

03072

19

28



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

FALLA DE ORIGEN
"PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE UNA
FRUCTOSILTRANSFERASA DE *Bacillus circulans*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

MARIA DE LOS ANGELES PEREZ OSEGUERA

CUERNAVACA, MORELOS

1995



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.

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Bajo la asesoría del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

La realización de los estudios de Maestría y del presente trabajo, fueron posibles gracias al apoyo por parte del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** mediante la beca crédito 81905, así como a la beca de alimentación y hospedaje otorgada por el **Instituto de Biotecnología**.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Agustín López Munguía el haberme brindado la oportunidad de trabajar y aprender en su grupo de trabajo, por su confianza y apoyo.

A la Dra. Gloria Soberón por sus valiosos comentarios y al M.C. Leopoldo Güereca por su invaluable ayuda en la realización de este trabajo.

Agradezco a los compañeros y amigos del laboratorio; Ma. Elena, Fernando, Monica, Sonia, Nacho, Mary, Bety, Maricarmen, Raunel, Marisol por sus valiosos comentarios sobre mi trabajo y su buena disposición en los momentos en que necesite de su ayuda, que me hizo sentir siempre que contaba con un grupo.

A toda la gente del Instituto de Biotecnología que me acompañó y me demostró su amistad durante esta etapa de aprendizaje.

Con especial cariño a Héctor por toda todo el apoyo que me dio y la paciencia que me tuvo.

RESUMEN

Las enzimas fructosiltransferasas, en particular la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, han sido ampliamente estudiadas y resultan potencialmente interesantes debido a su capacidad para formar polímeros de fructosa llamados levanas y a la capacidad de transferir fructosa a diferentes azúcares para dar origen a diversos oligosacáridos con gran potencial de aplicación industrial.

Durante el presente trabajo se llevó a cabo la producción y caracterización de una enzima levansacarasa producida por una cepa de *Bacillus circulans* que fue aislada e identificada durante un trabajo de tesis de licenciatura en la Facultad de Química en el Depto. de Alimentos (Bibbins 1990).

Como parte de la caracterización de la enzima, en este trabajo se determinaron las constantes fisicoquímicas características, su estabilidad a la temperatura y al almacenamiento. Se realizó un estudio cinético y se estudió el efecto de la presencia de levana en el medio en la velocidad de reacción y en la especificidad.

Se probó la capacidad de esta levansacarasa para transferir fructosa a la maltosa, lactosa, galactosa, sorbitol, glicerol, metanol, inositol, serina y treonina. Dado el potencial aplicativo que presentan, además de no haberse encontrado reportes sobre estas reacciones en particular, posteriormente se estudiaron específicamente las reacciones de aceptor en presencia de sorbitol y glicerol, con el fin de determinar las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la mayor proporción de transferencia a estos dos aceptores.

Debido al comportamiento tan característico que presentó el fluido de reacción en pre-

sencia de sorbitol, se realizó un estudio reológico con el fin de caracterizar su comportamiento durante el transcurso de la reacción.

Por último, se purificaron los productos de reacción con sorbitol, para su posterior análisis por espectrofotometría de masas, RMN y cromatografía de gases, con el fin de conocer el tipo de productos y enlaces formados por la transferencia de fructosa al sorbitol.

1. INTRODUCCION :

El termino de carbohidrato se asignó originalmente a los compuestos considerados hidratos de carbono, formados por carbono, hidrógeno y oxígeno según la formula general $C_n(H_2O)_n$. A medida que se fue disponiendo de mayor información, la definición se ha ampliado para abarcar numerosos compuestos con poca o ninguna similitud con la formula original. Actualmente los carbohidratos abarcan a los polihidroxi (-aldehidos, -cetonas, -alcoholes, -acidos y -aminas), sus derivados simples y los productos formados por la condensación de estos diferentes compuestos a través de enlaces glicosídicos.

El estudio de los carbohidratos y sus derivados ha enriquecido notablemente a la bioquímica y a la medicina. Recientes investigaciones, en concreto, han influido de una manera decisiva en la caracterización de diversos antibióticos y agentes antitumorales de naturaleza osídica. Se ha llegado así al descubrimiento de nuevas reacciones biosintéticas y mecanismos de control enzimático, así como de nuevas aplicaciones comerciales en distintas áreas (medicina, alimentos, agricultura, química fina, etc.) de una gran variedad de carbohidratos, debido a sus propiedades físicas y a su comportamiento.

Este relativamente "nuevo interés" por los carbohidratos se debe en buena medida a la introducción de nuevos métodos de purificación y análisis como la cromatografía de diversos tipos, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la espectrofotometría de masas y el análisis por difracción de rayos X, así como la disponibilidad de enzimas que actúan con gran especificidad, lo que ha dado origen a una nueva disciplina; la glicobiología, que a su vez ha contribuido al desarrollo de procesos tecnológicos

importantes.

Existen actualmente compañías que se especializan en la producción de toda una gama de gluco-derivados tales como neoazúcares, carbohidratos halogenados o aminados, ésteres de azúcares, oligosacáridos y polisacáridos. El presente trabajo trata principalmente sobre estos dos últimos tipos de carbohidratos.

Las fuentes tradicionales de carbohidratos han sido por mucho tiempo productos de origen vegetal y marino, pero precisamente su origen les confiere una calidad y disponibilidad variable además de una variedad limitada. Sin embargo, existe una gran variedad de polisacáridos y oligosacáridos de origen microbiano cuyo uso se ha ido generalizando. Entre estos polisacáridos podemos citar a las xantanas, las dextranas, las pululananas, los alginatos y las levanas entre otros; la mayoría de los cuales son producidos extracelularmente por una gran variedad de microorganismos.

La mayoría de los polisacáridos anteriormente mencionados tienen aplicación industrial: se utilizan en la recuperación industrial del petróleo, también como viscosantes y estabilizadores de emulsiones en la industria de pinturas; como plastificantes y para la formación de películas protectoras en frutas y alimentos; en la agricultura y horticultura como texturizantes de tierra o como protección para semillas; como vehículo para inoculantes y plántulas; para la administración de nutrientes y plaguicidas. También se utilizan para la extracción de moléculas orgánicas en sistemas de dos fases; para la inmovilización de células y enzimas, como soporte para medios de cultivo y en procesos fotográficos (Sutherland 1990).

Entre las aplicaciones médicas podemos citar su uso como viscosantes o vehículos de medicamentos, para la formación de encapsulados en medicamentos de liberación pro-

longada, como agentes inmunogénicos en vacunas, como agentes antitumorales o antivirales, como sustitutos del plasma sanguíneo, en la fabricación de fibras humectantes para curaciones, como sustituto provisional de piel en quemaduras, como lubricantes de articulaciones y en cirugía oftálmica (Sutherland 1990).

Entre los oligosacáridos de importancia comercial encontramos a los fructooligosacáridos, la isomaltosa, las ciclodextrinas, la rafinosa, etc, cuyo uso principal ha sido como edulcorantes y aditivos en alimentos, como auxiliares en problemas digestivos y preventivos del cáncer de colon (preprobióticos), como agentes inmunogénicos en vacunas, como agentes antitumorales, como adyuvantes de formulaciones farmacéuticas, etc.

El interés industrial de los polisacáridos y oligosacáridos de origen microbiano ha sido estimulado por sus propiedades específicas y porque garantizan la provisión de un material de calidad constante y precio estable, a diferencia de los productos que son extraídos de fuentes naturales.

Los polisacáridos y oligosacáridos microbianos son biodegradables, provienen de recursos renovables y son productos seguros, lo que los coloca en una situación muy ventajosa para ser utilizados en vez de productos no renovables, en un panorama de búsqueda de tecnologías limpias y seguras para el ambiente.

La disponibilidad de enzimas que actúan con gran especificidad sobre los carbohidratos ha provocado una transformación radical en el manejo de estos y ha ampliado de una manera importante los usos potenciales y las aplicaciones de los carbohidratos.

Las principales enzimas responsables de la síntesis de polisacáridos y oligosacáridos

son las transferasas. Estas enzimas tienen la capacidad de transferir residuos glicosídicos a una gran variedad de aceptores como alcoholes primarios, azúcares simples o cadenas glicosídicas, dando origen a toda una variedad de polisacáridos y oligosacáridos algunos de ellos de interés comercial.

En el grupo de trabajo del Dr. Agustín López Munguía se trabaja con dos enzimas transferasas, la glucosiltransferasa y la fructosiltransferasa. Las glucosiltransferasas transfieren residuos de glucosa a diferentes aceptores: es el caso de la dextrantransferasa que sintetiza polímeros de glucosa con enlaces $\alpha(1-6)$ con ramificaciones $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-3)$ llamados dextranas. Por otro lado, las fructosiltransferasas transfieren residuos de fructosa a diferentes aceptores. Específicamente, la levansacarasa transfiere residuos de fructosa y forma un polímero de fructosa conocido como levana, que tiene enlaces $\beta(2-6)$ y ramificaciones $\beta(2-1)$.

En ambos casos el sustrato donador es la sacarosa y el aceptor es la cadena de polímero que va creciendo, dextrana o levana dependiendo del caso.

Este trabajo es la continuación de un estudio iniciado en la Facultad de Química de la UNAM, donde se aisló un microorganismo del jugo de la caña de azúcar, que produce una fructosiltransferasa, al que con base a su morfología y características bioquímicas se identificó como *Bacillus circulans*. El microorganismo fue aislado a partir de azúcar mascabado, donde se buscaba en un principio un microorganismo productor de actividad dextrantransferasa. El criterio utilizado para el aislamiento fue la obtención de un microorganismo capaz de crecer en agar-sacarosa, en forma amplia y rápida produciendo colonias de aspecto gomoso (Bibbins 1990). Posteriormente se aislaron las co-

lonias y se utilizó un medio selectivo para obtener la cepa pura procediendo a su identificación. De esta forma se encontró que el microorganismo correspondía por las pruebas bioquímicas realizadas a un *Bacillus circulans*. (Bibbins 1990).

Durante ese mismo estudio se caracterizó la fermentación para la producción de la fructosiltransferasa, observándose que el pH óptimo de crecimiento y producción de la enzima es de 7 no siendo necesario controlarlo durante la fermentación, ya que este no varía demasiado. La temperatura óptima para la producción de actividad fructosiltransferasa resultó ser de 30 °C.

Al estudiar el efecto de la fuente de carbono utilizada durante la fermentación se observó que la enzima sólo es inducible en presencia de sacarosa como fuente de carbono.

La actividad fructosiltransferasa se extrajo del caldo de fermentación utilizando la misma técnica empleada para la dextrantransferasa: extracción- precipitación con polietilenglicol (PEG) a una concentración final de 25 %, ya que como se mencionó, en un principio, se pensó que se trataba de una dextrantransferasa. Se obtuvo un extracto con actividad levansacarasa y actividad hidrolasa asociada.

Como parte de ese mismo trabajo, se realizaron pruebas de purificación de la enzima, utilizando otros métodos tales como precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de filtración en gel con el fin de eliminar la actividad invertasa. Estas pruebas dieron como resultado patrones de actividad y formación de productos muy similares, sin lograr eliminar la actividad invertasa en ningún momento.

Durante el trabajo realizado en la Facultad de Química se caracterizó la actividad glo-

bal transferasa e invertasa sin medir y diferenciar cada una de las dos actividades presentes. Así se determinó que la temperatura óptima para la actividad global fué de 40 °C y el pH óptimo de 7.

Al llevar a cabo una hidrólisis del polímero formado se concluyó que estaba compuesto únicamente de fructosa, por lo que muy probablemente se trataba de una levana.

Con base en estos antecedentes se planteó como objetivo del presente trabajo la producción y caracterización cinética y fisicoquímica de la levansacarasa producida por la cepa de *Bacillus circulans*, con el fin de establecer sus constantes cinéticas y fisicoquímicas y lograr las condiciones de máxima transferencia y menor hidrólisis; hacer estudios de estabilidad y de las reacciones de aceptor para así conocer la capacidad de esta enzima para transferir fructosa a otras moléculas además de la levana y el agua.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fructosiltransferasas.

Las fructosiltransferasas pertenecen al grupo de las enzimas transglucosidasas. Son enzimas que catalizan la transferencia de azúcares a una gran variedad de moléculas aceptoras. Las fructosiltransferasas tienen como principal sustrato a la sacarosa, de la cual transfieren moléculas de fructosa al agua, a alcoholes o a otros azúcares aceptores dando origen a gran variedad de oligosacáridos.

Las Fructosiltransferasas más importantes son la levansacarasa, la inulinsacarasa y una tercera enzima conocida únicamente como fructosiltransferasa que, a diferencia de las dos anteriores, no forma polímero y que da origen a diversos fructooligosacáridos.

2.1.1 Levansacarasa.

La levansacarasa es una enzima extracelular producida por diferentes bacterias como *Aerobacter levanicum* y *Bacillus subtilis*, entre otras. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en *B. subtilis* donde es inducible y extracelular y consiste de una sola cadena polipeptídica de 50 KD.

La levansacarasa cataliza la siguiente reacción de transfructosilación:



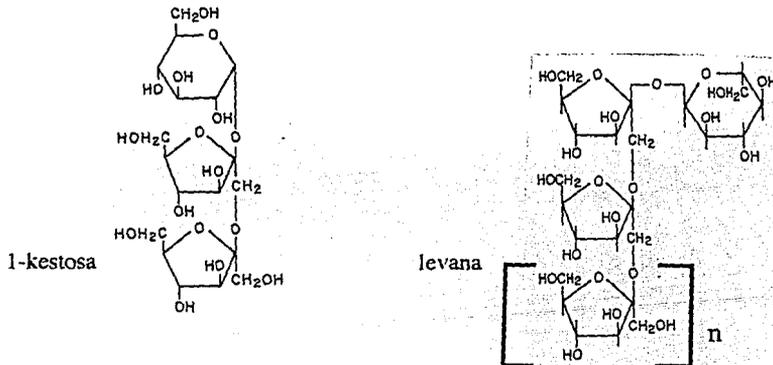
el aceptor puede también ser la misma sacarosa, la glucosa, el agua u otros azúcares. La sacarosa o la glucosa pueden servir de iniciadores para la síntesis de la levana, polímero de fructosa con enlaces $\beta(2-6)$ y ramificaciones $\beta(1-2)$ que pueden llegar a te-

ner más de 10,000 residuos de fructosa. Cuando el aceptor es la levana, la enzima puede sintetizar polímeros de hasta 60,000 unidades de fructosa.

2.1.2 Fructosiltransferasas.

Estas enzimas son de origen fúngico en su mayoría y en muchos casos intracelulares. Llevan a cabo la transferencia de una, dos o tres moléculas de fructosa a la sacarosa, dando origen a las kestosas. Dichos fructooligosacáridos tienen un efecto muy importante en la respuesta fisiológica debido a que no son degradados por el intestino humano y favorecen el crecimiento de la flora intestinal (bifidobacterias), por lo que ya son utilizados como aditivos en alimentos en países como Japón y Estados Unidos.

Fig.1 Estructura de los principales productos de las fructosiltransferasas



2.2 Fuentes de Fructosiltransferasas.

Las fuentes microbianas de enzimas fructosiltransferasas son principalmente bacterias y hongos. Es posible afirmar que las levansacarosas son producidas en su mayoría por

bacterias, algunas de ellas de vida libre como las del genero *Bacillus* y otras patógenas como *Streptococcus* o *Pseudomonas*, en las que la infección está asociada a la formación de polímero que le ayuda adherirse a su hospedero.

Las fructosiltransferasas formadoras de fructooligosacáridos son en su mayoría producidas por hongos y por lo general no son excretadas al medio, lo que facilita su inmovilización en el mismo micelio.

En las tablas 1 y 2 se presentan las principales especies productoras de los dos grupos de enzimas Fructosiltransferasas de origen microbiano, resumiéndose las condiciones óptimas de funcionamiento.

Tabla 1. Microorganismos productores de enzimas levansacarasas.

Microorganismos	pH óptimo	T óptima	Actividad específica	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	7	30	100 U/mg	Tanaka (1979)
<i>Rahnella aquatilis</i>	6	60	731 U/mg	Ohtsuka (1992)
<i>Erwinia herbicola</i>	7.2	25	—	Keith (1991)
<i>Erwinia amilovorora</i>	7	—	20 U/mg	Gross (1992)
<i>Bacillus polymyxa</i>	7	30	—	Han (1989)
<i>Zymomonas mobilis</i>	6.5	—	0.171 U/mg	Yanase (1992)
<i>Bacillus circulans</i>	6-7	40	27 U/mg	Bibbins (1990)

U = la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa/min.

Otros microorganismos productores de levansacarasas : *Agrobacterium levanicum*, *Corinebacterium levaniiformans*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*

Tabla 2. Microorganismos productores de fructosiltransferasas.

Microorganismos	pH óptimo	T óptima	Actividad específica	Actividad sobrenadante	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	5	-	16.8 U/mg	2.46 U/ml	Cheetham (1988)
<i>Aurobasidium sp.</i>	5	50-55	-	-	Hatashi (1991)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5	60	2406 U/mg	-	Lee (1992)
<i>Penicillium frequentans</i>	-	30	-	5.4 U/ml	Usami (1991)
<i>Apergillus niger</i>	5.5	55	550 U/mg	7 U/ml	Park (1991)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	8	60	-	-	van Balken (1991)

U = la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa/min.

2.3 Otras fuentes de Fructosiltransferasas.

Otra fuente de fructosiltransferasas son las plantas donde se producen levansacarosas e inulinsacarosas. Estas enzimas son utilizadas por las plantas para producir fructanas (del tipo inulina y levana) que son almacenadas en altas concentraciones en algunos tejidos de las plantas como una reserva similar al almidón (Pollock 1986).

2.4 Producción de Levansacarosas.

La levansacarasa se produce generalmente en cultivo sumergido y por lo común es excretada al medio por el microorganismo, en la mayoría de los casos la enzima es inducible en presencia de sacarosa como fuente de carbono durante el cultivo, aunque existen ejemplos como el reportado por (Perlot & Monsan 1980) de una levansacarasa de *Bacillus subtilis* constitutiva que es sintetizada durante la fermentación a partir de glicerol como fuente de carbono.

2.4.1 Medio de cultivo.

La mayoría de los medios de cultivo reportados para las diferentes especies productoras de levansacarasa utilizan sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y en algunos casos como en el de la bacteria *Rahnella aquatilis* (Ohtsuka y col. 1992) utilizan además extracto de levadura. La fuente de carbono generalmente es sacarosa aunque existen reportes de bacterias que producen levansacarasa de manera constitutiva y no necesitan ser inducidas para producir la enzima. En estos casos se utiliza otra fuente de carbono como el glicerol o la glucosa. Perlot y col. (1980) reportan el caso de una enzima de *B. subtilis* que crece y produce levansacarasa en presencia de glicerol lo que permite obtener una enzima libre de polímero, aunque con una actividad tan solo de 1.9 ULS/ml (ULS = unidades de levansacarasa; la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de $1\mu\text{mol}$ de glucosa por minuto). Esto contrasta con una actividad de 8.29 U/ml obtenidas por Ohtsuka y col. (1992), en el sobrenadante de fermentación con la cepa de *Rahnella aquatilis*.

La temperatura de cultivo de los microorganismos productores de levansacarasa oscila entre los 30° y 37° C y el pH usualmente entre 6 y 7.5.

2.4.2 Purificación.

La levansacarasa ha sido purificada por numerosos métodos dentro de los que destaca el uso de la precipitación con sulfato de amonio y/o etanol como primer paso de purificación. Dentro de los siguientes pasos de purificación encontramos la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de filtración en gel.

Tanaka y col. (1979) reportan el uso de una columna de hidroxipatita para remover la

levana que se encuentra unida a la enzima. Por otro lado Le Brun (1980) en un trabajo sobre purificación y cristalización de la levansacarasa de *B. subtilis*, también menciona el uso de una columna de hidroxapatita para eliminar el polímero de la enzima y poder cristalizarla para dilucidar su estructura terciaria.

Existen dos reportes de purificación a homogeneidad por cromatografía de intercambio iónico de levansacarasas intracelulares: uno de *Rahnella aquatilis* (Ohtsuka 1992) y otro de *Zymomonas mobilis* (Lynes 1983).

Es importante señalar que no existe ningún reporte sobre el uso de polietilenglicol PEG como agente precipitante para la obtención de la levansacarasa.

2.5 Ingeniería Genética

De las levansacarasas reportadas, la producida por *Bacillus subtilis* ha sido la más estudiada desde muchos puntos de vista, existiendo abundante bibliografía al respecto. En 1983 Guy y col. aislaron y clonaron el gen *sacB* que codifica para la levansacarasa de *B. subtilis* utilizando un banco genómico de *B. subtilis* que fue clonado en el fago λ Charon 4A. El fragmento clonado contenía, además del gen estructural *sacB* de la levansacarasa extracelular, la región reguladora *sacR* de dicho gen.

A mediados de los 80's Steinmetz y col. (1985) llevaron a cabo la secuenciación del gen *sacB* de *B. subtilis* y sus sitios de control genético. Actualmente se conoce la secuencia completa del gen *sacB* que consta de 2kb y se sabe que la región promotora de dicho gen se encuentra a 200 pb del inicio del gen *sacB*; su función primordial es actuar como atenuador. Por otro lado se ha dilucidado la función del gen *sacR* cuya mu-

tación provoca la expresión constitutiva de la levansacarasa en *B. subtilis*. Esta región se localiza a 450 pb del inicio del gen sacB.

2.6 Ingeniería de proteínas

Los trabajos de ingeniería de proteínas realizados a la levansacarasa de *B. subtilis*, han sido enfocados al estudio de la naturaleza del sitio activo y la especificidad de dicha enzima para llevar a cabo la reacción de síntesis del polímero o de hidrólisis de la sacarosa.

Por medio de mutagénesis sitio dirigida Chambert y col. (1991) han estudiado la naturaleza del sitio activo de la levansacarasa de *B. subtilis*. Al cambiar un residuo de arginina en el sitio 331 por histidina, lisina, leucina y serina, obtuvieron levansacarosas mutantes con distintas características catalíticas y diferentes especificidades.

Otro trabajo realizado por Chambert y col. (1992) mediante ingeniería de proteínas ha sido la obtención de una levansacarasa de mayor peso molecular que sintetiza polímeros de fructosa de mayor tamaño y con más ramificaciones. Esto lo lograron al llevar a cabo una mutación sitio dirigida en el gen sacB de *B. subtilis* para cambiar el codón de terminación, inmediatamente después del cual existe una región de lectura abierta de 20 aminoácidos.

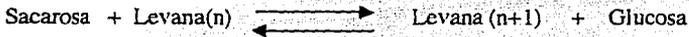
Debido a la escasa aplicación industrial de la levansacarasa, no existe mucha información sobre trabajos encaminados a obtener una enzima más resistente a condiciones extremas de pH y temperatura. Sin embargo, se encontró una patente francesa donde se reporta una levansacarasa resistente a pH ácidos (Solvay-Enzymes 1994).

2.7 Mecanismo de reacción.

2.7.1 Actividad hidrolítica y de transferencia.

El mecanismo de reacción de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* ha sido estudiado por varios investigadores. Dedonder (1972), propuso la formación de un intermediario fructosil-enzima durante la reacción en presencia de sacarosa. Sin embargo Dedonder considera que el esquema general de acción de la levansacarasa es muy complicado ya que la enzima puede llevar a cabo varias reacciones al mismo tiempo.

La reacción reversible para la síntesis de levana puede representarse como :

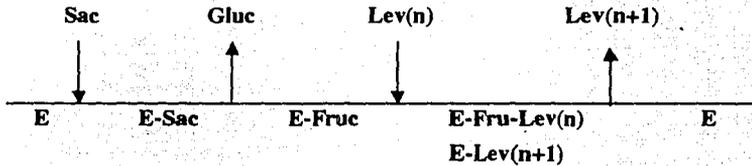


y la reacción de hidrólisis de la sacarosa ;



Por lo anterior Dendonder buscó las condiciones en las cuales sólo se llevara a cabo la reacción de síntesis del polímero y no la hidrólisis y de esta manera poder proponer un mecanismo de reacción mas sencillo.

Así propone un mecanismo de reacción tipo ping-pong, donde la enzima se une a la sacarosa para dar un intermediario enzima sacarosa que después de liberar a la glucosa de la sacarosa da origen al intermediario fructosil-enzima. Este último, en presencia del aceptor levana, incrementa el tamaño de la levana. Es interesante notar que el aceptor y el producto son prácticamente el mismo compuesto.



Donde

E= Levansacarasa **Fru** = Fructosa **Glu** = Glucosa

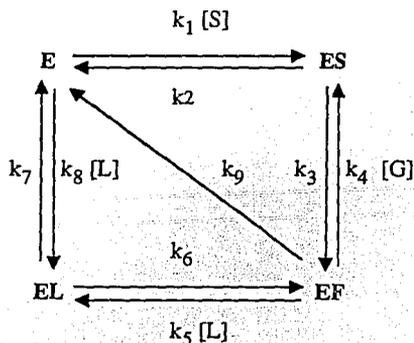
Sac = Sacarosa **Lev** = Levana

Chambert y col. (1974) publicaron un trabajo donde reportan las mediciones de las velocidades iniciales de todas las reacciones que lleva a cabo la Levansacarasa de *B. subtilis* así como la medición de la velocidad de intercambio isotópico en el equilibrio. En dicho trabajo concluyen que la formación de un intermediario fructosil-enzima **F-E** es un paso obligado para llevar a cabo cualquiera de las reacciones que cataliza la levansacarasa.

En dicho estudio proponen nuevamente el mecanismo de reacción tipo ping-pong, como el que más se apega al comportamiento cinético de la levansacarasa de *B. subtilis*. (figura 2).

En este modelo, la formación del complejo F-E puede dar lugar en presencia de levana, a la síntesis de levana de mayor tamaño o en ausencia de levana, a la hidrólisis de dicho complejo F-E para liberar fructosa.

Fig. 2 Mecanismo de reacción de la levansacarasa de *B. subtilis* propuesto por Chambert y col. (1974)



Donde

E = Enzima, S = Sacarosa, G = Glucosa, L = Levana

En la tabla 3 muestran los valores de las constantes cinéticas calculadas en el mismo trabajo, donde se puede observar que $k_5 \gg k_9$ lo que indica que la reacción de síntesis de levana es mucho más rápida que la reacción de hidrólisis de la sacarosa, en presencia de levana en el medio de reacción, a 22° C y pH 6. Esto se demuestra en parte por

que la levana a bajas concentraciones actúa como activador y a concentraciones altas funciona como inhibidor. Esta dualidad del rol cinético de la levana, se explica por su función química, ya que actúa tanto como aceptor, como donador de fructosa.

Tabla 3. Constantes cinéticas aparentes para el mecanismo tipo ping-pong de la Levansacarasa. Tomada de Chambert y col. (1974).

Constantes cinéticas	Valores
k_1	$6.6 e^5 M^{-1} \text{seg}^{-1}$
k_2	$8.3 e^3 \text{seg}^{-1}$
k_3	$5.2 e^2 \text{seg}^{-1}$
k_4	$1.25 e^4 M^{-1} \text{seg}^{-1}$
k_5	$2.9 e^5 M^{-1} \text{seg}^{-1}$
k_6	$4.7 e^1 \text{seg}^{-1}$
k_7	$1.4 e^3 \text{seg}^{-1}$
k_8	$8.7 e^5 M^{-1} \text{seg}^{-1}$
k_9	$5 e^1 \text{seg}^{-1}$

En 1976 Chambert y Treboul publicaron un trabajo en el que lograron aislar el intermediario F-E. En ese trabajo se propone que la reacción de transfructosilación es una reacción en la que se conserva la configuración de la fructosa y que ocurre por medio de un doble desplazamiento que involucra una inversión transitoria de la configuración de la fructosa en el intermediario fructosil-enzima. La fructosa se une a la enzima en configuración α muy probablemente a través del C-2, formando un enlace ester-glicosídico con el β -carboxilo de un grupo aspártico de la proteína.

El grupo carboxilo del residuo aspártico de la levansacarasa actúa como un nucleófilo más fuerte que el agua sobre la fructosa y como un mejor liberador de la glucosa que la sacarosa ya que un grupo carboxilo desprotonado es mejor agente nucleófilo que el agua y un enlace ester-glicosídico es más reactivo que el enlace glicosídico de la sacarosa.

Así, se propone un mecanismo de dos pasos para la reacción de transfructosilación que lleva a cabo la levansacarasa de *B. subtilis* :

Primer paso:

Después de la formación del intermediario **ES** ocurre una reacción catalítica ácido base que abre el enlace acetal de la sacarosa. El grupo carboxilo de un residuo aspártico lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el C-2 de la molécula de fructosa. Por otro lado, un residuo ácido del sitio activo de la proteína, le transfiere sus protones a la glucosa que se libera. El resultado de este primer paso es la formación del intermediario **F-E** en el que la fructosa muy probablemente está en configuración α .

Segundo paso:

Una vez que la glucosa se ha liberado, una molécula de aceptor se une al complejo fructosil-enzima y el grupo ácido del sitio activo ya desprotonado, puede actuar como catalizador básico removiendo un protón de la molécula aceptora para aumentar su reactividad nucleofílica. Ya en forma de anión, el aceptor lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el enlace ester del complejo **F-E**.

2.7.2 Sitio activo

La naturaleza del sitio activo de la levansacarasa de *B. subtilis* ya ha sido dilucidada por Chambert y Petit-Glatron (1991) quienes a partir de una cepa mutante que presentaba baja actividad polimerasa identificaron una mutación en el sitio 331 del gene que codifica para la levansacarasa. En dicha posición se encontraba un residuo de histidina en vez de uno de arginina. Este cambio provoca diferencias en la especificidad de la reacción. A partir de este descubrimiento ellos realizaron una serie de cambios en el sitio 331 y llegaron a las siguientes conclusiones:

- Es esencial la presencia de una carga catiónica en el sitio 331 para que haya actividad catalítica
- La naturaleza del aminoácido en la posición 331 modula importantemente la especificidad y la eficiencia de la transfructosilación. La arginina³³¹ es la que mayor porcentaje de transferencia presenta, seguida de la histidina³³¹. Estos dos grupos son donadores de protones y pueden deslocalizar su carga positiva fácilmente a diferencia de la lisina que también es donador de protones pero no tiene capacidad de deslocalizar su carga.

De esta manera y tomando en cuenta otros trabajos de este mismo investigador se sabe que la reacción de transfructosilación involucra una catálisis bifuncional donde un grupo ácido de la proteína actúa como donador de protones (arginina³³¹) con la asistencia de un grupo nucleófilo (β -carboxilo de un residuo aspártico) para llevar a cabo la síntesis de levanas o la transfructosilación a otros aceptores como el agua u otros azúcares.

2.8 Propiedades de la levansacarasa

2.8.1 Cinética (modelamiento)

La cinética de la levansacarasa es compleja ya que generalmente la enzima lleva a cabo más de una reacción a la vez. Algunos autores trabajando con la levansacarasa de *Bacillus subtilis* han establecido las condiciones en las que sólo se lleva a cabo una de las reacciones, para de esta forma poder determinar las constantes cinéticas individuales. Chambert y col. (1974) establecieron las condiciones para llevar a cabo casi únicamente la reacción de transfructosilación para la síntesis de la levana y calcularon 9 constantes cinéticas (tabla 3). Posteriormente, el mismo autor Chambert y col. (1991) trabajando con una cepa silvestre y cuatro mutantes, calcularon la k_{cat} y K_m de cada una de ellas para la reacción de hidrólisis ya que en presencia de bajas concentraciones de sacarosa (< 50 mM) solo se lleva a cabo la reacción de hidrólisis. Además calcularon las constantes de velocidad de la levansacarasa en presencia de levana y de inulina k_{levana} y $k_{inulina}$ para cada variante, sin embargo debido a que en ambos casos se tiene siempre reacción de hidrólisis, dichos valores son referidos como k_{levana}/k_{H_2O} y $k_{inulina}/k_{H_2O}$. La constante de velocidad k_{H_2O} es considerada de pseudo-primer orden y contiene el factor de concentración de agua.

A continuación se muestran los valores de dichas constantes para la cepa silvestre (Arg³³¹):

	Reacción de hidrólisis	Reacción de transferencia	
k_{cat}	35 (seg ⁻¹)	$10^{-2} \times (k_{levana}/k_{H_2O})$	11.1 M
$10^2 \times K_m$	0.4 (M)	$10^{-2} \times (k_{inulina}/k_{H_2O})$	2 M

2.8.2 Aceptores

La levansacarasa es una enzima con poca especificidad en cuanto a aceptores; es decir, es capaz de transferir fructosa a toda una variedad de moléculas, principalmente carbohidratos aunque también transfiere al agua y a alcoholes.

Entre los primeros trabajos reportados sobre reacciones de aceptor, se encuentra el de Dedonder (1972) sobre la capacidad de la levansacarasa de *B. subtilis* para transferir fructosa a la D-xilosa, a la D-galactosa y a la L-arabinosa.

No existen muchos trabajos más publicados al respecto, aunque quizá uno de los más completos es el que realizó Ohtsuka (1992) en el que lleva a cabo reacciones con una levansacarasa de *Rahnella aquatilis* en presencia de monosacáridos, oligosacáridos y azúcares de alcoholes.

Este autor encontró que con dicha enzima, los monosacáridos que presentan más alta eficiencia como aceptores son la D-xilosa y la L-arabinosa. Los oligosacáridos que mejor eficiencia mostraron son la lactosa, la melibiosa, la maltosa y la celobiosa. En cuanto a los azúcares de alcoholes, ninguno de ellos resultó ser aceptor.

Existen algunas patentes japonesas relativamente recientes sobre procesos para producir xilosilfructósido (Nisshin-Sugar-Mfg 1994), lactosilfructósido (Nisshin-Sugar-Mfg 1993) galactosilfructósido (Nisshin-Sugar-Mfg 1992), lactosacarosa (Hayashibara-Biochem; Biofermin-Pharm. 1992), lo que nos indica que estos fructooligosacáridos pueden tener importancia comercial.

2.9 Productos de la levansacarasa y aplicaciones

2.9.1 Levanas

Las levanas son los principales productos de la Levansacarasa; se trata de polímeros de fructosa con enlaces $\beta(2-6)$ de alta solubilidad en agua, a diferencia de las inulinas, cuyo enlace $\beta(2-1)$ las hace poco solubles.

Las levanas tienen potencialmente las mismas aplicaciones que las dextranas. Uno de los principales usos de las dextranas es en la purificación de moléculas biológicas por medio de la formación de un sistema de dos fases, lo que permite contar con un método muy efectivo y poco drástico para la obtención de compuestos lábiles algunos de ellos de uso farmacéutico o diagnóstico.

Las dextranas se utilizan como sustituto del plasma sanguíneo. En solución al 6% presentan la viscosidad y el comportamiento coloide-osmótico similar al plasma sanguíneo humano. Pueden ser utilizadas también para la administración de hierro en casos de anemia, en forma de complejos dextrana -hierro ya que la dextrana se absorbe rápidamente.

Franz y col. (1988) reportan el uso de levanas como agentes inmunogénicos, basándose en el efecto que tienen algunos polisacáridos (entre ellos la levana) para modificar la respuesta inmune del individuo; de esta forma, el hospedero de tumores puede obtener la capacidad de destruir las células tumorales por medio de su propio sistema inmune.

La levana también es producida por algunas bacterias de la placa dental y ha sido por lo tanto implicada en la caries y en enfermedades periodontales, por lo que el estudio

de sus propiedades resulta de sumo interés para la prevención de estas enfermedades.

2.9.2 Kestosas.

Las kestosas también conocidas como fructooligosacáridos son compuestos que se encuentran en algunos vegetales como el plátano, la cebolla, las raíces de espárrago, el tomate, la cebada, etc. También pueden ser sintetizados a partir de sacarosa por medio de enzimas fructosiltransferasas microbianas. Generalmente las enzimas capaces de sintetizar estos compuestos son de origen fungal, aunque existen reportes de algunas levansacarasas de bacterias que tienen disminuida la capacidad de hacer polímero (levanas), pero sintetizan fácilmente kestosas (Chambert y col. 1991 y Cheetham y col. 1989) como la 1-Kestosa (GF2), la nistosa (GF3), y la β -fructofuranosilnistosa (GF4). Estos fructooligosacáridos tienen sabor dulce por lo que pueden ser utilizados como edulcorantes no cariogénicos, favorecen el crecimiento de la microflora intestinal, disminuyen los problemas de constipación intestinal y eliminan la producción de sustancias putrefactas en el intestino. No son digeridos por el intestino delgado y llegan al intestino grueso, donde juegan un papel muy importante en la respuesta fisiológica debido a sus propiedades físicas y a que son fermentados por la flora intestinal (Bifidobacterias) y no son degradados por bacterias indeseables como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* o *Escherichia coli*.

La proliferación de las bifidobacterias tiene un efecto fisiológico muy positivo debido a lo siguiente:

*) Producen ácido láctico o acético que ejercen un efecto antibacteriano y producen una disminución de la absorción de amonio y aminos a través de las paredes del intestino.

*) Producen vitaminas y enzimas como vitamina B1 y B6, ácido fólico, lisozima.

*) No hay producción de amonio, aminos o H_2S a partir de aminoácidos, ni producción de nitritos a partir de nitratos o amonio a partir de urea.

Estos productos son ya ampliamente utilizados en Japón, donde existen mas de 500 productos alimenticios para humanos, que contienen fructooligosacáridos como aditivos. También se utilizan como aditivos para alimentos de animales en E.U y Japón.

Actualmente se realizan estudios en E.U. para utilizar los fructooligosacáridos como edulcorantes no calóricos en yogurts comerciales.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Producción de la Levansacarasa.

3.1.1 *Microorganismo*

El microorganismo utilizado fue aislado en la Facultad de Química a partir de jugo de caña y fué identificado como un *Bacillus circulans*, productor de una levansacarasa extracelular.

3.1.2 *Reactivos*

Todos los reactivos utilizados en esta etapa fueron de la marca Baker, a excepción del extracto de levadura que fué de Difco laboratories. Se utilizó un ensayo enzimático de Boehringer para medir glucosa y fructosa.

3.1.3 *Medio de Cultivo*

El medio de cultivo que se utilizó para la producción de la enzima por fermentación, fue el propuesto por Tsuchiya y col. (1952) y optimizado por Barroso (1995). Este último se empleó para todas las fermentaciones y producción de inóculos. En la tabla 4 se describe su composición.

3.1.4 *Producción del Inóculo*

La producción del inóculo se llevó a cabo en matraces de 250 ml con 50 ml de medio estéril utilizando un vial conteniendo a la cepa de *Bacillus circulans* conservada en glicerol y bajo congelación. El microorganismo se creció a 30°C y 200 rpm, por 12 hrs o hasta alcanzar una D.O. mayor o igual a 0.7 a 650 nm y después de realizar una

dilución 1:10.

3.1.5 Fermentación para producción de la Enzima

La fermentación para la producción de la enzima se llevó a cabo en matraces Fembach de 2 litros con 1 litro de medio estéril y con un inóculo del 10% del volumen total. Las fermentaciones se llevaron a cabo con control de la temperatura pero sin control del pH.

Condiciones de fermentación:

- Temperatura controlada a 30° C
- Agitación de 200 rpm en agitador orbital con control de temperatura

- En fermentador de 2L
 - *) agitación 100 rpm
 - *) aireación 0.5 vvm
- pH inicial del medio: 7 sin control
- Tiempo aproximado de fermentación: 10-14 hrs.

3.1.5.1 Controles durante la fermentación

Durante la fermentación se hizo un seguimiento del crecimiento celular midiendo la densidad óptica del caldo de cultivo a 650 nm, utilizando un espectrofotómetro Spec-tronic 601 Milton Roy (E.U.). También se monitoreó el pH utilizando un potenciómetro Corning (E.U.).

Al final de la fermentación se centrifugó el caldo a 10,000 rpm a 4° C por 25 min. en una centrifuga marca Beckman J2-21 (E.U.), reteniendo el sobrenadante.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo

Componentes	g/l
Sacarosa	30
Extracto de Levadura	20
K_2HPO_4	20
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.06621
$MgSO_4 \cdot H_2O$	0.02298
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0183
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01119
NaCl	0.01

3.1.6 Determinación de la actividad

La actividad total de la enzima (invertasa y transferasa) fué medida vía la determinación enzimática de la glucosa liberada durante la reacción, para lo cual se utilizó un analizador bioquímico YSI 2700 Select (E.U.).

Las actividades transferasa e invertasa fueron medidas y diferenciadas utilizando un ensayo enzimático de Boehringer para medir glucosa y fructosa, de la siguiente for-

ma:

(GT) = Glucosa total liberada, proveniente tanto de la reacción de transferencia como de hidrólisis.

(Fi) = Fructosa liberada, proveniente la reacción de hidrólisis.

(Gp) = Glucosa correspondiente a la reacción de transferencia, calculada de la siguiente forma: $(GT) - (Fi) = (Gp)$

Las velocidades iniciales fueron definidas como :

- V_H (Velocidad de hidrólisis) = $d[Fi]/dt$

- V_T (Velocidad de transferencia) = $d[Gp]/dt = [GT - Fi]/dt$

Todas las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (E.U.) a 365 nm.

3.1.6.1 Definición de unidades de actividad

La unidad de actividad transferasa se definió como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa en un minuto, mientras que la unidad de actividad hidrolasa es la cantidad de enzima que libera un micromol de fructosa en un minuto. La actividad total es la suma de las dos actividades y se define como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa total en un minuto. En todos los casos bajo las siguientes condiciones: temperatura 30°C, [sacarosa] = 6%, pH 7 en buffer fosfatos 50 mM.

3.1.7 Cuantificación de proteína

La proteína soluble se midió utilizando el método descrito por Bradford (1976), em-

pleando albumina sérica de bovino como estándar.

3.2 Purificación de la Enzima

3.2.1 Obtención del extracto crudo

La enzima fué obtenida del sobrenadante de fermentación por precipitación con polietilenglicol PEG 1500 al 50%. El PEG se agregó al sobrenadante de fermentación libre de células hasta observar la precipitación. El precipitado se recuperó por centrifugación a 8,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se eliminó y se recuperó la pastilla conteniendo la actividad deseada, y se resuspendió en buffer fosfatos pH 7, 50 mM.

3.2.2 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de Poliacrilamida (PAGE-SDS), según método de Laemmli (1970). Se utilizó una mini cámara para electroforesis vertical Hoeffer SE-200. Los marcadores de peso molecular empleados son los siguientes: 97 kD fosforilasa B, 66.2 kD albumina de suero bovino, 45 kD ovoalbumina, 31 kD anhidrasa carbónica de bovino. Todos los reactivos utilizados son grado electroforesis marca BioRad.

3.2.3 Enfoque Isoeléctrico en condiciones nativas

Para la determinación del punto isoeléctrico en gel de poliacrilamida se llevó a cabo un electroenfoque en condiciones nativas para lo que se utilizó una mini cámara modelo 111 IEF, siguiendo las instrucciones del fabricante. El gradiente de pH se logró utilizando Pharmalyse al 2%. Todos los reactivos utilizados fueron marca BioRad.

3.2.4 Enfoque Isoeléctrico en lecho granular

El enfoque isoelectrico en lecho granular para la determinación del punto isoelectrico de la enzima se llevó a cabo en una cámara Multiphor II LKB de Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó Pharmalite 3-10 y Sephadex IEF. El resto de los reactivos fueron BioRad.

3.2.5 Cromatografía de líquidos de alta presión HPLC

Se llevó a cabo una separación por cromatografía de filtración en gel en el HPLC utilizando una columna BioSep-SEC-S4000, para proteínas.

Condiciones de operación :

Detector: UV Waters 486

Longitud de onda: 280 nm.

Volumen de inyección : 160 μ L

Composición de la fase : Buffer fosfatos pH 7, 50mM.

Flujo : 1 ml/min.

Intervalo entre fracciones : 0.6 min.

3.3 Identificación de los productos de reacción

3.3.1 Identificación por HPLC

Los productos de reacción que se obtuvieron al utilizar diferentes tipos de aceptores fueron detectados por medio de HPLC, utilizando una columna para análisis de carbohidratos de 3.9 x 300 mm marca Waters.

Condiciones de operación:

Detector : IR Waters 410

Volumen de inyección : 10 - 20 μ L

Composición de la fase : acetonitrilo-agua 75:25

Flujo: 1 ml/min.

3.3.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se realizaron cromatografías en capa fina como un método alternativo al HPLC para la identificación de compuestos productos de reacción con los aceptores utilizados. Se utilizaron placas de silica gel HP-K de 10 x 10 cm marca Whatman.

Activación de la placa: Dietanolamina 0.1M y 10 mM de ácido acético en acetonitrilo.

Tiempo de activación; 15 min. aproximadamente.

Fase móvil: Acetonitrilo-agua 80:20. Tiempo de corrida aproximadamente 15 min.

Revelador: Alfa naftol-Etanol. 80% etanol, 10.5% ácido sulfúrico, 6.5% agua 3% p/v α -naftol. Temperatura de revelado, 100 °C hasta ver la aparición de las muestras.

3.4 Purificación de productos de reacción

La purificación de algunos productos de reacción se llevó a cabo por medio de HPLC preparativa, utilizando una columna μ Bondapak-NH₂ de 19X150 mm marca Waters.

Se empleo como fase móvil Acetonitrilo-H₂O 75:25 con un flujo de 8 ml/min. y se colectaron las fracciones correspondientes.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Producción de la levansacarasa

En trabajos previos con el microorganismo productor de la levansacarasa se definieron las condiciones óptimas para el crecimiento de la cepa de *Bacillus circulans*. De esta forma se sabe que dicha cepa crece mejor a 30°C, a un pH inicial de 7 y a 200 rpm en matraces de 250 ml en incubadora orbital. El medio de cultivo también fué optimizado (ver materiales y métodos).

Bajo estas condiciones se llevaron a cabo fermentaciones en matraces de 250, 500 y 2800 ml, al igual que en un fermentador de 2L. La figura 3 muestra la cinética de fermentación para la producción de la enzima levansacarasa, donde se observa que la producción de la enzima está asociada al crecimiento del microorganismo.

Durante la evolución de la fermentación pudo observarse que en cuanto se alcanza la fase estacionaria de crecimiento, la producción de actividad enzimática se detiene (12 hrs) y comienza a decaer.

Durante la fase exponencial, se observó una velocidad específica de crecimiento de 0.172 hr^{-1} . La velocidad de formación de producto fué de $0.168 \text{ U/ml} \times \text{hr}$. No se aprecia en general una fase lag.

De esta forma se cuenta con un proceso de fermentación que permite producir un sobrenadante con 2 U/ml de actividad enzimática total, medida como μmoles de glucosa liberada por minuto, a partir de sacarosa. Es conveniente señalar que durante la etapa inicial de este trabajo la actividad se determinó mediante azúcares reductores. Al constatar la presencia de dos actividades (transferasa e hidrolasa) se puso de manifiesto

to el error en esa determinación, ya que al medir poder reductor se cuenta dentro de la actividad levansacarasa no solo la actividad invertasa (cuando se mide glucosa total producida) sino que esta última se duplica (glucosa total + fructosa de hidrólisis). Por esta razón se diseñó el método descrito en materiales y métodos.

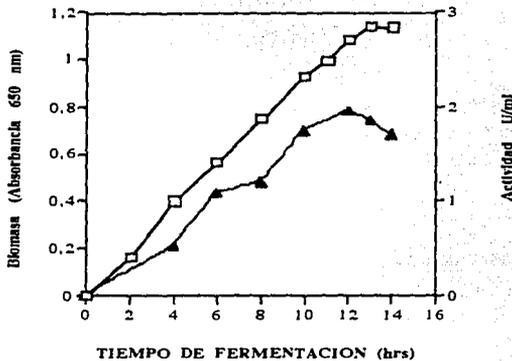


Fig. 3 Perfil de crecimiento y actividad enzimática durante la fermentación para la producción de la levansacarasa de *Bacillus circulans*. (▲) Biomasa en unidades de densidad óptica y (□) Actividad enzimática total. La actividad se determinó utilizando un analizador bioquímico YSI para medir glucosa.

4.2 Purificación de la levansacarasa

4.2.1 Recuperación de la levansacarasa del sobrenadante de fermentación

La recuperación de la levansacarasa se llevó a cabo por precipitación con polietilenglicol (PEG) del sobrenadante de fermentación. Se aprovechó esta técnica dado que el mecanismo de la reacción que lleva a cabo la enzima para sintetizar la levana involucra la unión covalente de dicho polímero con la enzima, por lo que la levansacarasa

siempre tiene adherida una molécula de levana.

Siguiendo el mismo principio reportado para la purificación de la dextranasa (Paul y col. 1984) se agregó PEG hasta lograr la aparición visual de precipitado, en principio conteniendo al polímero adherido a la enzima, con lo cual su obtención se vuelve muy selectiva ya que el resto de las proteínas permanecen en el sobrenadante.

Lo anterior da lugar a un método muy eficiente y rápido de obtención de la enzima en el que se pueden alcanzar 8 veces de purificación en un solo paso. Dicho método no ha sido reportado anteriormente para esta enzima en particular, siendo la precipitación con sulfato de amonio y etanol los principales métodos empleados como primeros pasos de purificación de las levansacarinas reportadas.

En la tabla 5 se muestran los resultados de la precipitación de la levansacarasa con PEG. Antes de llevar a cabo la precipitación se agregó sacarosa para promover la formación de mayor cantidad de polímero y así facilitar la precipitación. De esta manera se obtuvo un rendimiento aparente por arriba del 100% en la recuperación. La explicación a este hecho se basa en el efecto que tiene la presencia de levana en la velocidad inicial de reacción. En efecto, la presencia de una alta concentración de polímero (levana) provoca un aumento en la velocidad de reacción (Chambert y col. 1974 y Tanaka y col. 1979).

Tabla 5. Purificación de la Levansacarasa de *Bacillus circulans*

	Volumen ml	Proteína mg	Concentración de levana mg/ml	Actividad Total (U)	Actividad Específica U/mg	Veces de Purificación	Rendimiento %
Sobrenadante	740	197.87	-	750	3.79	1	100
Extracto PEG	220	39.05	17.9	1195.15	30.6	8.07	159

4.2.2 Otras etapas de purificación

Los siguientes pasos de purificación se llevaron a cabo con el fin de comprobar que la actividad detectada en el extracto de PEG provenía de una sola enzima y que no existía ninguna enzima contaminante (invertasa) que fuese responsable de actividades similares a las de la levansacarasa.

4.2.3 Separación de la levansacarasa por Cromatografía de Filtración en Gel en HPLC

Una pequeña alícuota del extracto enzimático obtenido por medio de PEG se inyectó en una columna de filtración en gel en HPLC y se obtuvieron los perfiles de proteína y actividad que se muestran en la figura 4.

Como puede observarse, en el perfil de proteína se observaron dos picos que absorben a 280 nm. Las actividades transferasa e hidrolasa coinciden con el primer pico de proteína, no habiéndose detectado actividad en ninguna otra zona.

Los resultados de la cromatografía por filtración en gel sugieren que el extracto de PEG consiste en su mayoría de una enzima levansacarasa con actividades transferasa e hidrolasa y que no presenta otra enzima de distinto tamaño, con actividad similar.

4.2.4 Determinación del Peso molecular de la enzima por Electroforesis en condiciones desnaturizantes

Las fracciones colectadas en la separación por cromatografía de filtración en HPLC, fueron sometidas a una electroforesis en condiciones desnaturizantes. En todos los casos en los que la fracción presentaba actividad se obtuvo una banda de mayor inten-

sidad que el resto (fracciones 6 a 10), disminuyendo dicha intensidad en las fracciones mas alejadas del pico de actividad. Por esta razón se determinó el peso molecular de las bandas mencionadas, por existir una alta probabilidad de que corresponda a la levansacarasa de *B. circulans*.

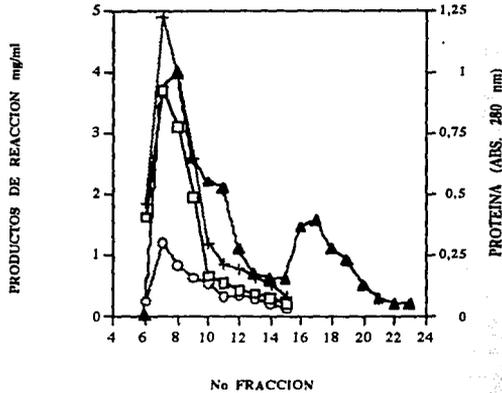


Fig. 4 Perfil de proteína y actividades de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel en HPLC con una columna BioSep-SEC-4000.

(▲) proteína, (□) fructosa transferida, (○) fructosa hidrolizada, (+) fructosa total producto de las dos reacciones anteriores.

La figura 5 muestra el gel obtenido, pudiéndose observar que la fracción que mostró la mayor concentración de proteína (fracc. 7) y mayor actividad contiene la banda común a las fracciones 6 a 10 con mayor intensidad. De acuerdo con los marcadores de peso molecular, dicha banda resulta ser de aproximadamente 52 KD, un valor muy cercano al de la levansacarasa de *B. subtilis* 50 KD (tabla 6) por lo que podría pensarse que se trata de la misma enzima.

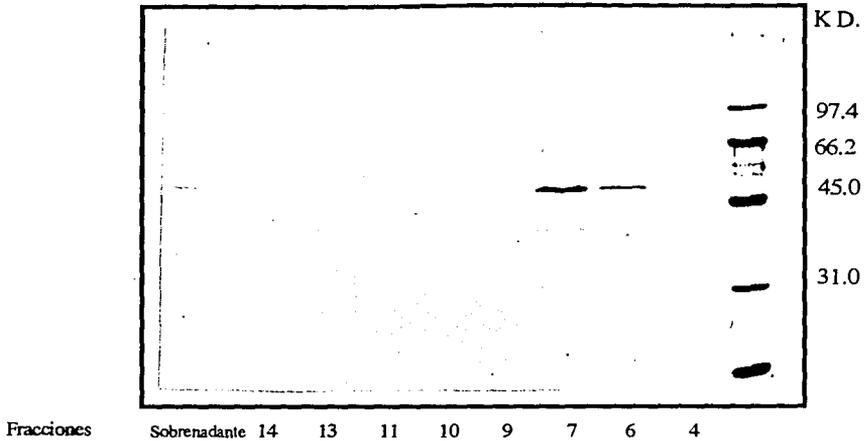


Fig. 5 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la levansacarasa de *B. circulans*

Tabla 6. Comparación de los PM de levansacarosas de diversas fuentes

Fuente	PM (KD)	Método	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	50	SDS-PAGE	Le Brune (1988)
<i>Rahnella aquatilis</i>	64	SDS-PAGE	Ohtsuka (1992)
<i>Zymomonas mobilis</i>	56	SDS-PAGE	Yanase (1992)
<i>Bacillus circulans</i>	52	SDS-PAGE	Este trabajo

4.2.5 Enfoque isoelectrico en matriz granular

Se llevó a cabo un electroenfoque en Sephadex (ver materiales y métodos) del extracto enzimático de la levansacarasa con el fin de comprobar si basándose en la diferencia de cargas de las proteínas era posible o no detectar otra enzima con actividad sacarasa en el extracto de PEG. Esto correspondería a una actividad contaminante de peso

molecular similar a la levansacarasa. Al mismo tiempo se determinó el punto isoeléctrico de la levansacarasa de *B. circulans*. Los resultados se muestran en la figura 6 donde se observa la presencia de un pico muy bien definido a pH 4.5 donde se detectó actividad transferasa e hidrolasa que corresponden a la levansacarasa. La figura 6 nos muestra que el PI de la enzima es de 4.5 y que aparentemente no existe otra enzima con actividad hidrolasa. Sin embargo, también se observó actividad transferasa e hidrolasa aunque en mucho menor proporción en otras zonas a lo largo del gel, lo que hace pensar que no hubo un enfoque completo de la proteína.

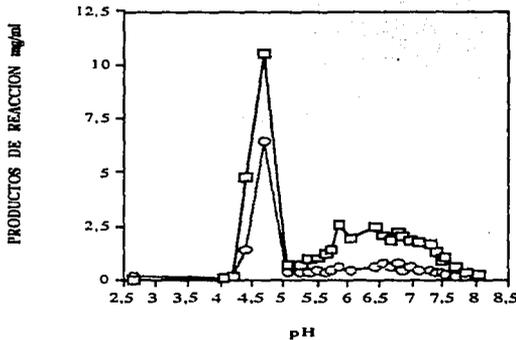


Fig. 6 Electroenfoque en matriz granular del extracto de PEG. La actividad se determinó incubando alícuotas en buffer fosfatos 50 mM con 6% de sacarosa a 30°C por 4 horas. Los productos de reacción fueron determinados como se indica en materiales y métodos. (□) fructosa producto de la hidrólisis, (○) glucosa liberada durante la reacción de polimerización.

En base a los resultados anteriores podemos afirmar que el extracto de PEG contiene una enzima levansacarasa con dos actividades; actividad invertasa y transferasa. Este hecho resultaba importante de comprobar ya que existen reportes de microorganismos que producen varios tipos de sacarosas al mismo tiempo, tal es el caso de la bacteria

Zymomonas mobilis (Hideshi y col. 1992), que produce tres enzimas sacarosas, una invertasa intracelular, otra invertasa extracelular y una levansacarasa extracelular. Por otro lado, Hayashi y col. (1991) reportan la producción de dos β -fructofuranosidasas por *Aureobasidium sp.* las cuales se producen simultáneamente y sintetizan el mismo producto (1-kestosa), pero que difieren en peso molecular.

4.3 Caracterización fisicoquímica de la levansacarasa

4.3.1 Determinación de la temperatura óptima

La presencia de actividad hidrolasa acompañando a la actividad transferasa, es una característica común de las levansacarosas. Sin embargo, en algunos casos las actividades pueden ser regulables simplemente controlando las condiciones de reacción. Un ejemplo de lo anterior es la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* estudiada por Yanase y col. (1992) que presenta una alta proporción de actividad transferasa a bajas temperaturas (15°C); conforme se incrementa la temperatura disminuye la actividad transferasa aumentando la hidrolasa, a 40°C ha desaparecido la actividad transferasa por completo.

Con el fin de determinar la temperatura óptima para cada una de las actividades de la enzima levansacarasa y determinar si la temperatura era un factor a considerar para favorecer el predominio de alguna de ellas, se llevaron a cabo reacciones a diferentes temperaturas. Como puede observarse en la fig. 7a, la temperatura óptima para la actividad transferasa es 40°C mientras que para la actividad invertasa esta se ubica en el rango de 40- 45 °C.

Por otro lado, en la fig. 7b se muestra el efecto de la temperatura de reacción en el

porcentaje de la actividad transferasa. Así se observa que conforme aumenta la temperatura, el porcentaje de transferencia se ve disminuído, predominando la actividad invertasa. Lo anterior indica que la actividad transferasa es mas sensible a la temperatura de lo que es la actividad hidrolasa. Crittenden y col. (1994) estudiando el efecto de la temperatura sobre la levansacarasa de *Zymomonas mobilis*, encontraron que después de cinco horas de incubar la enzima por arriba de 30°C el complejo enzima-levana sufre una disociación, lo que provoca una caída en la actividad transferasa, sin pérdida de actividad hidrolasa.

Los resultados muestran que la actividad transferasa predomina sobre la actividad invertasa a 20°C, sin embargo, la diferencia en el porcentaje de transferencia entre 20 y 30°C es mínima, mientras que la diferencia en la velocidad de reacción es grande, por esta razón se seleccionó una temperatura de 30° C para llevar a cabo reacciones de transferencia.

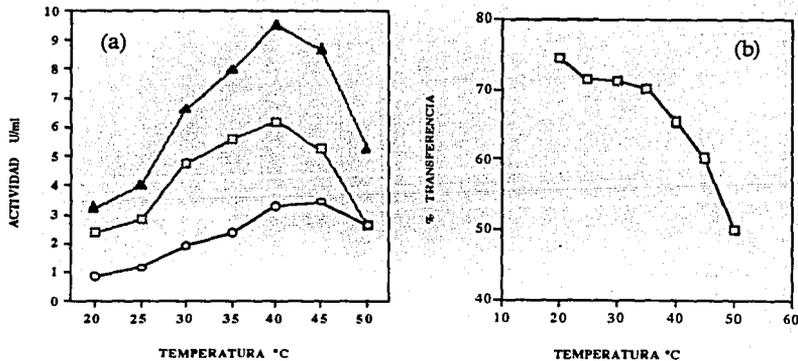


Fig. 7 Efecto de la temperatura en las velocidades de reacción de la enzima levansacarasa. En el ensayo se utilizaron 0.66 U/ml de enzima, 175.3 mM de sacarosa en fosfato de potasio 50 mM pH 7. a) (○) hidrolasa, (□) transferasa, (▲) actividad total. b) Efecto de la temperatura en el % de actividad transferasa de la levansacarasa.

A partir de los datos de la figura 7 se calcularon las energías de activación de la transferasa e hidrolasa de acuerdo al modelo de Arrhenius (fig.8), obteniéndose un valor de 9,438 cal/mol para la transferasa y 12,788 cal/mol para la hidrolasa, lo que permite describir el efecto de la temperatura analizado con anterioridad.

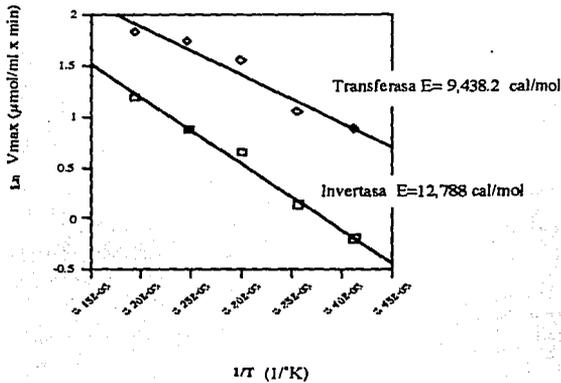


Fig. 8 Energías de activación de las dos actividades presentes en la levansacarasa de *B. circulans*

4.3.2 Estabilidad térmica de la levansacarasa

Con el fin de estudiar el efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima, se incubaron alícuotas del extracto enzimático a diferentes temperaturas por 20 minutos y se midió su actividad residual. Los resultados se muestran en la figura 9.

Como puede observarse, la enzima es estable a 30 y 35°C. Sin embargo, a 40 °C comienza a desactivarse, perdiéndose toda la actividad después de 20 minutos a 60°C. Además del efecto desnaturalizante de la temperatura sobre la levansacarasa no debe

descartarse la posibilidad de una influencia sobre los resultados anteriores el efecto propuesto por Crittenden y col. (1994) quienes atribuyen a la temperatura la capacidad de desestabilizar el complejo enzima levana en la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* lo que provoca una disminución en la capacidad de la enzima para llevar a cabo la reacción de transferencia a la levana prevaleciendo únicamente la hidrolasa.

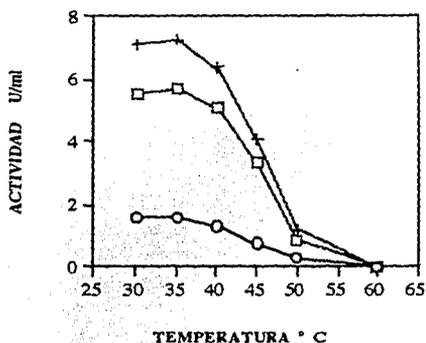


Fig. 9 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de la levansacarasa. Se incubaron alícuotas del extracto de PEG a las temperaturas indicadas durante 20 minutos, midiéndose posteriormente la actividad a 30°C y pH 7. (○) hidrolasa. (□) transferasa. (+) actividad total.

En la tabla 7 se muestran los tiempos de vida media de la enzima, calculados a partir de los datos de la figura 9 para 40 y 45°C. Puede observarse que mientras que a 40°C el tiempo de vida media para la hidrolasa es de 25 minutos, para la actividad transferasa es de 203 minutos, es decir el tiempo de vida media de la actividad hidrolasa es la octava parte del correspondiente a la actividad transferasa. Por otro lado, a 45°C el tiempo de vida media para la invertasa es de 6.3 minutos, casi la quinta parte del tiempo de vida media de la transferasa que es de 34 minutos. Dichos valores indican que la actividad hidrolasa es más sensible a la temperatura que la transferasa.

4.3.3 Estabilidad de la levansacarasa al almacenamiento a 4°C

Se estudió el efecto del almacenamiento a 4°C en la estabilidad del extracto enzimático. Se almacenaron alícuotas a 4°C y se les determinó actividad a lo largo de un periodo

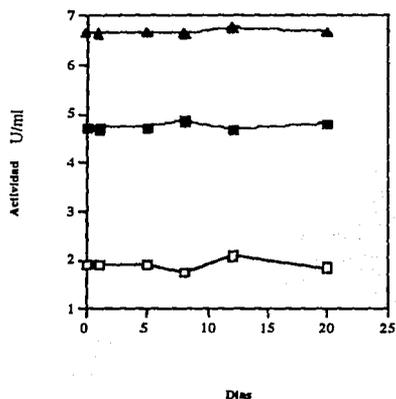


Fig. 10 Estabilidad de la levansacarasa al almacenamiento a 4°C. (□)hidrolasa, (■) transferasa, (▲) actividad total.

de 20 días para comprobar la estabilidad del extracto bajo tales condiciones.

La figura 10 muestra gráficamente el comportamiento de las dos actividades presentes en la enzima, por lo que puede observarse la enzima es muy estable a 4°C, ya que después de 20 días de almacenamiento no se apreció pérdida de actividad. Sin embargo, debido al riesgo de contaminación se decidió mantener el extracto en congelación a (-25°) C ya que de esa manera el extracto se conserva por tiempo indefinido sin sufrir alteración.

4.3.4 Determinación del pH óptimo

El pH del medio de reacción puede llegar a tener un efecto muy importante sobre la selectividad de la reacción que se lleva a cabo. Van Balken y col. (1991) trabajando con una fructosiltransferasa de *Aspergillus phoenicis* que sintetiza fructooligosacáridos y además hidroliza la sacarosa, encontraron que mientras que a pH 5 prácticamente solo se lleva a cabo reacción de hidrólisis, a pH 8 se logra disminuir casi totalmente esta reacción y solo se presenta actividad transferasa.

Con el fin de estudiar el efecto del pH sobre las actividades de la levansacarasa de *B. circulans* y determinar el pH óptimo para la reacción de transferencia, se midieron las velocidades iniciales de reacción de la levansacarasa a distintos valores de pH en un rango de 3 a 9. La figura 11 muestra el perfil de actividad del extracto enzimático en función del pH de la solución.

Se encontró que a pH 3 la enzima no presenta actividad. Por otro lado, el pH óptimo para la actividad transferasa está entre 5 y 7 mientras que para la reacción de hidrólisis la zona óptima es más estrecha con un punto óptimo a pH de 6. Esto es sin duda debi-

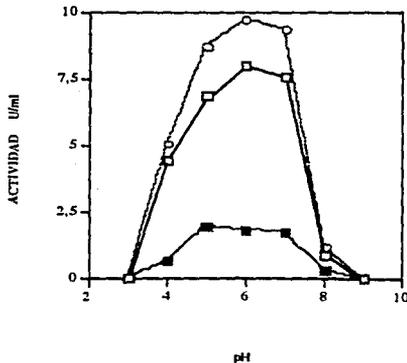


Fig. 11 Efecto del pH en las actividades de la levansacarasa de *B. circulans*. Se utilizaron 0.93 U/ml de enzima en cada ensayo. T = 30°C. (□) Actividad hidrolasa, (●) actividad transferasa, (○) actividad total.

do a la mayor estabilidad de la actividad transferasa discutido previamente. A pH de 8 las dos actividades han disminuído notoriamente y a pH de 9 ya no se detecta ninguna actividad. Como se verá mas adelante, los porcentajes de actividad transferasa e hidrolasa estan asociados también a la concentración de levana en el medio. En este caso la preparación contiene una baja proporción de levana. Sin embargo, el efecto del pH en las actividades es independiente de este otro factor.

En la tabla 7 se resumen las principales características fisicoquímicas de la levansacarasa de *B. circulans*.

Los resultados anteriores indican que el pH dentro del rango de 5 - 7 tiene solo un ligero efecto sobre las actividades de la levansacarasa y que no existe un valor de pH al cual se pueda lograr el predominio de una sola de las actividades de esta enzima.

Tabla 7. Constantes fisicoquímicas de la enzima Levansacarasa de *B. circulans*

Actividad	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Energía de activación (cal/mol)	Tiempo de vida media a 40°C min	Tiempo de vida media a 45°C min
Invertasa	5	45	12 788	25.3	6.33
Transferasa	6 - 7	40	9 438	203	34

4.3.5 Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de reacción.

Se llevó a cabo la medición de las velocidades de reacción de la levansacarasa a distintas concentraciones de sacarosa. Durante el ensayo se utilizó una concentración de 0.66 U/ml de actividad total y la concentración de sacarosa se varió desde 0.0029 M hasta 8.7 M. El ensayo fue realizado a 30°C. En las figuras 12a y 12b se presenta la gráfica de las velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sacarosa. Como puede observarse en la fig. 12b, a concentraciones arriba de 600 mM se presenta un efecto inhibitorio por exceso de sustrato.

La cinética de la levansacarasa es compleja ya que depende de la concentración de dos sustratos (levana y sacarosa) y forma más de un producto de reacción. Como puede observarse, las reacciones de transferencia e hidrólisis siguen comportamientos distintos por efecto de la sacarosa. A concentraciones de 600 mM se observa una menor ve-

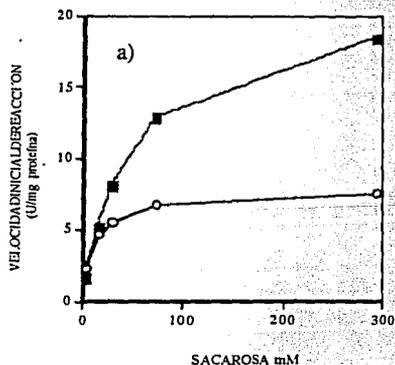


Fig. 12a Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad de hidrólisis y transferencia de la levansacarasa de *B. cirulans* a 30°C. [sacarosa] = 3- 300 mM. (○) hidrolasa, (■) transferasa.

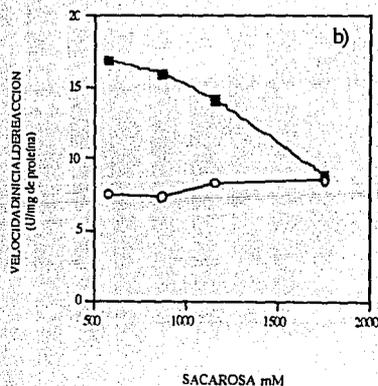


Fig. 12b Efecto de la concentración de sacarosa en velocidad de hidrólisis y transferencia de la levansacarasa de *B. cirulans* a 30°C. [sacarosa] = 600 - 1700 mM. (○) hidrolasa, (■) transferasa.

locidad de reacción como consecuencia de una inhibición por sustrato, mientras que la actividad hidrolasa se mantiene constante después de 100 mM sin mostrar inhibición por sustrato, después de lo cual se observa una ligera recuperación de la actividad hidrolasa.

Un aumento en la concentración de sacarosa provoca un aumento en la actividad de transferencia, partiendo de un 40% de transferencia a 3 mM de sacarosa, hasta alcanzar un 70% de actividad transferasa en relación a la actividad total a 300 mM.

En contraste, el porcentaje de actividad hidrolasa disminuye con el aumento en la concentración de sacarosa.

Chambert y col. (1974), estudiaron las reacciones que lleva a cabo la levansacarasa de *B. subtilis* en presencia de concentraciones crecientes de sacarosa. Estos autores pretendieron estudiar por separado cada reacción. Para la reacción de hidrólisis lograron condiciones para llevar a cabo únicamente esa reacción, utilizando una enzima libre de polímero y bajas concentraciones de sacarosa (por abajo de 12 mM) lo que permite que solo esté presente la actividad hidrolasa. Sin embargo, no lograron definir las condiciones para obtener únicamente actividad transferasa y aunque no muestran gráficas del comportamiento de las dos actividades como función de la concentración de sacarosa, encontraron que existe una relación entre la concentración inicial de sacarosa y la síntesis de levana durante la reacción: a mayor concentración de sacarosa, mayor porcentaje de actividad transferasa, de manera similar a lo observado en este trabajo.

Dedonder y col. (1972), también han estudiado los aspectos cinéticos de la levansacarasa de *B. subtilis*, sin embargo no reportan estudios sobre el efecto de la concentra-

ción de sacarosa sobre las actividades de la enzima.

En ninguno de los casos anteriores se reporta el efecto de inhibición por sustrato observado en este trabajo.

De los resultados obtenidos se concluye que altas concentraciones de sacarosa favorecen la actividad transferasa de la levansacarasa de *B. circulans*.

4.3.6 Efecto de la concentración de levana en el medio de reacción.

Con el fin de observar el efecto que tiene la presencia de levana en el medio de reacción sobre las actividades de la levansacarasa de *B. circulans*, se realizaron reacciones con una concentración de enzima de 1.92 U/ml de actividad total y 175.3 mM de sacarosa, variando la concentración de levana desde 2.5 mg/ml hasta 50 mg/ml.

Como se aprecia en la figura 13 desde el inicio se observa un aumento muy marcado de la actividad transferasa por la presencia de la levana en el medio. Conforme aumenta la concentración de levana, aumenta la actividad de transferencia para sintetizar polímero hasta llegar a un valor constante. Sin embargo, es interesante observar que la actividad hidrolasa no se ve disminuída con la presencia de levana por lo que solo se alcanza un 75% de actividad transferasa en relación a la total, durante la reacción en presencia de levana.

El efecto activador de la levana sobre la velocidad de reacción ha sido reportado por otros autores, Chambert y col. (1974), observaron el mismo efecto activador de la levana sobre la actividad transferasa de la levansacarasa de *B. subtilis*, donde a partir de una concentración de 5 mM de levana (PM 15,000 \pm 3000) se obtiene un valor máximo y constante de actividad transferasa.

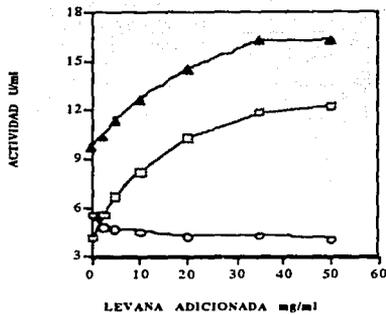


Fig. 13a Efecto de la concentración de levana en el medio de reacción sobre las actividades de la levansacarasa de *B. circulans*. A las concentraciones de levana indicadas en la gráfica debe sumarse la levana que acompaña a la enzima 2.43 mg/ml de fructosa. Se utilizaron 0.77 U/ml de medio de reacción. (○) Actividad hidrolasa, (□) actividad transferasa, (▲) actividad total.

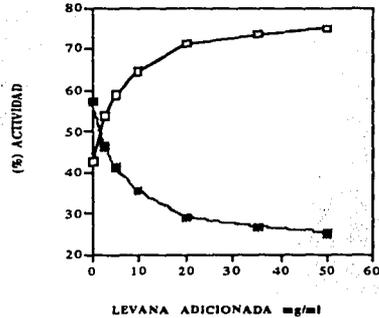


Fig. 13b Efecto de la presencia de levana en las actividades de la levansacarasa. (□) síntesis de polímero, (▲) hidrólisis.

Posteriormente, Tanaka y col. (1979), estudiando el efecto de la levana sobre la síntesis del polímero, encontraron que la levana agregada al medio, actúa como activador de la transferasa pero no actúa como aceptor en la transfructosilación. Lo anterior lo comprobaron al agregar al medio de reacción tripsil-levana (levana con grupos hidroxilo en el C-2 y en el C-6 de cada uno de los extremos fructosilo terminal) encontrando que este compuesto ejerce el mismo efecto que la levana, lo que indica su participación como activador y no como aceptor.

En ese mismo trabajo, utilizando filtración en gel, comprobaron que el peso molecular de la levana permanece constante después de la reacción y solo hay un aumento en la

concentración de esta. El papel activador de la levana no ha podido ser explicado del todo, ya que aunque Chambert y col. (1976) proponen un mecanismo de reacción donde la levana actúa como sustrato aceptor de fructosa en una reacción tipo ping pong, no existe ninguna otra propuesta que sustente lo expuesto por Tanaka y col. (1979).

Robyt y col. (1977) observaron el mismo efecto activador sobre una dextranasa de *Streptococcus mutans* OMZ176 al agregar tripsildextrana. Estos autores proponen dos tipos de intracciones por medio de las cuales la dextrana adicionada al medio ejerce un efecto activador sobre la enzima:

La primera es la acción de la dextrana como un nucleófilo que desplaza del sitio activo las cadenas de dextrana crecientes que se encuentran unidas covalentemente. El desplazamiento de las cadenas de dextrana, genera una enzima libre de polímero que puede reaccionar muy rápido con sacarosa, lo que podría tomarse como una activación de la enzima. Conforme se aumenta la concentración de dextrana adicionada, la velocidad de desplazamiento nucleofílico de cadenas de dextrana se incrementa.

La segunda propuesta, es un efecto alostérico para formar enzima activa a partir de moléculas de enzima inactiva por la inducción de una conformación favorable de la enzima por efecto de la dextrana.

Estas dos propuestas pudieran servir para explicar la activación de la levansacarasa por efecto de la presencia de levana en el medio. Sin embargo, todavía no se cuenta con un mecanismo de reacción detallado para la levansacarasa como el que se tiene para la dextranasa. Para asumir que ambos mecanismos de reacción son similares es necesario comprobar para la levansacarasa lo que Robyt y col. (1974) encontraron

sobre la dextransacarasa:

- a) La dextransacarasa lleva a cabo la síntesis de dextrana adicionando una unidad glucosilo al extremo reductor de la dextrana.
- b) Tanto la glucosa como la dextrana se unen covalentemente a la dextransacarasa sin que esta pierda su actividad.
- c) La glucosa acoplada a la enzima sirve como donador para la polimerización de la dextrana.

En base a estos elementos, Robyt y col. (1974) propusieron un mecanismo de reacción para la dextransacarasa que involucra la existencia de dos grupos catalíticos, X₁ y X₂ en la enzima, los cuales llevan a cabo un ataque nucleofílico sobre la sacarosa para formar complejos glucosídicos. El oxígeno del OH del C₆ de uno de los glucosilos realiza un ataque nucleofílico sobre el C₁ del otro glucosilo formando un enlace α (1-6); esto libera uno de los grupos nucleófilos que a su vez ataca a otra molécula de sacarosa formando un nuevo complejo glucosil-enzima. De esta forma, la enzima lleva a cabo la síntesis de dextrana, con los dos grupos nucleófilos formando complejos covalentes con la glucosa y la dextrana alternadamente.

La idea de que este mismo modelo pudiera aplicarse a la levansacarasa no parece ser muy remota ya que por lo que se sabe dichas enzimas guardan muchas similitudes:

- a) Ambas enzimas forman un homopolímero no lineal a partir de la sacarosa.
- b) El polímero que sintetizan dichas enzimas se encuentra unido covalentemente al sitio activo de éstas.

c) Ambas enzimas además de sintetizar el polímero presentan cierta actividad hidrolítica.

d) La adición del polímero que forman estas enzimas, en el medio de reacción tiene un efecto activador sobre la reacción de transferencia.

Sin embargo, es necesario continuar la investigación al respecto para contar con elementos convincentes que demuestren la semejanza de ambos mecanismos de reacción.

4.4 Reacción en presencia de Aceptores

Una peculiaridad de las levansacarasas es su capacidad para transferir fructosa a diferentes moléculas. Ohtsuka y col. (1992) reportan un estudio de reacciones con distintos aceptores en el que evalúan de manera muy general la capacidad de distintos compuestos para actuar como aceptores.

En el presente trabajo se analizó la capacidad de la levansacarasa de *B. circulans* para transferir a la maltosa, galactosa, lactosa, metanol, inositol, serina y treonina, evaluándose de manera muy general la capacidad de dichos compuestos para actuar como aceptores. La tabla 8 muestra los resultados de las reacciones en presencia de estos aceptores, donde se utilizó una relación sacarosa:aceptor 1:1 molar.

Como se observa en la tabla 8, la levansacarasa de *B. circulans* presentó gran capacidad de transferencia a la maltosa y galactosa, y capacidad moderada para transferir fructosa a la lactosa y metanol, mientras que no presentó capacidad para transferir al inositol, ni a los aminoácidos serina y treonina bajo las condiciones mencionadas con anterioridad.

Posteriormente se realizaron reacciones en presencia de maltosa, galactosa, sorbitol,

lactosa y glicerol y se evaluó con mayor detalle el porcentaje de cada una de las reacciones que se llevan a cabo. En la tabla 9 se muestran los porcentajes de cada reacción dependiendo del aceptor que se utilizó. En el caso del glicerol no se pudo determinar el porcentaje transferido a este aceptor y al polímero.

Tabla 8. Capacidad de transferencia de la levansacarasa de *B. circulans* en presencia de aceptores.

Aceptor	Transferencia a aceptor
maltosa	+++
galactosa	+++
lactosa	++
metanol	++
inositol	-
serina	-
treonina	-

+++ % transferencia mayor de 50%, ++ transferencia menor de 50%, - no se observó transferencia.

Como puede observarse en la tabla 9, en presencia de maltosa y galactosa no se llevó a cabo síntesis de polímero y la reacción que predominó fue la transferencia al aceptor. El porcentaje de sacarosa hidrolizada, fué menor que para el control. Esto indica que se trata de aceptores fuertes que evitan no solo la transferencia a las cadenas de fructosa sino que también la transferencia al agua.

Cuando se emplean lactosa y sorbitol como aceptores, se llevan a cabo las tres reacciones; transferencia a polímero, transferencia a aceptor e hidrólisis de sacarosa. En presencia de lactosa estas tres reacciones ocurren casi en la misma proporción, mientras que en sorbitol siguió predominando la hidrólisis. Esto implica que se trata de

Tabla 9. Reacciones en presencia de aceptores.

Aceptor	% Transferencia a polímero	% Transferencia a aceptor	% Hidrolisis
Maltosa	0	76	24
Galactosa	0	63	37
Sorbitol	29	21	50
Lactosa	38	33	29
Glicerol	nd	nd	50
Control (sin aceptor)	43	0	57

Las reacciones se llevaron a cabo durante 5 hrs. a 30° C y pH 7, utilizando 0.66 U/ml de actividad total por ensayo y una relación sacarosa:aceptor de 1:1.

nd = no se determinó

aceptores menos potentes que los dos anteriores ya que no logran eliminar del todo las dos actividades naturales de la enzima. En la figura 14 se muestra gráficamente este

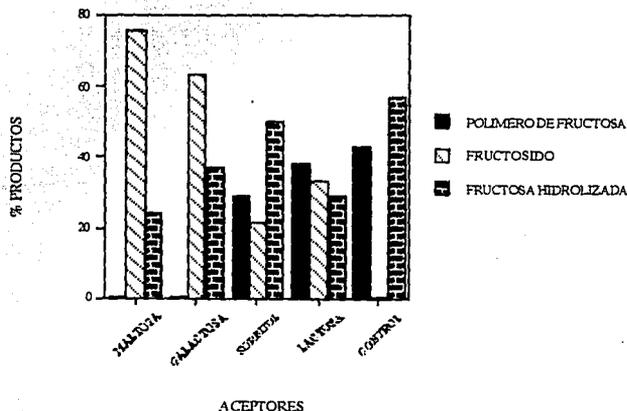


Fig. 14 Efecto de la presencia de azúcares aceptores en el medio de reacción. La reacción se llevó a cabo durante 5 hrs a 30°C. Se utilizaron 0.66 U/ml de enzima por ensayo y una relación sacarosa:aceptor 1:1 molar.

comportamiento.

En la tabla 10 se resume la capacidad de la levansacarasa de *B. circulans* para transferir fructosa a diferentes aceptores en comparación con otras levansacarosas reportadas en la literatura. Como puede observarse no existen reportes de reacciones en presencia de glicerol y metanol, en el caso del sorbitol el único reporte encontrado lo coloca como mal aceptor de la reacción de transfructosilación.

Las figuras 15, 16, 17 y 18 muestran los cromatogramas de las reacciones en presencia de los diferentes aceptores al tiempo cero y a las cinco horas de reacción. Estos cromatogramas muestran la presencia del fructósido producido durante la reacción en presencia del aceptor. A partir de los valores obtenidos de los cromatogramas, se calcularon los valores de la tabla 9. La figura 19 muestra el cromatograma de la reacción sin aceptor.

Tabla 10. Capacidad de algunas levansacarosas para transferir fructosa a ciertos aceptores.

Aceptor \ Origen	<i>Ranheilla aquatilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus circulans</i>
maltosa	+	nr	+
lactosa	+	+	+
galactosa	+	+	+
sorbitol	-	nr	+
glicerol	nr	nr	+
metanol	nr	nr	+
glucosa	nr	+	nr
xylosa	+	+	nr
arabinosa	nr	+	nr
Referencia	Otsuka (1992)	Dedonder (1972)	Este trabajo

nr. prueba no realizada o no reportada.

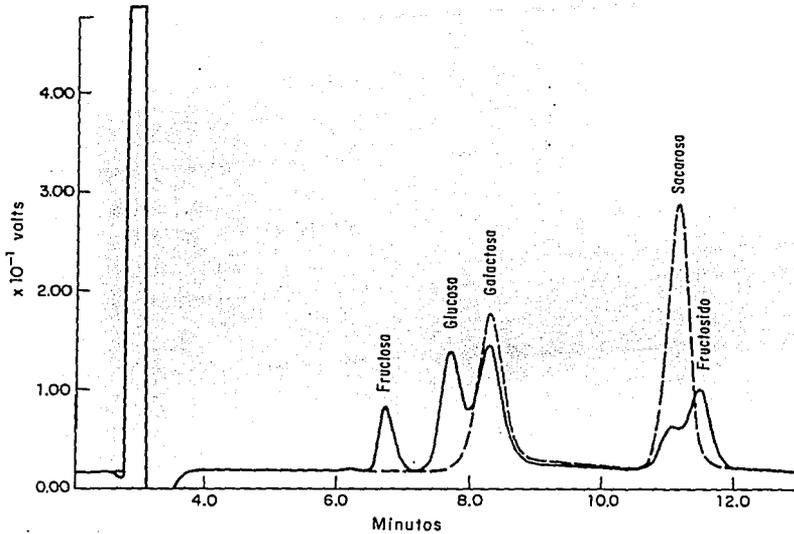


Fig. 15 Cromatograma de HPLC de los productos de reacción en presencia de **galactosa**, utilizando una columna para análisis de carbohidratos. Fase móvil: acetonitrilo-agua 75:25. La reacción se llevó a cabo en presencia de 60 mg/ml de sacarosa y 60 mg/ml de galactosa. Se utilizaron 0.66 U/ml de medio de reacción. (---) tiempo cero, (—) 5 hrs. de reacción.

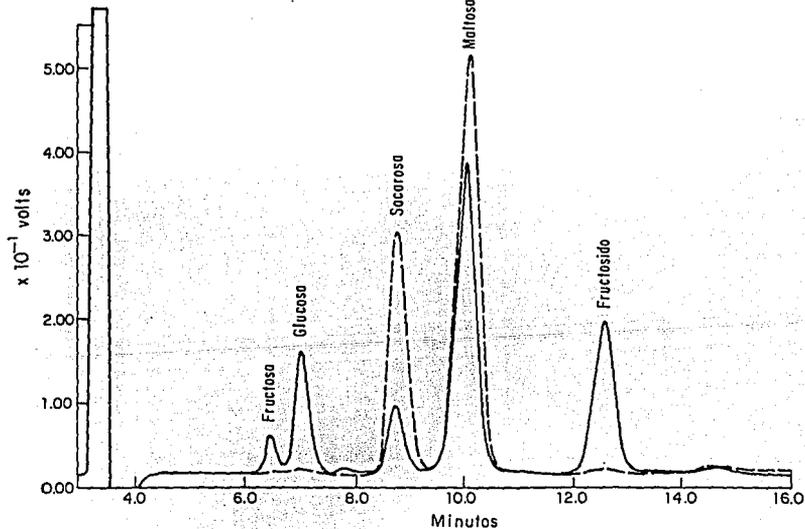


Fig. 16 Cromatograma de HPLC de los productos de reacción en presencia de **maltosa** utilizando una columna para análisis de carbohidratos. Fase móvil: acetonitrilo-agua 75:25. La reacción se llevó a cabo en presencia de 60 mg/ml de sacarosa y 120 mg/ml de maltosa. Se utilizaron 0.66 U/ml de medio de reacción. (---) tiempo cero, (—) 5 hrs. de reacción.

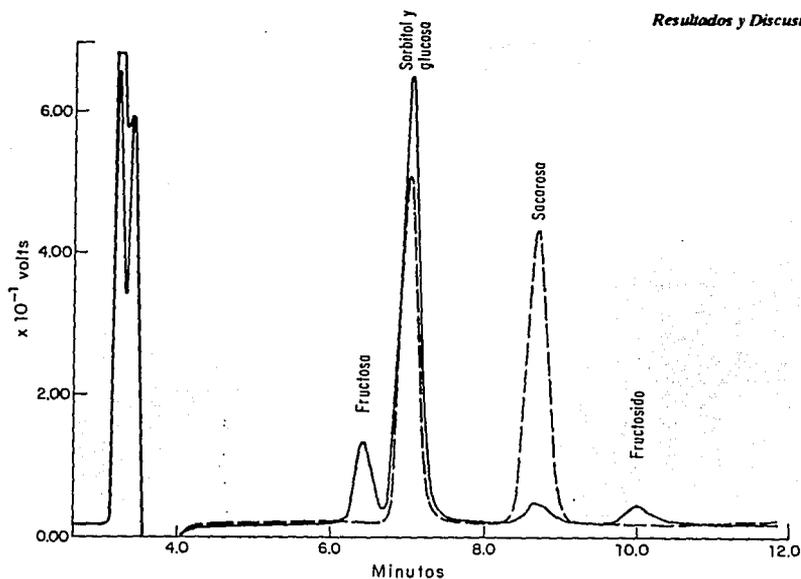


Fig. 17 Cromatograma de HPLC de los productos de reacción en presencia de **sorbitol** utilizando una columna para análisis de carbohidratos. Fase móvil: acetonitrilo-agua 75:25. La reacción se llevó a cabo en presencia de 60 mg/ml de sacarosa y 60 mg/ml de sorbitol. Se utilizaron 0.66 U/ml de medio de reacción. (---) tiempo cero, (—) 5 hrs. de reacción.

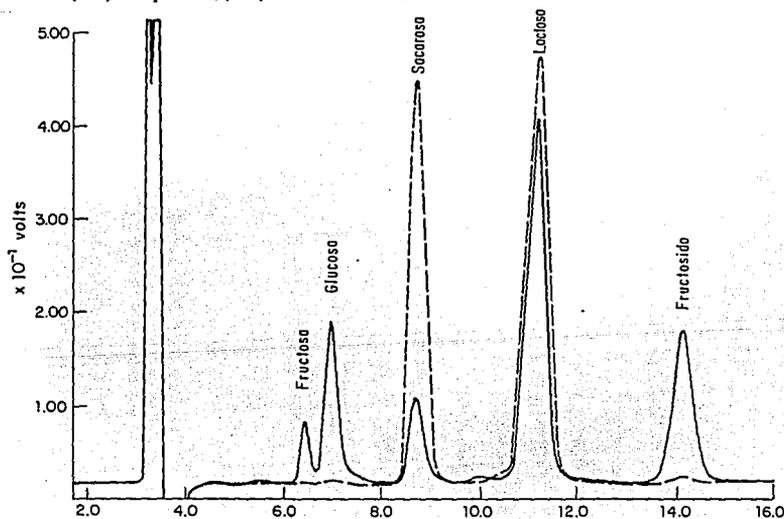


Fig. 18 Cromatograma de HPLC de los productos de reacción en presencia de **lactosa** utilizando una columna para análisis de carbohidratos. Fase móvil: acetonitrilo-agua 75:25. La reacción se llevó a cabo en presencia de 60 mg/ml de sacarosa y 120 mg/ml de lactosa. Se utilizaron 0.66 U/ml de medio de reacción. (---) tiempo cero, (—) 5 hrs. de reacción.

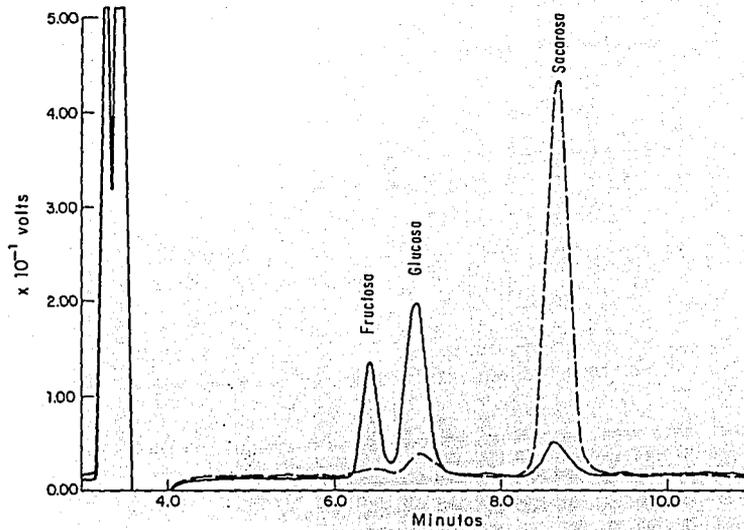


Fig. 19 Cromatograma de HPLC de los productos de la reacción **control** (sin aceptores) utilizando una columna para análisis de carbohidratos. Fase móvil: acetonitrilo-agua 75:25. La reacción se llevó a cabo en presencia de 60 mg/ml de sacarosa. Se utilizaron 0.66 U/ml de medio de reacción. (---) tiempo cero, (—) 5 hrs. de reacción.

4.5 Reacción en presencia de sorbitol y glicerol.

Del análisis de la literatura que se presenta en la tabla 10 se concluye que no existen reportes sobre actividades de transferasa al sorbitol y glicerol y aunque los resultados de la tabla 9 muestran que el glicerol y el sorbitol no resultan ser los aceptores más potentes, se decidió estudiarlos, optimizando las condiciones para dirigir la reacción hacia la transferencia. Es probable que buena parte de los resultados obtenidos de estos experimentos puedan extrapolarse a otros aceptores.

4.5.1 Reacción en presencia de glicerol.

Como primer paso se llevaron a cabo reacciones a diferentes concentraciones de glicerol para observar su efecto sobre las actividades de la levansacarasa. La figura 20 muestra los resultados de dicho estudio, donde puede observarse que a 25% de glicerol hay un incremento en la actividad transferasa y una disminución en la actividad hidrolasa en comparación con la reacción en ausencia de glicerol. Cuando la reacción se

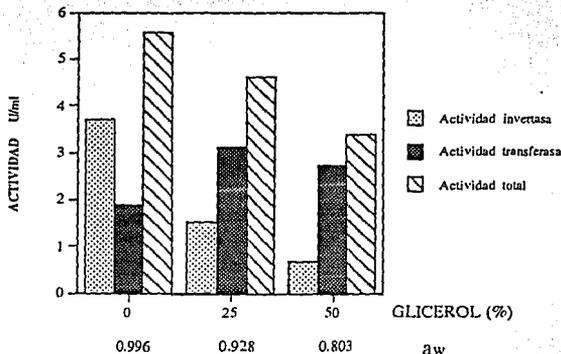


Fig.20 Efecto del glicerol en las actividades de la levansacarasa de *B. circulans*. Se utilizaron 0.57 U/ml de enzima por ensayo, con 6% de sacarosa a 30°C y pH 7. Las actividades de agua se calcularon basándose en los datos de (Chen 1987) y en la ecuación de Ross (Ferro y col. 1980).

llevó a cabo en presencia de 50% de glicerol, el efecto del glicerol sobre la actividad hidrolasa fué mas marcado, ya que hubo aún menos hidrólisis que en el caso anterior. Este efecto esta claramente correlacionado con una disminución en la actividad de agua (a_w) la cual disminuye hasta 0.803. Sin embargo la actividad transferasa no aumentó proporcionalmente, sino por el contrario, presentó una ligera disminución. Esto puede deberse a un aumento en la densidad del medio por el exceso de glicerol lo que pudo haber provocado problemas difusionales. Por otro lado, el glicerol actúa como sustrato aceptor durante la reacción por lo que puede tratarse también de una inhibición por exceso de sustrato.

Con el fin de optimizar la reacción para lograr el mayor porcentaje de transferencia, se midió el efecto que tiene la concentración de sacarosa sobre la misma reacción. Como puede observarse en la figura 21, un aumento en la concentración de sacarosa no tiene

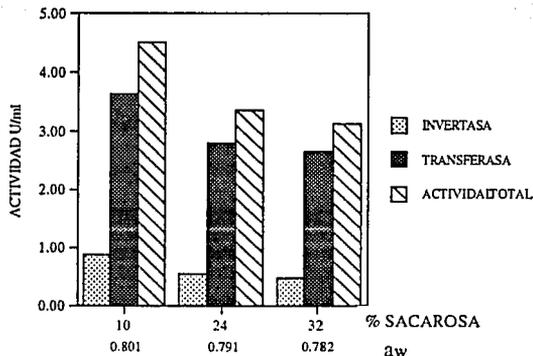


Fig. 21 Efecto de la concentración de sacarosa en la reacción en presencia de 50% de glicerol. Las condiciones de reacción son las mismas que las de la figura 20. Las actividades de agua fueron calculadas a partir de los datos de (Chen 1987 y Chirife y col. 1980) utilizando la ecuación de Ross (Ferro y col. 1980)

un efecto importante sobre la reacción de transferencia, observándose sin embargo, una disminución en las velocidades de reacción de transferencia e hidrólisis, como consecuencia de la disminución en la actividad de agua.

Por último se llevó a cabo una reacción en presencia de 50% de glicerol y 28% de sacarosa siguiendo su evolución durante 46 hrs. La figura 22 muestra el comportamiento de la reacción durante la cual se produjo una pequeña cantidad de fructosa, siendo la mayor parte de los productos resultado de la actividad de transferencia.

No se pudo determinar con precisión el porcentaje de la fructosa que fué transferida al glicerol y cuanta fué a formar polímero de fructosa, por la diferencia en las áreas correspondientes al glicerol en los cromatogramas, se puede observar que aproximadamente el diez por ciento del glicerol presente reaccionó, ya que el tamaño del pico de glicerol disminuyó en ese porcentaje. Este análisis es muy superficial y sería necesario realizar una separación de los productos de reacción de manera más rigurosa para poder obtener una conclusión más contundente a este respecto.

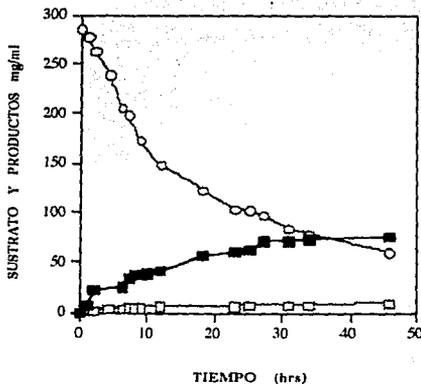


Fig. 22 Reacción de la levansacarasa en presencia de 50% de glicerol y 28% de sacarosa correspondiente a una a_w de 0.785. Se utilizaron 0.7 U/ml de enzima para la reacción y se siguió durante 46 hrs. (■) fructosa transferida, (□) fructosa libre y (○) sacarosa.

La levansacarasa de *B. circulans* transfiere fructosa al glicerol, aunque no es posible definir a que posición del glicerol ni el número de fructosas que puedan transferirse a una sola molécula de glicerol. En la figura 23 se muestra el cromatograma de la reacción en presencia de 50% de glicerol y 28% de sacarosa después de 46 hrs de reacción, donde puede observarse la aparición de al menos 3 picos, lo que sugiere la formación de tres productos de reacción, cuya estructura química no fué dilucidada en este trabajo.

De la literatura revisada, este es el único caso reportado de transferencia de fructosa al glicerol por una levansacarasa y aunque es necesario explorar otras condiciones (uso de cosolventes) bajo las que se alcancen mejores rendimientos de producción de fructooligosacaridos, esta reacción representa una alternativa de interés potencial.

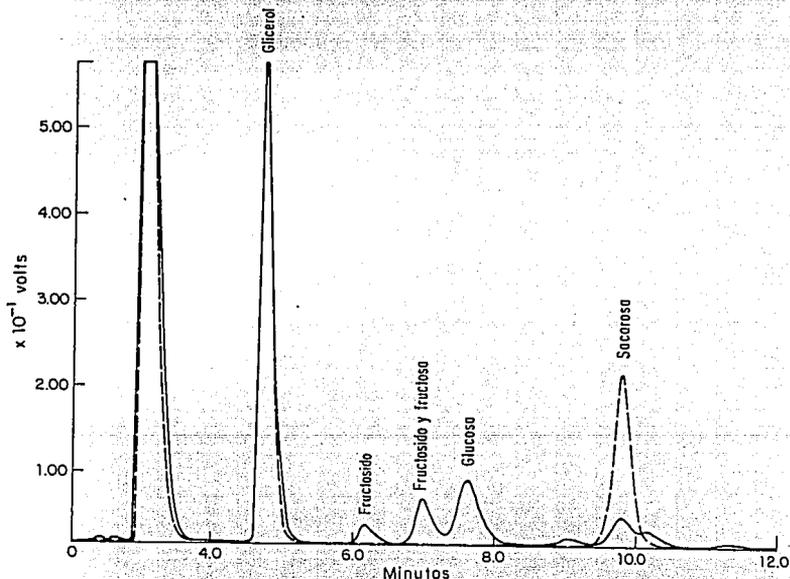


Fig.23 Cromatograma en HPLC de los productos de reacción de la levansacarasa de *B. circulans* en presencia de 50% de glicerol y 28% de sacarosa (ver figura 22), utilizando una columna para análisis de carbohidratos. Se empleó como fase móvil acetonitrilo:agua 75:25. (- - -) tiempo cero, (—) 46 hrs. de reacción.

4.5.2 Reacciones en presencia de sorbitol

Con el fin de estudiar el efecto de la concentración de sorbitol en las actividades de la levansacarasa se llevaron a cabo reacciones a diferentes concentraciones de sorbitol en presencia de 6% de sacarosa. La figura 24 muestra como se incrementa la velocidad de reacción de transferencia al aumentar la concentración de sorbitol, sin que exista un cambio importante en la velocidad de reacción de hidrólisis, lo que resulta extraño dada la disminución en la actividad de agua. En el análisis global se constata un aumento en la velocidad global de reacción.

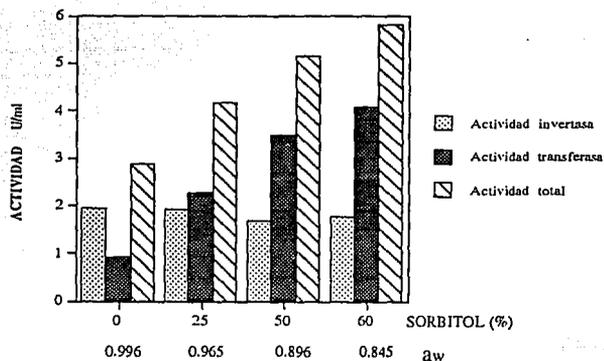


Fig. 24. Efecto de la concentración de sorbitol en las actividades de la levansacarasa de *B. circulans*. Se utilizaron 0.6 U/ml de enzima por ensayo y 6% de sacarosa. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y pH 7. Las actividades de agua fueron calculadas a partir de los datos de (Chen 1987 y Chirife y col. 1980) utilizando la ecuación de Ross (Ferro y col. 1980).

Posteriormente se llevó a cabo un análisis del efecto de aumentar la concentración de sacarosa a diferentes concentraciones de sorbitol. Sin embargo, tanto la sacarosa como el sorbitol tienen un efecto importante en las características de viscosidad y densidad del medio. Se encontró que una solución con 60% de sorbitol, no puede disolver más de 10% de sacarosa por lo que en el estudio realizado, a medida que se aumenta esta última, se disminuye la primera. La figura 25 muestra el resultado de dichos experimentos. Como puede observarse, cuando se emplea una solución con 50% de sorbitol y 20% de sacarosa se tiene la mejor proporción de transferencia, aunque las diferencias son poco significativas, pareciendo indicar que en los rangos estudiados, al mantener la concentración de sólidos totales constante, la proporción relativa de actividades no varía. En este caso, la correlación con la actividad de agua no es evidente,

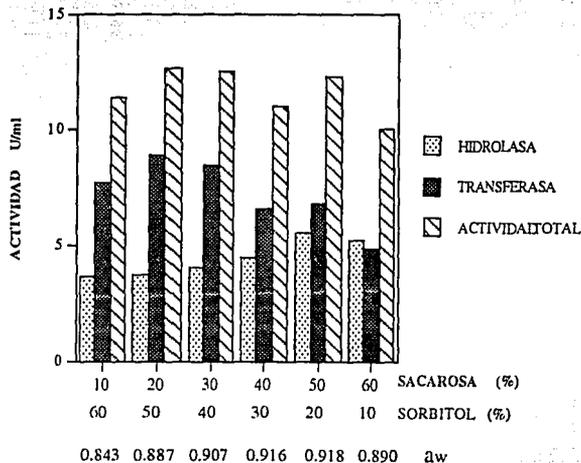


Fig 25. Efecto de la concentración de sacarosa y de sorbitol en las actividades de la levansacarasa de *B. circulans*. Las actividades de agua fueron calculadas a partir de los datos de (Chen 1987 y Chirife y col. 1980) utilizando la ecuación de Ross (Ferro y col. 1980).

por tratarse de una mezcla de sustratos. Dado que se trata de un producto no reportado, o al menos cuya síntesis no se había planteado por esta vía, se estudia todavía con mayor detalle el efecto de la concentración de sacarosa.

A partir de los resultados de la figura 25, se hizo evidente el efecto de llevar a cabo la síntesis a concentraciones de sorbitol por abajo de 50%, aunque era importante determinar el efecto de la concentración de sacarosa para esa concentración de sorbitol.

Por lo antes expuesto, la figura 26 muestra el efecto de un aumento en la concentración de sacarosa en una reacción en presencia de 50% de sorbitol. Los resultados permiten apreciar una disminución en la velocidad de hidrólisis conforme se aumenta la concentración de sacarosa, por lo que en el análisis global es posible reducir los productos de hidrólisis de un 50% en la reacción inicial, con sacarosa y sorbitol al 6%, a un 10% de hidrólisis en las condiciones optimizadas, sorbitol 50% y sacarosa 40%. En este caso es claro que una menor actividad de agua trae como consecuencia una menor

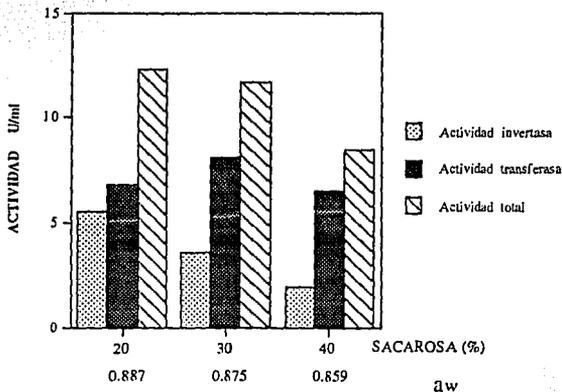


Fig. 26 Efecto de la concentración de sacarosa en la reacción de la levansacarasa en presencia de 50% de sorbitol. Las actividades de agua fueron calculadas a partir de los datos de (Chen 1987 y Chirife y col. 1980) utilizando la ecuación de Ross (Ferro y col. 1980).

velocidad de hidrólisis.

De los resultados anteriores puede observarse el efecto que tiene un aumento en la concentración de sorbitol y sacarosa y la consecuente disminución de la actividad de agua en el medio de reacción, sobre el aumento en la transferencia a sorbitol, es decir, conforme se disminuye la actividad de agua se tiene menor porcentaje de hidrólisis.

Por último se llevó a cabo una reacción durante casi 100 horas en 50% de sorbitol y 40% de sacarosa en un reactor de 100 ml con agitación a 225 rpm y a 30°C. La figura 27 muestra los resultados de dicha reacción donde se observa la desaparición de sacarosa en el tiempo y la aparición de glucosa, fructosa y los productos de reacción denominados fructósidos 1, 2 y 3 por el orden de aparición al ser separados en una columna para análisis de carbohidratos en HPLC (ver figura 31). Las concentraciones de dichos productos se calcularon utilizando una curva estándar de sacarosa ya que no se contaba con estándares de esos compuestos. Por lo anterior dichos resultados son aproximados.

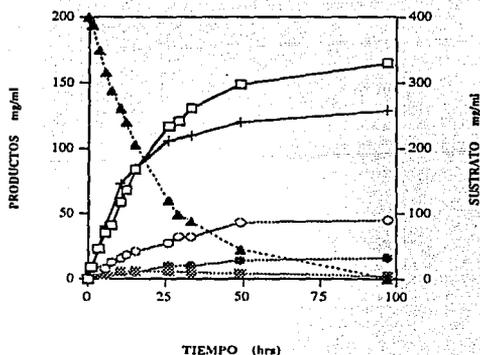


Fig. 27. Seguimiento de la reacción en presencia de 50% de sorbitol y 40% de sacarosa, correspondiente a una a_w de 0.8594. La reacción se llevó a cabo en un reactor de 100 ml con agitación a 225 rpm con 0.7 U/ml de enzima a 30°C y pH 7. (□) Fructosa total transferida, (○) fructosa hidrolizada, (▲) sacarosa, (+) fructósido 1, (■) fructósido 2, (●) fructósido 3.

Nota: Las concentraciones de los fructósidos se calcularon por medio de HPLC utilizando una curva estándar de sacarosa.

La reacción termina con el agotamiento casi total de la sacarosa. Durante la reacción se producen 3 fructósidos de los cuales el fructósido 1 se sintetiza en mayor proporción. Curiosamente el fructósido 3 muestra una respuesta mayor que el fructósido 2, lo que parece indicar que este último se produce en menor cantidad que el fructósido 3; si así fuera y suponiendo que tuvieran un índice de refracción similar, significaría que el fructósido 2 es mejor aceptor que el fructósido 1 ya que en cuanto se forma el fructósido 2 la enzima le transfiere fructosa y sintetiza el fructósido 3, lo que no permite que se acumulen grandes cantidades de este compuesto, a diferencia de los fructósidos 1 y 3. La aparición de los fructósidos 2 y 3 ocurre cerca de las primeras diez horas de reacción.

4.5.2.1 Caracterización reológica de la mezcla de reacción con sorbitol.

Durante el transcurso de la reacción en 50% de sorbitol y 40% de sacarosa, pudo observarse el comportamiento característico de un fluido no newtoniano con efecto Weissenberg (fig. 28), debido a lo cual se tomaron muestras del fluido de reacción y se determinaron sus constantes reológicas. La figura 29 muestra los resultados de dicho estudio donde se muestra el comportamiento reológico de las muestras tomadas a distintos tiempos durante el transcurso de la reacción, así se tienen valores para el tiempo cero y las horas 5, 10 y 16.

El análisis reológico del medio de reacción (sorbitol 50%-sacarosa 40%) presenta un comportamiento newtoniano, mientras que el análisis de distintas concentraciones de levana en agua le confieren un carácter no newtoniano (figura 30) de lo que se concluye que el comportamiento no newtoniano de la reacción de la s en 50% de sorbitol y 40% de sacarosa se debe a la presencia de levana en el medio de reacción. La

disminución en la viscosidad aparente que se observa conforme transcurre la reacción puede deberse a una hidrólisis del polímero presente para dar origen a la síntesis de oligosacáridos.



Fig.28.Reacción de la levansacarasa en 50% de sorbitol y 40% de sacarosa, a 30°C y pH7, agitación 225 rpm. Puede apreciarse el efecto Weissenberg.

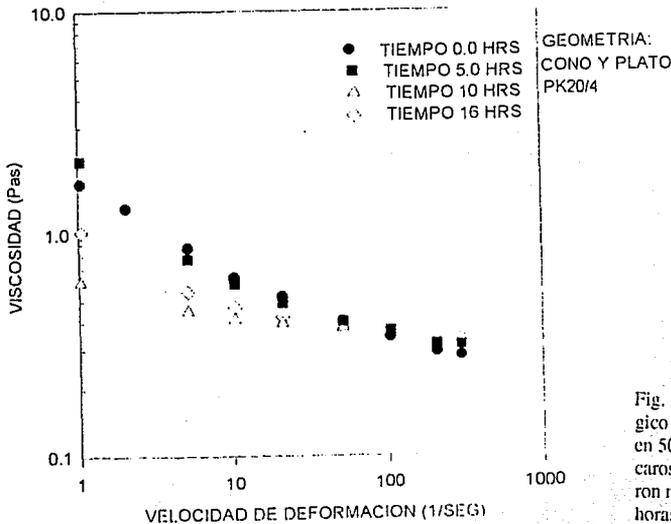


Fig. 29. Comportamiento reológico de las muestras de reacción en 50% de sorbitol y 40% de sacarosa (ver figura 27). Se tomaron muestras de las primeras 16 horas de reacción.

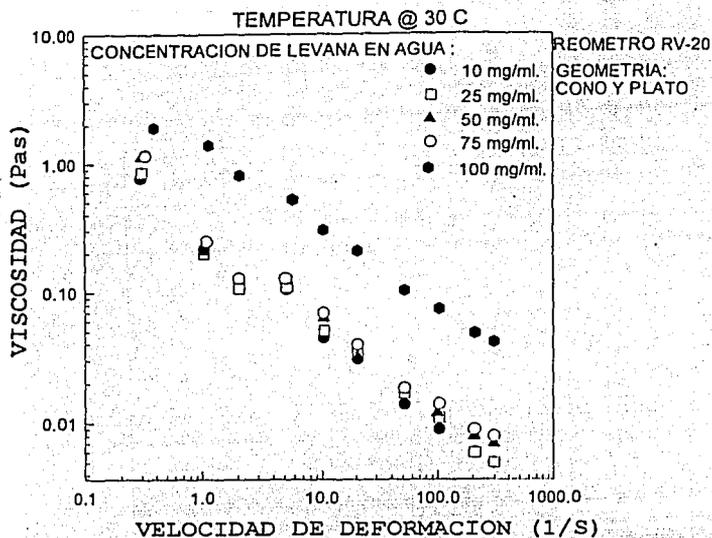


Fig. 30 Comportamiento reológico de soluciones de levana a diferentes concentraciones (10 a 100 mg/ml).

4.5.2.2 Separación de los productos de reacción con sorbitol

La síntesis y aislamiento de nuevos fructooligosacáridos tiene gran importancia debido al gran potencial de aplicación que presentan estos productos en el sector alimenticio y de salud, es por eso que resulta interesante aislarlos y caracterizarlos. Los productos que se obtuvieron en la reacción en presencia de sorbitol fueron separados utilizando una columna preparativa μ Bondapak-NH₂ (ver figura 31). Las muestras obtenidas fueron enviadas para análisis de RMN y espectrofotometría de masas con el fin determinar su estructura y tipo de enlace.

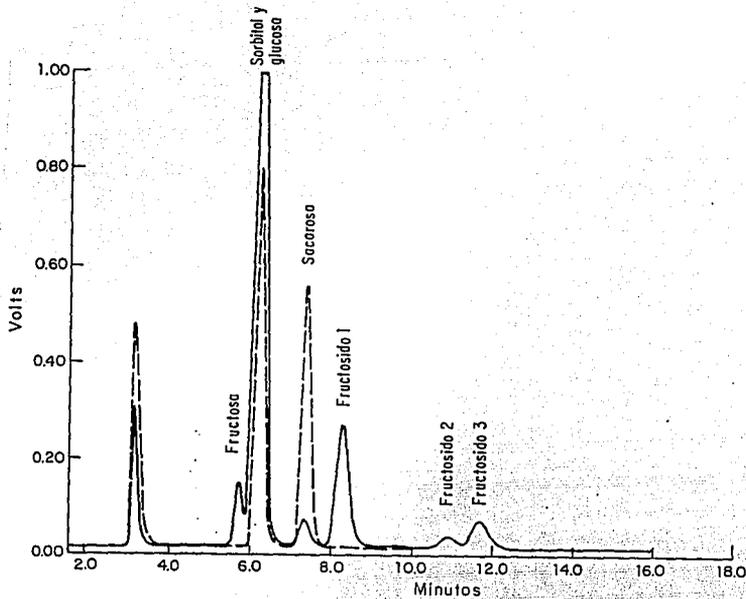


Fig. 31 Cromatografía preparativa por HPLC de los productos de reacción en presencia de sorbitol 50% y sacarosa 40% de la levansacarasa de *B. circulans*. La reacción se llevó a cabo en un reactor de 100 ml con agitación a 225 rpm y 30° C. Se utilizó una columna preparativa μ Bondapack-NH₂. Las condiciones de separación se indican en materiales y métodos. Los productos de reacción fueron colectados y enviados para su análisis por RMN y espectrofotometría de masas. (- -) tiempo cero, (—) 96 hrs. de reacción.

5. CONCLUSIONES

La levansacarasa de *Bacillus circulans* se produce mediante fermentación intermitente en un proceso que dura doce horas, obteniéndose un sobrenadante con 2 U/ml de actividad total (μ moles de glucosa liberada durante la reacción /min).

La precipitación de la levansacarasa con PEG permite obtener 8 veces de purificación en un solo paso.

Se obtiene una solución enzimática que presenta dos actividades: Actividad transferasa responsable de la síntesis de levana y actividad hidrolasa, que desdobra la sacarosa en glucosa y fructosa.

Por medio de la purificación de la levansacarasa por varios métodos, a partir de la solución enzimática obtenida mediante PEG, se comprobó que la cepa de *B. circulans* produce una sola enzima que presenta las actividades antes mencionadas.

La comparación del peso molecular de la levansacarasa de *B. circulans* con el de la levansacarasa de *B. subtilis* reportada por numerosos autores (Le Brune 1988, G.-Treboul 1975, Chambert 1992 entre otros), parece indicar que se trata de la misma enzima.

El predominio de alguna de las dos actividades (transferasa o hidrolasa) depende de las condiciones de reacción:

Las temperaturas bajas favorecen la síntesis de la levana, mientras que temperaturas altas favorecen la hidrólisis.

En condiciones ácidas de reacción se favorece la reacción de hidrólisis y en condi-

ciones de neutralidad se favorece la síntesis de levana.

A concentraciones de sacarosa por encima de 300 mM se observa inhibición por sustrato de la actividad transferasa sin ser afectada la actividad hidrolasa.

La presencia de levana en el medio de reacción tiene un efecto activador muy importante sobre la actividad transferasa y ninguno sobre la actividad hidrolítica, por lo que bajo ninguna de las condiciones de reacción estudiadas se logra que toda la actividad presente sea transferasa.

La actividad de agua tiene un efecto notable sobre la prevalencia de alguna de las dos actividades, ya que en reacciones con bajo contenido de agua (sorbitol 50% - sacarosa 40%, glicerol 50% - sacarosa 30%), la actividad transferasa se ve marcadamente favorecida.

La levansacarasa de *B. circulans* transfiere fructosa con distintas afinidades a una variedad de moléculas (galactosa, lactosa, maltosa, sorbitol, glicerol y metanol) y forma con todas ellas fructósidos.

Las reacciones en presencia de sorbitol y glicerol resultan de gran interés ya que no se tiene reportes de estas reacciones y sus productos. La síntesis de nuevos oligosacáridos presenta un gran potencial en el sector alimentario y en el sector salud debido a las múltiples aplicaciones que tienen y a sus propiedades que los hacen únicos.

5.1 Perspectivas

La producción de nuevos fructooligosacáridos por métodos enzimáticos, plantea toda una gama de nuevas aplicaciones en las áreas de alimentos y farmacia continuando así con la provisión de productos de nuevas tecnologías que vienen a revolucionar la industria de alimentos, con nuevos tipos de edulcorantes, texturizantes, fuentes de fibra y probióticos de consumo humano y animal entre otras posibles aplicaciones. En la industria farmacéutica la aparición de estos nuevos oligosacáridos representa la existencia de nuevos agentes trombolíticos, inmunogénicos y antitumorales entre otros.

El estudio de reacciones de aceptor con la levansacarasa en presencia de solventes orgánicos representa un campo sin explorar y puede presentar múltiples ventajas sobre las reacciones que se llevan a cabo hoy en día en solución acuosa.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Asahi-Chem. (1994) Producing the androse with high purity on an industrial scale. Patente japonesa. JP05339282; 21.12.93
- 2.-Aspinall G.O. (1983) The Polysaccharides Vol 2. Academic Press. 2-3.
- 3.- Barroso R. O. (1995) Optimización de un medio de cultivo para la producción de una fructosiltransferasas de *Bacillus circulans*. Tesis de licenciatura en revisión. Facultad de Química UNAM.
- 4.-Bibbins M. D. (1990) Caracterización de Enzimas Extracelulares de Microorganismos Aislados de la Caña de Azúcar. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- 5.-Bradford M.M., *Analyst Biochem* (1976)72: 248.
- 6.-Bahary W. S. Stivala S. , Newbrun E., Ehrlich J. (1975) Levans.III. A light-Scattering Study of *Streptococcus salivarius* Levan in Dimethyl Sulfoxide. *Biopolymers*. 14. 2467-2478.
- 7.-Chambert R., G.-Tréboul. & Dedonder. R. (1974) Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem*. 41, 285-300.
- 8.-Chambert R., Gonzy-Tréboul. (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and Thermodynamic Aspects of Transfructosylation Processes. *Eur. J. Biochem*. 62, 55-64.
- 9.-Chambert R., Gonzy-Treboul. (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characteri-

zation of a Stabilized Fructosyl-Enzyme Complex and identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the Fructosyl Group. Eur. J. Biochem. 71, 493-508.

10.- Chambert R. & Marie-Francoise Petit-Glatron. (1989) Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. Carbohydrate Research, 191, 117-123. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

11.-Chambert Régis, Petit-Glatron Marie-Françoise. (1991) Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. Biochem. J., 279. 35-41.

12.-Chambert R., Rain-guion M., Petit-Glatron M. (1992) Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. Biochimica et Biophysica Acta. 1132, 145-153.

13.-Chen C.S. (1987) Relationship between water activity and freezing point depression of food systems. Journal of food Science, 52, No.2, 433-435.

14.-Cheetham P.S.J., Hacking A.J., Vlitos M. (1988). Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. Enzyme Microb. Technol., 11, 212-219.

15.-Cirife J., Ferro Fontan C., Benmergui E.A. (1980). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods IV. a_w prediction in aqueous non electrolyte solutions. Journal of Food Technol., 15, 59-70.

- 16.-Crittenden R.G.,Doelle H.W. (1994). Identification y caracterization of the extra-cellular sucres of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC39676).Appl Microbiol Biotechnol 41: 302-308.
- 17.-Dedonder R., (1972) Role and Mechanism of Transglycosylation Reactions in Biochemistry of Glycosidic Linkage. Piras & Pontis, H.G. New York. 21-78.
- 18.-Ferro Fontan C., Benmergui E.A., Chirife J. (1980) The prediction of water activity of aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods III. a) Prediction in multicomponent strong electrolyte aqueous solutions. Journal of food Technol. 15, 47-58.
- 19.-Franz G., Hensel A., Kraus J., (1988) Structure-Activity Relationship of Immune Modulating Polysaccharides with an Antitumor Effect. In Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides. Gordon and Breach Science Publishers. 241-249.
- 20.-French A.D. (1989) Chemical and Physical Properties of Fructans.J. Plant Physiol. 134. 125-136.
- 21.-Fujita Y., Tsubouchi H., Inagi Y., Tomita K., Ozaki A., Nakanishi K. (1990) Purification and Properties of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus sp.* AL-6. Journal of Fermentation and Bioengineering, 70. No. 3, 150-154.
- 22.-Gay P., Le Coq D., Steinmetz M., Ferrari E., Hoch J. (1983). Cloning Structural Gene sacB, Which Codes for Exoenzyme Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Expression of the Gene in Escherichia coli. J. of Bacteriology. 3, 1424-1431.

- 23.-Gonzy-Treboul G., Chambert R. and Dedonder R. (1975). Levansucrase of *Bacillus subtilis* : Reexamination of Some Physical and chemical properties. *Biochimie*, 57. 17-28.
- 24.-Gross M., Geier G., Rudolph K., Geider K., (1992) Levan and Levansucrose Synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 40, 371-381.
- 25.-Han Y.W. (1989) Levan Production by *Bacillus polymyxa*. *J. of Industrial Microbiology*. 4 447-452.
- 26.-Han Y. W., Clarke M. (1990) Production and Characterization of Microbial Levan. *J. Agric. Food Chem.* 38, 393-396.
- 27.-Han Y.W., Watson M.A., (1992) Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, 9 . 257-260.
- 28.-Hayashi S., Kinoshita J., Nonoguchi M., Takasaki Y., Imada K. (1991) .Continuous Production of 1-Kestose by β -Fructofuranosidase Immobilized on Shirasu Porous Glass. *Biotechnology Letters* 13 No. 6, 395-398.
- 29.-Hayashi s., Nonoguchi T., Takasaki Y., Ueno H., and Imada K., (1991) Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. *Journal of Industrial Microbiology*, 7, 251-256.
- 30.-Hayashi s., Ito K., Nonoguchi M., Takasaki Y., Imada K., (1991) Immobilization of a fructosyl-Transferring Enzyme from *Aureobasidium sp.* on Shirasu Porous Glass. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72, No. 1, 68-70.

- 31.-Hayashi S., Nonoguchi M., Shimokawa Y., Tubouchi M., Takasaki Y., Imada K. (1992). Purification and properties of extracellular B-fructofuranosidases from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 145-147.
- 32.-Hayashi s., Hayashi T., Kinoshita J., Takasaki Y., Imada K. (1992) Immobilization of B-fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524 on Porous Silica. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 247-250.
- 33.-Hayashibara-Biochem.; Biofermin-pharm. Production of lactosucrose containing powder. Patente japonesa. J03290197; 19:12.91.
- 34.-Hidaka H., Hirayama M., Yamada K. (1991) Fructooligosaccharides, Enzymatic Preparation and Biofunctions. *J. Carbohydrate Chemistry* 10 (4), 509-522.
- 35.-Hendry G. (1987). The Ecological Significance of Fructan in a contemporary flora. *New Phytol.*, 106, 201-216.
- 36.-Jung K.H., Kim J.H., Jeon Y.J., Lee J.H. (1993). Production of high fructooligosaccharide Syrup with Two Enzyme System of Fructosyltransferase and Glucose Oxidase. *Biotechnology Letters* 15, No.1, 65-70.
- 37.-Kawai, H., Isobe Y., Horibe M., Tokuda J., Tokuno I., Endo K., Kawai F., (1992) Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by a *Bacillus* Strain Isolated from Soil. *Biosci., Biotech, Biochem.* 56 (6) 853-857.
- 38.-Keith j.,Wiley B., Ball D., Arcidiacono S., Zorfass D., Mayer J., and Kaplan D. (1991) Continuous Culture Sistem for Production of Biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 557-560.

- 39.-Laemli U.K. (1970) Nature 227-680.
- 40.-LeBrun E., van Rapenbusch R. (1980) The Structure of *Bacillus subtilis* at 3.8 Å Resolution. The Journal of Biological Chemistry. 255, No. 24, 12034-12036.
- 41.-Lee K.J., Choi J.D., Lim J.Y., (1992) Purification and Properties of Intracellular Fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 411-415
- 42.-Lifely R.M.(1988) Polysaccharide antigens as vaccines against bacterial pathogens. In Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides. Gordon and Breach Science Publishers. 133-143
- 43.-Lyness E.W., Doelle H.W. (1983) Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters. 5, No. 5 345-350.
- 44.-Marshall Keith and Weigel H. (1980) Relative molecular masses and structures of some levans elaborated by strains of *Streptococcus salivarius*. Carbohydrate Research, 80. 375-377.
- 45.-Murakami H., Muroi H., Kuramoto T., Tamura Y., Mizutani K., Nakano H., Kitahata S. (1990) Purification and Some Properties of a Levansucrase from *Streptomyces sp* No. 7-3. Agric. Biochem Chem., (9) 2247-2255.
- 46.-Murakami H., Kuramoto T., Mizutani K., Nakano H., Kitahata S. (1992) Purification and Some Properties of a New Levansucrase from *Bacillus sp*. No. 71. Biosci. Biotech. biochem., 56 (4), 608-613.
- 47.-Nisshin-Sugar-Mfg. (1994) Sugar solution preparation with high xylosylfructoside

content. Patente japonesa. JP05276970; 26.10.93.

48.-Nisshin-Sugar-Mfg. (1993) Lactosylfructoside production using β -D-fructofuranosidase or levansucrase from *Bacillus megaterium*. Patente japonesa. JP5130885; 28.05.93.

49.-Nisshin-Sugar-Mfg. (1992) New oligosaccharide sweetener and its production. Patente japonesa. J04103593; 06.04.92.

50.-Ohtsuka K., Hino S., Fukushima T., Ozawa O., Kanematsu T., Uchida T. (1992) Characterization of Levansucrase from *Rhanelia aquatilis* JCM-1683. Biosci Biotech. Biochem. 56 (9), 1373-1377.

51.-Park Y.K. Almeida M.M. (1991) Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 7. 331-334.

52.-Paul F., Oriol E., Auriol D., Willemot R.M. & Monsan P. (1984). Effect of maltose in the reaction of highly purified *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase: Kinetic study and product characterization. En Third European congress on biotech. Vol. 1. 383-388.

53.-Perlot P., Monsan P. (1980). Production, Purification, and Immobilization of *Bacillus subtilis* Levansucrase. Annals New York Academy of Science. 468-471.

54.-Petit-Glatron M., Chambert R., and Stenmetz M., (1980) Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 103, 189-195.

55.-Pollock C.J. (1986) Fructans and the Metabolism of Sucrose in Vascular Plants.

New Phytol. ,104 , No. 1 1-24.

56.-Robyt J.F., Kimble B.K. & Walseth T.F. (1974). The mechanism of dextransucrase action direction of dextran biosynthesis. Archives of biochemistry and biophysics. 165, 634-640.

57.-Robyt J.F. & Corrigan A.J. (1977). Arch Biochem. Biophys. 183, 726-731.

58.-Sato M., Matsuo T., Orbita N., Yagi Y. (1991) Synthesis of Novel Sugars, Oligoglucosyl-Inositols, and their Growth Stimulating Effect for Bifidobacterium. Biotechnology Letters, 13, No. 2 , 69-74.

59.- Sharon N. (1981). Carbohidratos. Investigación y ciencia , edición en español del Scientific American. 52, 48-59.

60.-Spiegel J.E., Rose R., Karabell P., Frankos V.H., Schmitt D.F. (1994). Fructooligosaccharides as Food Ingredients. Food Technology . Jan., 85-89.

61.-Solvay-Enzymes. (1994) New thermostable acid levansucrase. Patente francesa. FR 2691161; 19.11.93.

62.-Steinmetz M., Le Coq D., Aymerich S., Gonzy-Tréboul G., Gay P. (1985) The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. Mol.Gen Genet .200 220-228.

63.-Summer J.B. ,Howell S.F., (1934) A method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem., 108, 51-54.

64.-Sutherland I.W. (1990) Medical applications of exopolysaccharides. In Biotechno-

logy of Microbial Exopolysaccharides. Cambridge University Press. 141-148.

65.-Tanaka T., Oi S., Yamamoto T. (1979) Synthesis of Levan by Lavansucrase. J.Biochem. 85, No. 1, 287-293.

66.-Tanaka K., Akai T. (1992) Action of Levan Fructotransferase of *Arthrobacter urefaciens* on a Mixture of Branched Levanpentasaccharides. Biosci., Biotech., Biochem. 56 (5) 814-815.

67.-Tsuchiya, H.M., Koepsell H.J., Corman J., Bryant G., Bogard M.O., Feger V.H. & Jackson R.W. (1952) The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 64. 521-527.

68.-Usami Shoji., Ishii T., Kirimura K., Uehara K., Chen J., (1991). Production of β -Fructofuranosidase Showing Fructose-Transferring Activity by *Penicillium frequentans*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 72, No. 4 , 303-305.

69.-Van Balken J.A.M., van Dooren J.G.M., van den Tweel W.J.J., Kamphuis J., Meijer E.M. (1991). Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1-fructosyltransferase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 ; 216-221.

70.-Whitfield C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. Can.J. Microbiol. 34, 415-420.

71.-Yanase H., Iwata M., Nakahigashi R., Kita K., Kato N., Tonomura K. (1992) Purification, Crystallization, and Properties of the Extracellular Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biosci. Biotech. Biochem., 56 (8), 1335-1337.

- 72.-Yoshida Y., Suzuky R., Yagi Y. (1990) Production of Levan by a *Zymomonas sp.* Journal of Fermentation and Bioengineering. 70, No. 4, 269-271.
- 73.-Yun J.W., Song S.K. (1993) The Production of High-content Fructo-oligosaccharides from Sucrose by the Mixed-Enzyme System of Fructosyltransferase and Glucose Oxidase. Biotechnology Letters. 15, 573-576.