498 y B-512F

CONDICIONES DE OPERACION: Inyección 10 ul , flujo 1ml/min  
 Eluyente agua, 64 IP  
 Vel. papel 5 mm/min

I = ISOMALTOSA

## PARTE II. PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE LA DEXTRANSACARASA DE

### Leuconostoc mesenteroides NRRL B-523 (DS 523).

Esta cepa fue seleccionada de la colección NRRL por el contraste en las características de la dextrana que produce en relación a la dextrana B-512F. La principal diferencia entre estas dos dextranas es en términos de solubilidad, ya que la dextrana B-523 es una dextrana insoluble. Jeanes et al. (1954), analizaron esta dextrana mediante oxidación con periodato y mostraron que está constituida de 66% enlaces  $\alpha(1-6)$ , 10%  $\alpha(1-4)$  y 24% de  $\alpha(1-3)$ . Posteriormente Seymour y Knapp (1980) basados en análisis por metilación, confirmaron el porcentaje de enlaces  $\alpha(1-3)$  y encontraron evidencias de que existen en forma continua, desconociéndose la posición de estas cadenas. Según estos autores, la introducción de segmentos de residuos continuos, unidos con enlaces  $\alpha(1-3)$  dentro de una dextrana, disminuye el número de conformaciones de mínima energía del polímero, resultando un producto con propiedades de insolubilidad. De esta forma, Seymour y Knapp (1980) relacionaron la longitud de las cadenas de residuos glucopiranosil unidos en  $\alpha(1-3)$  con la dificultad del polisacárido para disolverse o dispersarse. El aspecto físico de la dextrana es el de una pasta blanca brillante de textura blanda.

#### IV.4. PRODUCCION DE DEXTRANSACARASA B-523 (DS 523).

##### A. FERMENTACION EN MATRAZ.

Las fermentaciones realizadas en matraz Erlenmeyer utilizando el medio B, proporcionaron mejores rendimientos en actividad enzimática, habiéndose obtenido 13.5 UDS/ml al final de la fermentación (8h), mientras que con el medio A, esta cepa sólo produjo 9.3 UDS/ml. Durante las fermentaciones llevadas a cabo con el medio A, se observó que el microorganismo creció formando pequeños agregados ("pellets") debido a la dextrana insoluble que se iba produciendo en el curso de la fermentación. Sin embargo, cuando se utilizó el medio B no se apreció la formación de estos agregados, debido a que la maltosa contenida en el medio B actuó como aceptor de la síntesis de la dextrana y evitó la formación de grandes cadenas de polisacárido. De esta manera, el microorganismo creció disperso en el medio. La figura 13 presenta el crecimiento del microorganismo en el medio B, así como el monitoreo de la disminución del pH del medio de cultivo.

Por otra parte, el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-523 siguió el modelo de Monod y presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.56 1/h.

## B. FERMENTACION RETROALIMENTADA.

Se llevaron a cabo una serie de fermentaciones retroalimentadas en fermentadores de 0.5 y 4 l. Se utilizó el medio de cultivo B, y se controló el pH a 6.9 con una solución de sacarosa 400 g/l en NaOH 2N. El crecimiento del microorganismo, así como la producción de enzima fueron favorecidos con el control de pH. Con ésto, la actividad dextransacarasa fue aumentada de 13.5 UDS/ml por fermentación en matraz, a 44.3 UDS/ml producidas en fermentación retroalimentada. De esta forma, el proceso en "fed-batch" produjo 70% más enzima que la fermentación en matraz. El crecimiento celular llegó hasta una lectura de 17.5 unidades de densidad óptica a 650 nm. La evolución del crecimiento celular con respecto a la producción enzimática es presentada en la figura 14.

## IV.5. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA B-523.

### A. CENTRIFUGACION CONTINUA.

Al término de las fermentaciones el pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.2 para evitar la pérdida de actividad por inestabilidad enzimática a pH 6.9. La centrifugación en continuo proporcionó muy buenos resultados, pues separó la totalidad de la biomasa dejando un sobrenadante traslúcido libre de células. Cuando se trató de centrifugar la fase PEG (fase superior) de la extracción líquido-líquido de dextransacarasa, la centrifugación continua proporcionó una buena separación de la enzima remanente en la fase superior, recuperándose hasta el 88% de la

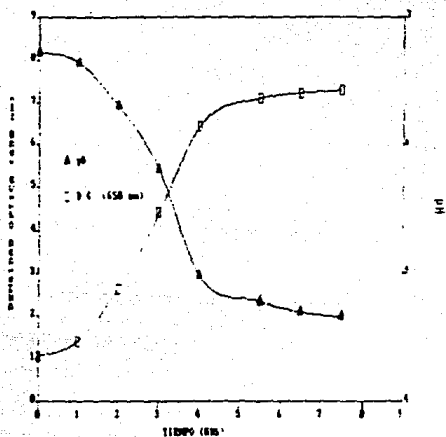


FIGURA 13.- FERMENTACION EN MATRAZ, L. mesenteroides NRRL B-523 MEDIO B.

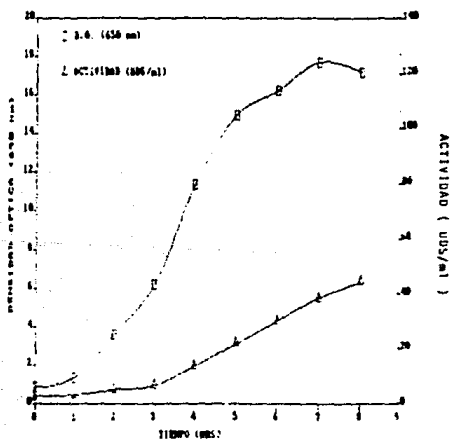


FIGURA 14.- FERMENTACION RETROALIMENTADA ( FED-BATCH ) L. mesenteroides NRRL B-523 , MEDIO B.

dextran-sacarasa presente en el medio de cultivo original. Cabe señalar que generalmente estos sistemas resultan difíciles de centrifugar en los equipos con-rotor de nivel laboratorio, debiéndose emplear largos tiempos a más de 10,000 rpm.

#### B. EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.

La DS 523 que se encontraba en el sobrenadante de fermentación ya libre de células a un pH 5.2 se purificó agregando una solución de PEG 1500 al 50% . La separación de fases se produjo a una concentración final de PEG de 17% .

La fase inferior rica en dextrana se recuperó por centrifugación continua como se indicó anteriormente. El precipitado (la fase dextrana conteniendo la dextran-sacarasa) se resuspendió en 150 ml de buffer acetatos, constituyendo de esta manera una solución enzimática de 700 UDS/ml y obteniéndose un rendimiento en la purificación de casi el 90%.

Como se puede apreciar en la tabla 5. el rendimiento de la recuperación de la enzima fue bueno, habiéndose concentrado la actividad enzimática 16 veces del sobrenadante original y purificado 1.57 veces. En este caso el 56% de las proteínas contenidas en el sobrenadante de fermentación fueron eliminadas en la fase PEG.

**TABLA 5. PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA B-523 POR EXTRACCION LIQUIDO - LIQUIDO CON PEG.**

	SOBRENADANTE	FASE PEG	FASE DEXTRANA
VOLUMEN (ml)	3, 600	5,400	200
ACTIVIDAD (UDS/ml)	44.3	3.6	700
CONCENTRACION DE PROTEINA (mg/ml)	0.599	----	5.623
ACTIVIDAD ESPECIFICA (UDS/mg prot)	73.95	----	124.48
RENDIMIENTO DE PURIFICACION (%)	----	----	87.7%
FACTOR DE PURIFICACION	----	----	1.68



### C. ELECTROFORESIS.

Se realizó una electroforesis en placa de la enzima extraída con PEG, en condiciones no desnaturizantes con gel de poliacrilamida al 7.5%. Se observó que toda la muestra aplicada permaneció en la parte superior del gel, siendo evidencia de que la dextransacarasa tiene un peso molecular muy elevado o de que la enzima se encuentra en un estado de agregación, ya sea entre sus propias cadenas o debido al complejo que forma con la dextrana. Tomando en cuenta la última posibilidad, se decidió tratar a la preparación enzimática con endodextransasa Amano, para hidrolizar a la dextrana presente. Después del tratamiento con esta enzima, se realizó nuevamente la electroforesis y como resultado se observó la presencia de proteínas en el punto de aplicación del gel, indicando que la preparación enzimática pudo penetrar en el gel, pero desafortunadamente no se pudo observar alguna banda característica de la solución enzimática, debido a un enmascaramiento provocado por la preparación de dextransasa que presentaba un contenido extremadamente alto de impurezas de naturaleza proteínica.

Posteriormente, se realizó una electroforesis desnaturizante con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol sobre la preparación enzimática, para determinar el peso molecular de la(s) enzima(s) contenida(s) en la muestra. Se observaron dos bandas con movilidades relativas de 0.2837 y 0.8858 lo que indicó que en la preparación enzimática existían por lo menos dos proteínas. Lo anterior presenta evidencia de que probablemente la DS-523 esté constituida por estas dos proteínas. Las movilidades relativas de los estándares de

proteína aplicados en el mismo gel así como de sus pesos moleculares, fueron graficados para predecir el peso molecular de las bandas observadas pertenecientes a la dextran-sacarasa B-523. Esta gráfica se presenta en la figura 15. Los estándares utilizados fueron: pepsina (35.000 daltons), amilasa (45.000), celulosa (52.000) y albúmina (64.000).

La interpolación que se presenta en la figura 15 muestra que una de las cadenas polipeptídicas presenta un peso molecular aproximado de 112.000 daltons y la segunda cadena de 42.000 daltons. Como sugerencia, para calcular el peso molecular de una manera más precisa, se propone utilizar estándares de mayor peso molecular en un intervalo en el que pueda insertarse el peso molecular de la primera banda proteínica detectada.

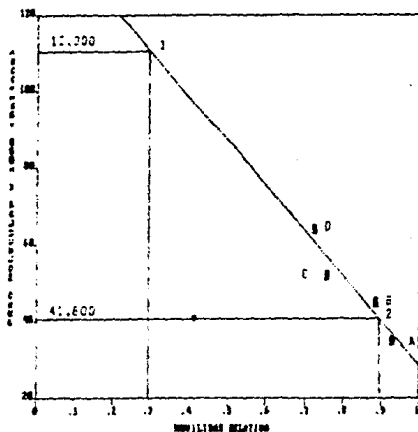


FIGURA 15.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS DE LA DEXTRANSACARASA B-523.

- 1 : PRIMERA BANDA (PROTEINA)  
 2 : SEGUNDA BANDA (PROTEINA)  
 ESTANDARES:  
 A : PEPSINA (P.M. 35.000)  
 E : AMILASA (P.M. 45.000)  
 C : CELULOSA (P.M. 52.000)  
 D : ALBUMINA (P.M. 64.000)

#### IV.6. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA DEXTRANSACARASA B-523.

##### A. DETERMINACION DEL pH Y TEMPERATURA OPTIMOS DE ACTIVIDAD (DS 523).

Se encontró un pH óptimo de actividad enzimática de 5.5 (Fig. 16), resultando ser muy similar al óptimo de la DS 512F (pH 5.2). En cuanto a la temperatura óptima, la DS 523 presentó su mayor actividad a 30°C al igual que la DS 512F (Fig. 17).

##### B. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS.

Se realizó una serie de reacciones enzima-sustrato con la enzima purificada por extracción líquido-líquido a diferentes concentraciones de sacarosa, determinando velocidades iniciales de reacción. La enzima DS 523 presentó el comportamiento clásico de la cinética de Michaelis-Menten (Fig. 18).

Para la determinación de los parámetros cinéticos se aplicó la forma linealizada de la ecuación de Michaelis Menten, conocida como de Lineweaver-Burk:

$$(1/V_i) = (1 / V_{max}) + (K_m / V_{max} S) \dots \dots (1)$$

obteniéndose una constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 0.6058 g/l (.00177 M) para la sacarosa y una velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de 0.237 g/l\* min (Fig.19).

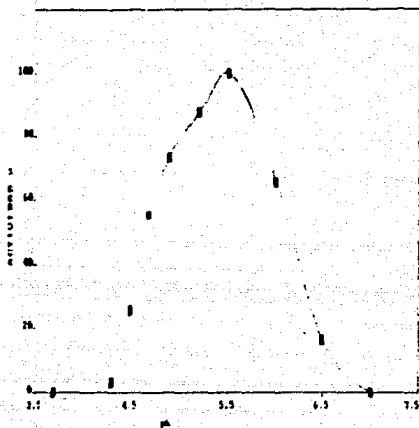


FIGURA 16.- pH OPTIMO DE ACTIVIDAD  
DEXTRANSACARASA B-523 .

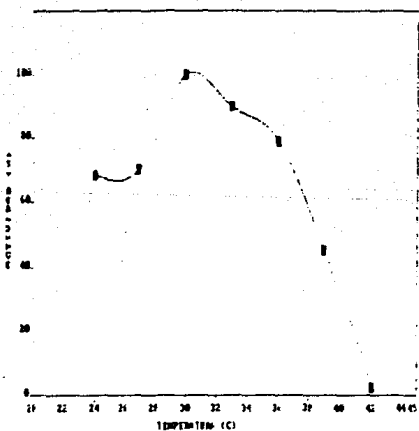


FIGURA 17.- TEMPERATURA OPTIMA DE ACTIVIDAD  
DEXTRANSACARASA B-523 .

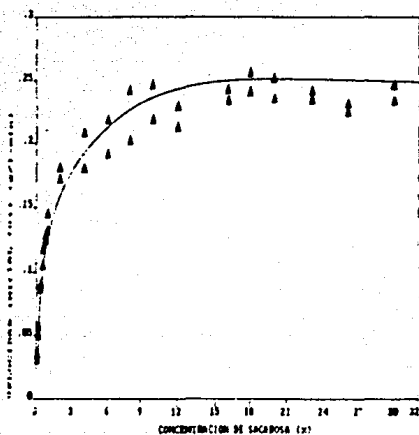


FIGURA 18.- CINETICA DE MICHAELIS-MENTEN  
DETRANSACARASA B-523

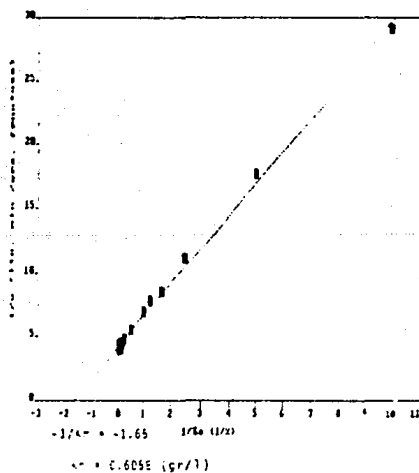


FIGURA 19.- GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK PARA LA  
DETRANSACARASA B-523 (20.5 ucs/e)

Con el objetivo de comprobar los valores de las constantes cinéticas, se realizó una serie de reacciones a diversas concentraciones de sacarosa (1, 10 y 30%) y a diferentes actividades enzimáticas (4.1, 20.5 y 37 UDS/ml). El inverso de las velocidades iniciales de reacción se graficó contra el inverso de las concentraciones de sustrato, por medio de la ecuación de Lineweaver-Burk, obteniéndose la gráfica presentada en la figura 20. Los valores obtenidos para las constantes cinéticas en este ensayo, resultaron cercanos a los obtenidos anteriormente y son presentados en la Tabla 6. Tomando las constantes cinéticas obtenidas en el ensayo I (Tabla 6) y substituyéndolas en la ecuación de reactor enzimático batch para la cinética de Michaelis-Menten (ecuación 1), se obtiene la predicción de la conversión de sustrato con respecto al tiempo:

$$V_{max} t = S_0 X - K_m \ln (1-X) \dots\dots\dots(2)$$

La figura 21 presenta los datos de conversión de sustrato obtenidos experimentalmente, comparándolos con el modelo para reactor batch (ecuación 2). Como se puede observar, la cinética de reacción cumple con el modelo sólo durante la etapa inicial de la reacción. Posteriormente, conforme la reacción transcurre, los porcentajes de conversión se alejan del modelo, obteniéndose menor conversión de sustrato que la predicha por el modelo a un determinado tiempo. Esta disminución de la conversión es generalmente debida a una inhibición por el producto, lo que no se ha reportado para las dextranasa. Sin embargo, como se demuestra mas adelante, en este sistema particular la dextrana insoluble compleja a

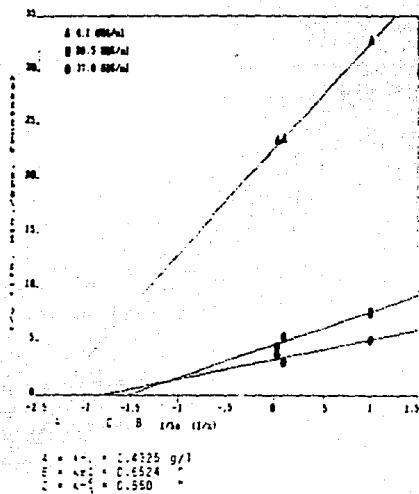


FIGURA 20.- GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK PARA LA  $\alpha$ -D-GLUCOSIDASA B-525 (DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA).

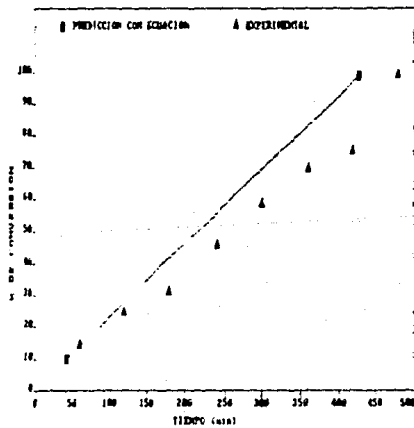


FIGURA 21.- CONVERSION DE SACAROSA EN SIÑETIS DE DESTRANA B-525.

TABLA 6. CONSTANTES CINÉTICAS EN DIFERENTES ENSAYOS.

ENSAYO	CONCENTRACION DE SACAROSA (%)	DOSIS DE ENZIMA (UDS/ml)	K <sub>m</sub> (g/l)	V <sub>max</sub> (UDS/ml)
I	0.1 - 40	20.5	0.6058	14.22
II	1 - 30	4.1	0.4325	2.64
III	1 - 30	20.5	0.6524	12.84
IV	1 - 30	37.0	0.5500	18.20



la enzima y la precipita, restándole capacidad para catalizar la reacción. Un modelo adecuado debería entonces incluir la disminución en la  $V_{max}$  durante la reacción, lo que requiere de un estudio mas profundo sobre el fenómeno de insolubilización de la enzima.

### C. SINTESIS DE DEXTRANA B-523.

Las síntesis de dextrana B-523 se llevaron a cabo en las condiciones óptimas de actividad enzimática. Como característica fundamental de este sistema, se observa que durante el curso de la reacción la aparición de una forma de dextrana insoluble. La conversión de sustrato se monitoreó a través de la medición de los azúcares reductores libres.

En un primer ensayo de 300 ml de volumen, con sacarosa al 10% y una actividad de 20.5 UDS/ml. se efectuó un balance de polisacáridos al término de la síntesis. Para ello se pesó el polisacárido obtenido por centrifugación y el precipitado del sobrenadante. Para una conversión de sustrato del 100%, se esperaría obtener alrededor de 15g de dextrana. Sin embargo, para este ensayo se obtuvo un rendimiento de síntesis del 88%. Del total de polímero, el 90% (13.1g) estuvo constituido de dextrana insoluble y sólo un 1% (0.125g) correspondió a la dextrana soluble, obtenida por precipitación con alcohol a una concentración de 44%. Esta concentración es la misma a la que precipita la dextrana B-512F.

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Se observó que el 89.3% de la enzima utilizada en el ensayo, permaneció unida a la dextrana insoluble ya seca, pues esta presentó una actividad de 0.41 UDS/mg. De esta forma, se comprueba que durante la reacción de síntesis, la enzima se acopla a la dextrana insoluble provocándose de cierta forma una disminución en la actividad catalítica. El hecho de que la reacción prosiga es evidencia de que la enzima no pierde actividad, pero los resultados obtenidos en el estudio cinético demuestran la disminución de actividad como consecuencia de la insolubilización. Esta enzima tendría entonces la particularidad de poder ser reutilizada en una nueva síntesis, previa recuperación del polímero.

Aparentemente durante la síntesis de la dextrana soluble, se empieza a formar una dextrana con tal contenido de residuos glucopiranosil unidos en  $\alpha(1-3)$  que ocasionan la insolubilización de la misma. Es decir, durante el desarrollo de la síntesis una cantidad de segmentos de residuos glucopiranosil continuos, unidos con enlaces  $\alpha(1-3)$ , son introducidos dentro de la estructura de la dextrana, disminuyendo el número de conformaciones de mínima energía de la dextrana, quedando porciones de la dextrana no solvatadas, lo que produce la insolubilización de la misma (Seymour y Knapp, 1980).

Este tipo de mecanismo de insolubilización no ha sido totalmente demostrado, pero según los estudios realizados por Seymour y Knapp (1980), la explicación anterior es plausible. Esta teoría explicaría el porque se encontró una cantidad muy pequeña de dextrana soluble, que tal vez no contenía las proporciones suficientes de unidades glucopiranosil  $\alpha(1-3)$  para ser insoluble.

Por otro lado, durante la síntesis de dextrana B-523, se observó que las soluciones de polisacárido, al ser calentadas a 80°C, ocasionaban la formación de un gel, aumentando el grado de gelificación con el incremento en la concentración de dextrana. La formación de geles a partir de las soluciones de dextrana B-523, puede presentar un gran potencial para diversas aplicaciones.

#### D. MEDICION DE VISCOSIDAD APARENTE DURANTE LA SINTESIS DE DEXTRANA

B-523.

Durante la misma síntesis enzimática se realizaron mediciones de viscosidad "aparente" en el medio de reacción. Paralelamente, a nivel de comparación, se llevó a cabo una síntesis de dextrana B-512F a las mismas condiciones de reacción.

La figura 22 presenta la relación de la viscosidad con el consumo de sacarosa, para las dos dextranasacarasas (DS 523 y DS 512F).

En esta figura se puede observar que la viscosidad "aparente" del medio de síntesis de dextrana B-523 empieza a incrementarse hasta un punto (casi 200 cp) a partir del cual disminuye hasta un valor constante, permaneciendo así hasta el final de la reacción. Probablemente este decremento en la viscosidad (a las 3 h de reacción) fue causado por la insolubilización de una buena parte de la dextrana ya formada, que ocasionó un decremento en la viscosidad del medio de reacción, por lo que este momento parecía ser crítico en el mecanismo de insolubilización. Aunque cabe señalar que visualmente a la primera hora de reacción, ya se observan algunos aglomerados de dextrana insoluble. En este contexto se podría especular que al principio de la reacción la velocidad de insolubilización es menor que la velocidad de formación de dextrana soluble, que es capaz de incrementar la viscosidad del medio de reacción. Posteriormente, en el punto en que disminuye la viscosidad, pudo haber sucedido lo contrario, es decir, que la velocidad de insolubilización superara a la de formación de dextrana soluble.

Conviene insistir en que lo anteriormente expuesto es sólo una interpretación de los resultados y sería necesario que esta reacción fuera objeto de un estudio más profundo para elucidar el mecanismo de formación de la dextrana insoluble.

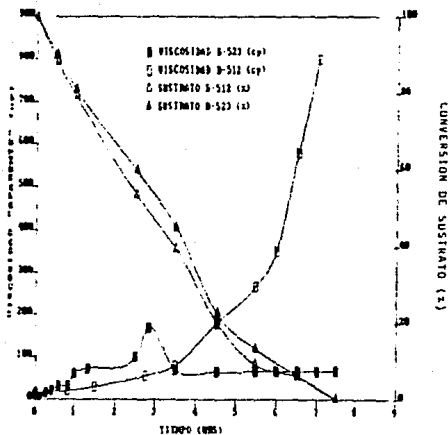


FIGURA 22.- MEDICION DE VISCOSIDAD "APARENTE" EN SINTESIS DE DEXTRANAS B-512F Y B-523 .

## E. SINTESIS DE DEXTRANA B-523 EN PRESENCIA DE ACEPTORES.

En esta síntesis se utilizó maltosa como aceptor, llevándose a cabo diferentes reacciones utilizando una relación de concentración sacarosa/maltosa (S/M) de 10, 4 y 2. A nivel de comparación, se realizaron las mismas síntesis con la DS 512F a las mismas proporciones de S/M y condiciones de reacción.

Los cromatogramas de los productos de aceptor se pueden observar en la figura 23 para la DS 523 y en la figura 24 para la DS 512F. Como se muestra en los cromatogramas, conforme el nivel de maltosa se incrementa, el tamaño de los oligosacáridos formados decrece. Para la DS 523, el principal producto fue la panosa y se produjeron oligodextranos de hasta un grado de polimerización de 8 en la reacción con maltosa al 1% .

Los productos de reacción con aceptores generados por la DS 523 aparentemente fueron similares a los producidos por la DS 512F, esto indicó que la DS 523 sintetiza dextranas con un alto contenido de grupos piranosil lineales, unidos con enlaces  $\alpha(1-6)$ . Sin embargo, existían dudas con respecto a la composición de los productos de aceptor, por los antecedentes publicados sobre estudios de metilación realizados por Seymour y Fnapp (1980). Estos autores aseguran que la dextrana B-523 esta constituida por un gran porcentaje de grupos piranosil unidos en enlaces  $\alpha(1-3)$ .

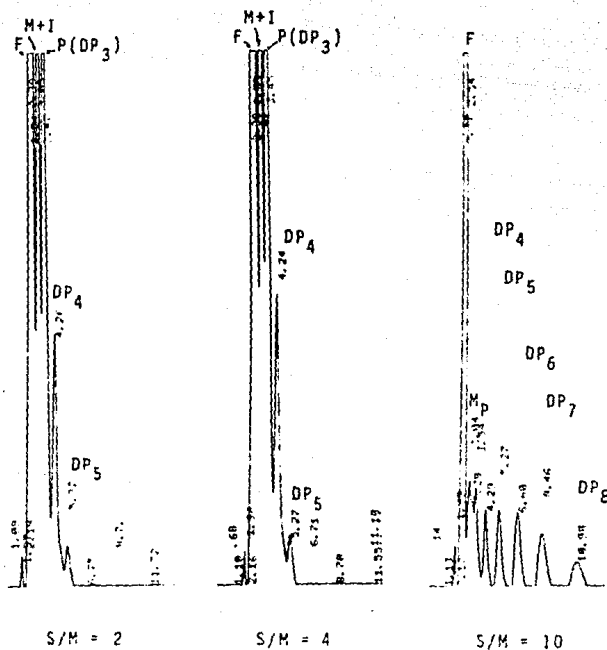


FIGURA 23.- PRODUCTOS DE REACCION CON ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA B-523 .

Inyección: 20 ul. , Flujo: 1 ml/min. , IR = 64  
 Eluyente: agua-metanol (96:4) , Vel. papel: 0.5 cm/min.

F = FRUCTOSA , I = ISOMALTOSA , M = MALTOSA  
 P = PANOSA , DP = GRADO DE POLIMERIZACION .

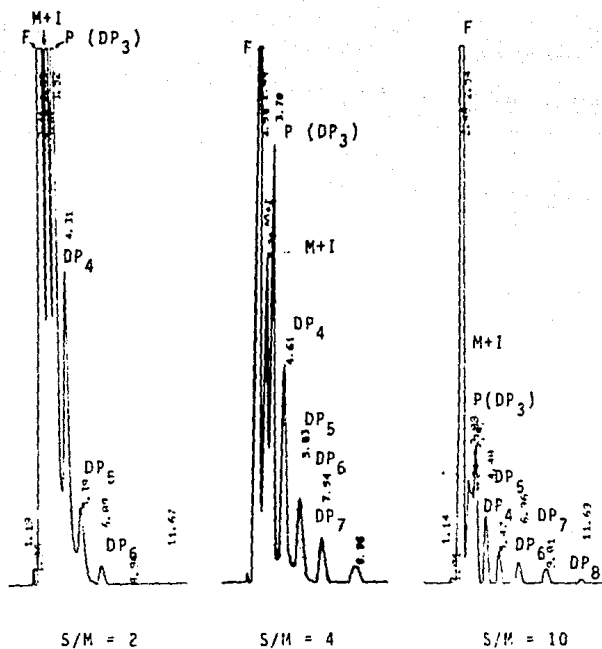


FIGURA 24.- PRODUCTOS DE REACCION CON ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA B-512F.

Inyección: 20 ul. , Flujo: 1 ml/min. , IR = 64  
 Eluyente: agua-metanol (96:4) , Vel. papel : 0.5 cm/min.

F = FRUCTOSA , I = ISOMALTOSA , M = MALTOSA  
 P = PANOSA , DP = GRADO DE POLIMERIZACION .



En relación a lo anterior, se decidió relizar una hidrólisis enzimática de los productos obtenidos con aceptores, cuyos resultados se presentan en el apartado siguiente.

Es conveniente señalar que aún en presencia de aceptores se lleva acabo la formación de dextrana insoluble. Este fenómeno no fué estudiado en este trabajo, pero representa un interesante fenómeno a describir.

#### F. HIDROLISIS ENZIMATICA DE PRODUCTOS DE ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA B-523 (DS-523).

Con el objeto de comprobar la similitud de los productos de aceptor generados por la DS 523 con los de la DS 512F, se realizó una hidrólisis con endodextransasa de los productos de aceptor. Esta dextranasa hidroliza enlaces  $\alpha(1-6)$  consecutivos, por lo que los productos de aceptor son hidrolizados, solo si estan constituidos con unidades glucopiranosil unidas con enlaces  $\alpha(1-6)$ . Los productos de hidrólisis fueron analizados por HPLC y los cromatogramas de estos ensayos son presentados en las figuras 25 y 26.

Como se puede observar, los productos de la hidrólisis de los oligosacáridos producidos por la DS 523 con aceptores, son idénticos a los de la DS 512F. En ambos casos, el principal producto fue panosa y en menor grado el oligodextrano de grado de polimerización 4 (DP4). Los

S/M = 2

S/M = 4

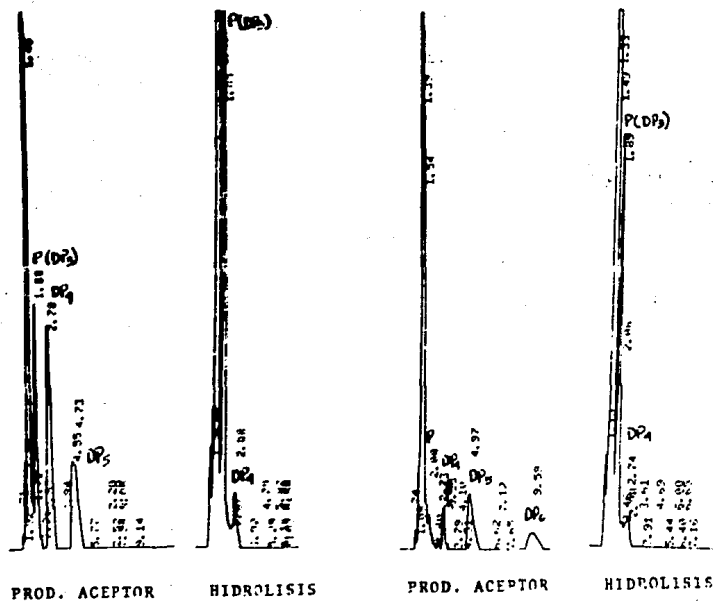
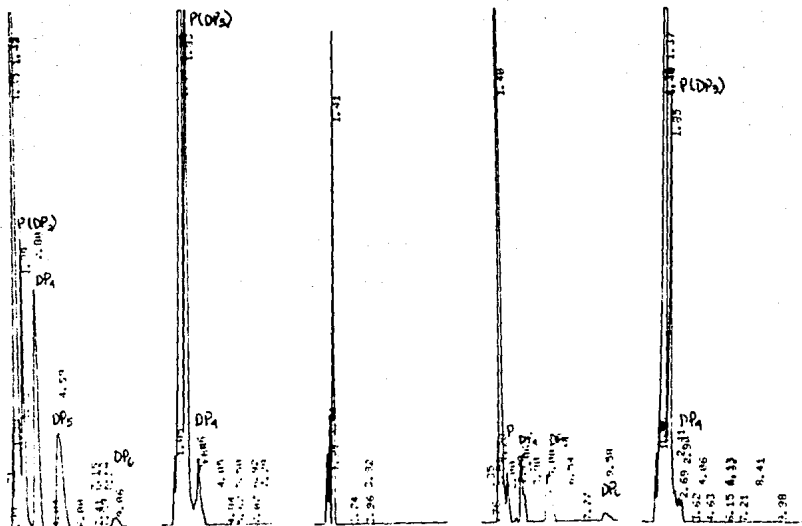


FIGURA 25.- HIDROLISIS DE PRODUCTOS DE ACEPTOR ( DS B-523)

Inyección: 20 ul , Flujo : 2 ml/ min. , IR = 64  
 Eluyente : Agua, Vel. Panel : 0.5 cm/ min.

P (DP<sub>3</sub>) = Panosa , DP<sub>2</sub> = Oligodextran de grado de polimerización 4



S/M = 2  
 PROD. ACEPTOR HIDROLISIS

DEXTRANASA AMANO

S/M = 4  
 PROD. ACEPTOR HIDROLISIS

FIGURA 26.- HIDROLISIS DE PRODUCTOS DE ACEPTOR ( DS E-512)

Inyección : 20 ul , Flujo : 2 ml/min , IR = 64  
 Eluyente : Agua , Vel. de napol : 0.5 cm/min.

P(DP<sub>3</sub>) = Panosa

, DP<sub>4</sub> = Oligodextran con grado de polimerización de 4

oligodextranos de grado de polimerización más alto, fueron hidrolizados dando lugar a productos de menor grado de polimerización, glucosa e isomaltosa.

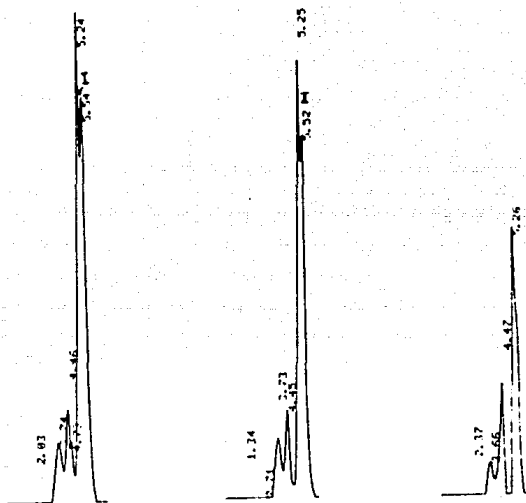
Con esto se comprobó la hipótesis planteada e indicó que la dextrana B-523 tiene una alta proporción de unidades glucopiranosil consecutivas unidas con enlaces  $\alpha(1-6)$ . Sin embargo, con respecto a la posición de los enlaces  $\alpha(1-3)$ , se desconoce su localización pero podría suponerse que se encuentran principalmente como ramificaciones.

#### G. HIDROLISIS ENZIMATICA DE DEXTRANA B-523.

La dextrana soluble de la B-512F y la insoluble de la B-523 fueron tratadas con endodextranasa comercial Amano en sus condiciones óptimas de reacción.

Los productos de la hidrólisis fueron analizados por HPLC y la figura 27 presenta los cromatogramas correspondientes a la hidrólisis de las dextranas B-512F y B-523 (insoluble).

Los productos de hidrólisis de la dextrana insoluble B-523 resultan ser muy semejantes a los obtenidos con la dextrana B-512F. El principal producto de la hidrólisis de las dextranas fue isomaltosa en ambos casos. Se observan algunos picos correspondientes a la preparación de la dextranasa añadida



B-512F

B-523

DEXTRANASA AMANO  
UTILIZADA  
EN LA HIDROLISIS

FIGURA 27.- PRODUCTOS DE HIDROLISIS DE DEXTRANAS  
B-512F y B-523 .

Inyección: 20 ul. , Flujo : 2 ml/min. , IR= 64  
Eluyente: Agua , Vel. papel = 0.5 cm/min.

I = ISOMALTOSA

(la preparación de enzima se analizó previamente en HPLC y su cromatograma se presenta incluido en la figura 27; como puede observarse, contiene una alta cantidad de azúcares como estabilizantes).

La hidrólisis de la dextrana B-512F se llevó a cabo casi completamente (85%), generando un poder reductor expresado como glucosa de 8.34 mg/ml a las 8 horas de hidrólisis.

Por otro lado, al mismo tiempo de reacción, se solubilizó e hidrolizó 50% de la dextrana B-523, generando un poder reductor expresado como glucosa de 4.8 mg/ml. El otro 50% del polisacárido fué recuperado por centrifugación tras 8 horas de hidrólisis con 60,8 U/ml de dextranasa.

Las proporciones de los productos de hidrólisis de la dextrana B-523 son muy inferiores comparados con los obtenidos con la DS 512F, presumiblemente debido a la característica de insolubilidad que presenta ya que provoca impedimentos estéricos para la acción de la dextranasa, aunado también a que la endodextranasa sólo actúa rompiendo enlaces  $\alpha(1-6)$ , dejando los correspondientes enlaces  $\alpha(1-3)$  intactos. Esto hace suponer, que la dextrana B-523 está constituida de por lo menos un 50% de unidades glucopiranosil con enlaces  $\alpha(1-6)$ .

A manera de sugerencia, sería interesante estudiar la estructura de la porción de dextrana no hidrolizada, para conocer la localización de los enlaces consecutivos  $\alpha(1-3)$  que aparentemente son los que provocan la insolubilización del polisacárido.

## V. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados mostrados se desprende que el comportamiento de la DS 1498 es muy similar al de la DS 512F. Se trata de enzimas extracelulares producidas en el mismo medio de cultivo y que funcionan en condiciones de pH y temperatura similares. La similitud se refleja igualmente en los productos de síntesis en presencia de aceptores (maltosa) así como de degradación del polímero sintetizado con dextranasa. No se encontró evidencia alguna de otro polisacárido en la acción de la(s) enzima(s) de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1498 sobre todo en la fracción que precipita al 36-37% de alcohol según reportes de Jeanes et al., 1954. Como consecuencia de lo anterior, resulta de gran potencial el plantear que esta cepa puede sustituir a la B-512F en la producción de dextrana industrial. En efecto, en las condiciones más simples de fermentación (batch) únicamente con regulación de temperatura es posible producir 5 veces más enzima que con la cepa B-521F.

Por otro lado, la enzima de la cepa L. mesenteroides NRRL B-523 resulta de un interesante potencial, tanto en el estudio de los mecanismos de insolubilización de dextranas y las enzimas que los sintetizan, así como en la producción de polisacáridos insolubles. En este trabajo se establecen los elementos necesarios para iniciar trabajos más específicos al respecto. Por un lado, se presenta un sistema de producción que permite obtener niveles suficientes de enzima. Posteriormente se caracteriza la enzima tanto desde un punto de vista cinético como fisicoquímico.

Finalmente se establecen las siguientes características de la enzima: la totalidad del producto (99%) es insolubilizado al final de la síntesis, quedando solo una ligera fracción en el sobrenadante; la enzima es precipitada con el polímero. Conviene recordar que en el medio de fermentación tradicional, la actividad en el sobrenadante es baja, debido a que la enzima se ubica en la parte insoluble del cultivo. Su recuperación se ve entonces dificultada por la presencia de células. Al introducir maltosa en el medio de fermentación, la enzima es en buena medida solubilizada, obteniéndose 44 UDS/ml de medio de cultivo. De esta manera se obtiene una enzima soluble, que será posteriormente insolubilizada durante la reacción de síntesis. Cuando la enzima actúa en presencia de aceptores (maltosa), los productos son iguales a los obtenidos con la DS B512F. Sin embargo, se produce dextrana o bien derivados insolubles. Al tratar la dextrana insoluble con dextranasa, un 50% es solubilizada (determinado por balance de masa) y los productos en el sobrenadante, al menos los de bajo peso molecular, son iguales a los de la B512F.

Con este trabajo se contribuye al estudio y aplicación de las glucosiltransferasas haciendo disponible una enzima similar a la utilizada actualmente en la industria, pero con niveles de producción muy superiores. Así también, los resultados obtenidos con la enzima DS 523 sientan las bases para un estudio fundamental sobre el mecanismo de insolubilización de las dextranas, al poner en evidencia aspectos de índole cuantitativo del fenómeno. Así mismo pueden surgir algunas aplicaciones que aprovechen las propiedades de este polisacárido.



## VI. REFERENCIAS

1. Alsop, R.M. (1983) Industrial production of dextrans. In *Progress in Industrial Microbiology*. Vol. 18. Buschel, M.E. (Ed.) Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam. Pp.1-43.
2. Braswell, E., A. Goodman and K. Stern. (1962) Studies on the enzymatic synthesis of dextran. Part II. *J. Polym. Sci.* 61:143-154.
3. Brock Neely, W. (1960) Dextran: structure and synthesis. *Adv. Carbohyd. Chem.* 15:341-369.
4. Brock Neely, W. and J. Nott (1962) Dextranucrase, an induced enzyme from Leuconostoc mesenteroides. *Biochem.* 1(6):1136-1140.
5. Côté, G.L. and J. Robyt. (1982) Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1-6), (1-3)- $\alpha$ -D-glucan. *Carbohydrate Res.* 101:57-74.
6. Ebert, K.H. and G. Schenk (1968) Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. *Adv. in Enzymology.* 30:179-221.
7. Garvie, E. (1986) Genus Leuconostoc. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Sneath, P.H., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G.Holt (eds.) Williams and Wilkins. USA. Pp. 1071-1075.
8. Hassid, W.Z. and E.F. Neufeld (1962) Glycosidic bond exchange (Survey). In *The Enzymes*. Vol. 6. Boyer, P., H. Lardy and K. Myrback. Academic Press. New York Pp. 278-288.
9. Hehre, E.J. (1946). Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. *J. Biol. Chem.* 163:221-233.
10. Hehre, E.J. (1953) Low molecular weight dextran as a modifier of dextran synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 75:4866.
11. Jeanes, A., C.A. Wilham and J.C. Miers (1948) Preparation and characterization of dextran from Leuconostoc mesenteroides. *J. Biol. Chem.* 176:603-614.
12. Jeanes, A., W.C. Haynes, C.A. Wilham, J.C. Rankin, E.H. Melvin, M.J. Austin, J.E. Cluskey, B.E. Fisher, H.M. Tsuchiya and C.E. Rist (1954) Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 76:5041-5052.

13. Jeanes, A. (1979) The  $\alpha$ -D-glucopyranosidic linkages of dextrans: comparison of percentages from structural analysis by periodate oxidation and by methylation. Carbohydrate Res. 74:31-40.
14. Kaboli, H. and Reilly. (1980) Biotech, and Bioeng. 22:1055-1069.
15. Kobayashi, M. and K. Matsuda (1975) Purification and characterization of two activities of the intracellular dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299. Bioch. Biophys. Acta. 397:69-79.
16. Koepsell, H.J., H.M. Tsuchiya, N.N. Hellman, A. Kazenko, C.A. Hoffman, E.S. Sharpe and R.W. Jackson. (1952) J. Biol. Chem. 200:793.
17. Kula, M.R. (1979) Extraction and purification of enzymes using aqueous two-phase systems. Appl. Biochem. Bioeng. 2:71-95
18. López M. C., A. (1979) Production, purification et immobilisation de la dextrane - saccharase de Leuconostoc mesenteroides. Tesis doctoral. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
19. López, A. and P. Monsan (1980) Dextran synthesis by immobilized dextran sucrase. Biochimie. 62:323-329
20. Luzio, G.A. and R.M. Mayer (1983) The hydrolysis of sucrose by dextranucrase. Carbohydrate Res. 444:311-318
21. Martínez-Espíndola J.P. and López-Munguía C.A. (1985) On the kinetics of dextranucrase and dextran synthesis in batch reactors. Biotechnol. Letters. 7(7):483-486.
22. Mattiasson. B. (1983) Applications of aqueous two-phase systems in biotechnology. Trends in Biotechnology. 1(1):16-20.
23. Miller, A.W. and J.F. Robyt (1984) Stabilization of dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL-512F by nonionic detergents, poly(ethylene glycol) and high molecular weight dextran. Biochim. Biophys. Acta. 786:89-96
24. Oriol, E. (1983) Synthèse enzymatique directe de dextrans de masse molaire contrôlée en vue des applications bio-médicales. Tesis DEA. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Francia.

25. Paul, F., E. Oriol, D. Auriol, R.M. Willemot and P. Monsan (1984) Effect of maltose in the reaction of highly purified Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F dextranucrase: kinetic study and product characterization. Third European Congress of Biotechnology. Vol I. p. 383. Verlag - Chemie - Dechema.
26. Paul, F., P. Monsan and D. Auriol (1983) French Patent No. 33.07.650.
27. Paul, F., E. Oriol, D. Auriol, R.M. Willemot and P. Monsan. (1986) Acceptor reaction of a highly purified Dextranucrase with maltose and oligosaccharides. Applications to the synthesis of controlled molecular weight dextrans. Carbohydrate Res. 149:433-441.
28. Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Analytical Biochem. 83:346-356.
29. Robyt, J.F. (1986) Dextran. In: Encyclopedia of Polymer Sci. and Eng. Vol. 4. 2nd. ed. Mark, F.H., M.N. Bikales Ch. G. Overberger and G. Meyes (Eds.) John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. Pp 752.
30. Robyt, J.F. and Corrigan, A.J. (1977) The mechanism of dextranucrase action. Activation of dextranucrase from Streptococcus mutans QM2 176 by dextran and modified dextran and the nonexistence of the primer requirement for the synthesis of dextran. Arch. Biochem. and Biophys. 183: 726-731.
31. Robyt, J.R. and S.H. Eklund. (1983) Relative quantitative effects of the acceptors in the reaction of Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F dextranucrase Carbohydrate Res. 121:279-286.
32. Robyt, J.F., B.K. Kimble and T.F. Walseth (1974) The mechanism of dextranucrase action. Arch. Biochem. and Biophys. 165:634-640.
33. Robyt, J.F. and H. Taniguchi. (1976) The mechanism of dextranucrase action. Arch. Biochem and Biophys. 174: 129-135.
34. Robyt, J.F. and T.F. Walseth (1978) The mechanism of acceptor reactions of Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F dextranucrase. Carbohydrate Res. 61:433-445.
35. Robyt, J.F. and T.F. Walseth (1979) Production, purification and properties of dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F. Carbohydrate Res. 68:95-111.

36. Seymour, F.R., R. Knapp and S.H. Bishop. (1976) Determination of the structure of dextran by  $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbohydrate Res. 51:179-194.
37. Seymour, F.R., M. E. Siodki, R.D. Plattner and A. Jeanes. (1977). Six unusual dextrans: methylation structural analysis by combined GLC-MS of per-O-acetyl-aldonitriles. Carbohydrate Res. 53:153-166.
38. Seymour, F.R. (1979) Methylation structural analysis of unusual dextrans by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydrate Res. 68:113-121.
39. Seymour, F.R. (1979) High-temperature enhancement of  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. chemical-shifts of unusual dextrans, and correlation with methylation structural analysis. Carbohydrate Res. 68:123-140.
40. Seymour, F.R. (1979) Structural analysis of dextrans containing 2-O- $\alpha$ -D-glucosylated  $\alpha$ -D-glucopyranosil residues at the branch points, by use of  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectroscopy and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydrate Res. 71:231-250.
41. Seymour, F.R. (1979) Structural analysis of levans by use of  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectroscopy. Carbohydrate Res. 72:22-228.
42. Seymour, F.R. (1979) Carbon-13 spin-lattice relaxation studies for resonance assignment to specific, carbon positions of dextrans. Carbohydrate Res. 72:229-234.
43. Seymour, F.R. (1979) Structural analysis of Leuconostoc dextrans containing 3-O- $\alpha$ -glucosylated  $\alpha$ -D-glucosyl residues in both linear-chain and branch point position, or only in branch point position, by methylation and by  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectroscopy. Carbohydrate Res. 74:41-62.
44. Seymour, F.R. (1979) Fourier-transform, infrared difference spectrometry for structural analysis of dextrans. Carbohydrate Res. 74:63-75.
45. Seymour, F.R. (1979) Correlation of the structure of dextrans to their  $^1\text{H}$ -n.m.r. spectra. Carbohydrate Res. 74:77-92.
46. Seymour, F.R. (1979) Structural analysis of dextrans containing 4-O- $\alpha$ -D-glucosylated  $\alpha$ -D-glucopyranosil residues at the branch points, by use of  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectroscopy and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydrate Res. 75:275-294.

47. Seymour, F.R. (1980) Structural analysis of  $\alpha$ -D-glucans by  $^{13}\text{C}$ -n.m.r., spin-lattice relaxation studies. Carbohydrate Res. 81:67-103.
48. Seymour, F.R. (1980) Structural analysis of dextrans from strains of Leuconostoc and related genera, that contain 3-O- $\alpha$ -D-glucosylated  $\alpha$ -D-glucopyranosyl residues at the branch points or in consecutive linear positions. Carbohydrate Res. 81:105-129.
49. Seymour, F.R. (1980) Structural analysis of insoluble D-glucans by Fourier transform, infrared difference-spectrometry: correlation between structures of dextrans from strains of Leuconostoc mesenteroides and  $\alpha$ -D-glucans from strains of Streptococcus mutans. Carbohydrates Res. 86:227-246.
50. Sumner J.B. and S.F. Howell. (1935) A method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem. 108:51-54.
51. Tsuchiya, H.M., H.J. Koepsell, J. Corman, G. Bryant, M.O. Bogard, V.H. Feger and R.W. Jackson. (1952) J. of Bacteriology. 64:521-526.
52. Tsuchiya, H.M., N.N. Hellman and H.J. Koepsell. (1953) Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran J. Am. Chem. Soc. 75:757-758.
53. Weber, K. and M. Osborn (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The J. of Biol. Chem. 244:4406-4412.