

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Estabilización de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F mediante modificación química”.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
Q. A. Gustavo Adolfo Arroyo Torres**



CUERNAVACA MORELOS

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"La Crítica de la Razón conduce, al fin, necesariamente a la Ciencia; el uso dogmático de la Razón sin Crítica conduce, al contrario, a afirmaciones infundadas, que siempre pueden ser contradichas por otras no menos verosímiles, por donde se va al escepticismo."

Immanuel Kant.

"Se puede ciertamente preguntar si todas las invariancias, conservaciones y simetrías que constituyen la trama del discurso científico no son ficciones que substituyen a la realidad para dar una imagen operacional, vacía por una parte de substancia, pero que se vuelve accesible a la lógica fundada sobre un principio de identidad puramente abstracto, quizá "convencional". Convención de la que, sin embargo, la razón humana parece incapaz de abstenerse....."

.....En la diversidad infinita de los fenómenos singulares, la ciencia no puede buscar más que invariantes."

Jacques Monod.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales, por su incondicional apoyo y entusiasmo en la dirección y realización de este trabajo. Gracias por tu tiempo y tus consejos, por tener siempre la puerta abierta y por compartir conmigo más que una simple relación académica.

A los miembros del Comité Tutorial por sus valiosas aportaciones que en gran medida ayudaron este proyecto al cumplimiento de los objetivos.

A los miembros del Jurado:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt.
Dr. Agustín López-Munguía Canales.
Dra. Amelia Farrés González Sarabia.
Dra. Gloria Soberón Chávez.
Dra. Carmen Beltrán Nuñez.

por sus atinadas observaciones que en mucho ayudaron para mejorar la calidad de este trabajo.

En especial al Dr. Rafael Vázquez por sus constantes y valiosas contribuciones, que a lo largo del proyecto orientaron y ayudaron al buen término de este trabajo.

A Lariza, gracias por todo tu cariño y apoyo incondicionales, tu alegría y entusiasmo, los mejores momentos, gracias por la minuciosa revisión ortográfica y de estilo, gracias por compartir conmigo los tiempos difíciles y hacerlos sentir nada, gracias por estar conmigo siempre.

A Mariana, por saber ser tan buena compañera y amiga durante "toda" la maestría, gracias por la paciencia durante las sesiones de estudio (de no ser por tí.....), cursos, tópicos, seminarios, etc....

A todas las personas a las que puedo llamar amigos y que hacen que el tiempo en el IBT sea inolvidable: Nayeli, Bárbara, Daniel, Laura, Vanesa.

LOS ESTUDIOS DE MAESTRÍA FUERON REALIZADOS GRACIAS A LA
BECA-CREDITO 90283, OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL
DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT).

INDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCION.....	12
OBJETIVOS.....	14
II. GENERALIDADES.....	15
2.1 ESTABILIZACION DE ENZIMAS.....	15
2.1.1 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS.....	15
2.1.2 DESNATURALIZACION.....	16
2.2 GENERALIDADES DE LAS DEXTRANSACARASAS.....	17
2.3 PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA DE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES NRRL B-512F.....	20
2.3.1 FERMENTACION.....	20
2.3.2 PURIFICACION.....	20
2.4 ESTRATEGIAS DE ESTABILIZACION.....	21
2.4.1 GENETICAS.....	22
2.4.2 MODIFICACIONES QUIMICAS.....	23
III. MATERIALES Y METODOS.....	27
3.1 PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA DE Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F.....	27
3.1.1 CONDICIONES DE LA FERMENTACION.....	27
3.1.2 PURIFICACION.....	28
3.2 TECNICAS ANALITICAS.....	29
3.2.1 DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	29
3.2.2 DETERMINACION DE PROTEÍNA.....	30
3.2.3 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	31
3.2.4 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA A DIVERSOS COMPUESTOS QUIMICOS.....	32
3.2.4.1 A LA ACCION DE LA CARBODIIMIDA.....	32
3.2.4.2 A LA OXIDACION CON PERIODATO DE SODIO.....	34
3.3 DETERMINACION DE ESTABILIDAD TERMICA DE LA ENZIMA.....	35
3.3.1 PRUEBA DE ACTIVIDAD RESIDUAL.....	36
3.3.2 CURVA DE DESACTIVACION A 40 °C.....	36
3.4 MODIFICACIONES QUIMICAS.....	37
3.4.1 ENTRECruzAMIENTO CON CARBODIIMIDAS.....	37

3.4.1.1 FUNDAMENTO.....	37
3.4.1.2 PROTOCOLO.....	38
3.4.2 ENTRECRUZAMIENTO CON ACIDO ADIPICO DIHIDRAZIDA.....	39
3.4.2.1 FUNDAMENTO.....	39
3.4.2.2 PROTOCOLO.....	40
3.4.3 ACOPLAMIENTO CON DEXTRANA.....	42
3.4.3.1 FUNDAMENTO.....	42
3.4.3.2 PROTOCOLO.....	44
3.5 TECNICAS DE ANALISIS DE AZUCARES Y OLIGOSACARIDOS.....	45
3.5.1 PERFIL DE OLIGOSACARIDOS.....	46
3.5.2 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS.....	47
3.5.3 PESO MOLECULAR DE LAS DEXTRANAS PRODUCIDAS.....	48
3.5.4 PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS.....	49
3.5.5 CONFIRMACION DE LA FORMACION DE DEXTRANA.....	50
3.5.6 EFECTO DE LA DEXTRANA EXOGENA EN LA ESPECIFICIDAD.....	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	52
4.1 PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F.....	52
4.2 CARACTERIZACION DE LA DEXTRANSACARASA EN TERMINOS DE SENSIBILIDAD A LOS REACTIVOS DE ACTIVACION.....	54
4.2.1 CARBODIIMIDA.....	54
4.2.2 PERIODATO DE SODIO.....	56
4.3 ESTABILIDAD TERMICA DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F.....	58
4.4 MODIFICACIONES QUIMICAS.....	59
4.4.1 ENTRECRUZAMIENTO CON CARBODIIMIDAS.....	59
4.4.2 ENTRECRUZAMIENTO CON ACIDO ADIPICO DIHIDRAZIDA.....	59
4.4.2.3 PERFIL DE OLIGOSACARIDOS.....	63
4.4.2.3 PERFIL DE LAS DEXTRANAS PRODUCIDAS.....	65
4.4.2.4 PERFIL DE PROTEÍNAS.....	66
4.4.2.4.1 CONDICIONES DESNATURALIZANTES.....	66
4.4.3 ACOPLAMIENTO CON DEXTRANA DE ALTO PESO MOLECULAR.....	68
4.4.3.1 CURVA DE DESACTIVACION.....	69
4.4.3.2 PERFIL DE OLIGOSACARIDOS.....	71

INDICES

6

4.4.3.3 PRODUCCION DE DEXTRANA.....	72
4.4.3.4 EFECTO DE LA DEXTRANA EXOGENA.....	73
4.4.3.5 ESTABILIDAD A LARGO PLAZO.....	74
V. CONCLUSIONES.....	76
VI. BIBLIOGRAFIA.....	78

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- ESQUEMA DE LAS INTERACCIONES RESPONSABLES DE MANTENER LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS.	16
FIGURA 2.-ESQUEMA DEL PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LAS PROTEÍNAS.	17
FIGURA 3.- ESQUEMA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS PRODUCIDOS CON MALTOSA COMO ACEPTOR UTILIZANDO DEXTRANSACARASAS PROVENIENTES DE DIFERENTES CEPAS DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> .	19
FIGURA 4.- ESQUEMA DE LA REACCIÓN ENTRE LA DEXTRANA Y EL PERIODATO DE SODIO.	35
FIGURA 5.-ESQUEMA DE LA REACCIÓN DE ENTRECruzAMIENTO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO CARBODIIMIDAS.	38
FIGURA 6.- ESQUEMA DEL ENTRECruzAMIENTO INTERMOLECULAR DE PROTEÍNAS VIA LAS CADENAS LATERALES DE CARBOHIDRATOS UTILIZANDO ÁCIDO ADÍPICO DIHIDRAZIDA.	40
FIGURA 7.- ESQUEMA DE LA DERIVATIZACIÓN Y ACOPLAMIENTO DE LA DEXTRANSACARASA CON DEXTRANA DE ALTO PESO MOLECULAR	43
FIGURA 8.-SENSIBILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> NRRL B-512F A LA EDC.	55
FIGURA 9.- SUSCEPTIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> NRRL B-512F A LA ACCIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PERIODATO DE SODIO.	57
FIGURA 10.- CURVA DE DESACTIVACIÓN TÉRMICA DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC MESENTEROIDES</i> NRRL B-512F A 40 °C.	58
FIGURA 11.- ACTIVIDAD RESIDUAL DEL BLANCO Y LOS DERIVADOS CON AAD.	60
FIGURA 12.-ESTABILIDAD DEL CONTROL Y LOS DERIVADOS DXSAAD-2.	62
FIGURA 13.- PERFIL DE OLIGOSACÁRIDOS PRODUCIDOS CON MALTOSA COMO ACEPTOR DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO (CONTROL) Y EL DERIVADO DE ÁCIDO ADÍPICO DIHIDRAZIDA (DXSAAD-1).	63
FIGURA 14.- PERFIL DE OLIGOSACÁRIDOS PRODUCIDOS CON MALTOSA COMO ACEPTOR DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO (CONTROL) Y EL DERIVADO DE ÁCIDO ADÍPICO DIHIDRAZIDA (DXSAAD-2).	64
FIGURA 15.- COMPARACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS DEXTRANAS PRODUCIDAS POR DXSAAD-2 Y EL CONTROL DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO (III).	65

FIGURA 16.-CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ELUCIÓN DE PROTEÍNAS DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO (CONTROL) Y DEL DERIVADO UTILIZANDO AAD.67	
FIGURA 17.- CURVA DE DESACTIVACIÓN A 40°C DEL CONTROL (BLANCO) Y DE LOS DERIVADOS DXS-DEX.	70
FIGURA 18.- PERFIL DE OLIGOSACÁRIDOS PRODUCIDOS CON MALTOSA COMO ACEPTOR DEL DERIVADO ACOPLADO CON DEXTRANA DE ALTO PESO MOLECULAR DXS-DEX.	71
FIGURA 19.- REACCIÓN CON DEXTRANASA. ALICUOTAS DE LA REACCIÓN DE LA DEXTRANSACARASA CON SACAROSA, SON EXPUESTAS A LA ACCIÓN DE LA DEXTRANASA POR 24 H A 35 °C Y PH=6.	72

INDICE DE TABLAS

TABLA I.- TIPOS Y PROPORCIÓN DE ENLACES EN LAS DEXTRANAS PRODUCIDAS POR DIFERENTES CEPAS DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i>	18
TABLA II.- PRINCIPALES TECNICAS DE MODIFICACION QUIMICA DE ENZIMAS.24	
TABLA III.- COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> NRRL B-512F	27
TABLA IV.-ESQUEMA DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA EDC CARBODIIMIDA EN LA ACTIVIDAD DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> NRRL B-512F.32	
TABLA V.- ESQUEMA DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL PERIODATO DE SODIO EN LA ACTIVIDAD DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> NRRL B-512F34	
TABLA VI.- PURIFICACIÓN DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> NRRL B-512F MEDIANTE LOS DIFERENTES PROTOCOLOS DESCRITOS EN MATERIALES Y MÉTODOS.	53
TABLA VII.- SENSIBILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC MESENEROIDES</i> NRRL B-512F AL PERIODATO DE SODIO. (DATOS DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES)	57
TABLA VIII.- RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ACTIVIDAD RESIDUAL DEL CONTROL Y DEL DERIVADO DXSAAD-1.	60
TABLA IX.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD TERMICA A 40 °C DEL DERIVADO DXSAAD-1 Y EL CONTROL.	62
TABLA X.-ACTIVIDAD DEL EXTRACTO ENZIMATICO (IV) RECUPERADA DURANTE LAS REACCIONES DEL ACOPLAMIENTO CON DEXTRANA DE ALTO PESO MOLECULAR.	68
TABLA XI.-ESTUDIO DE ESTABILIDAD TERMICA A 40 °C DEL CONTROL Y DEL DERIVADO DXS-DEX.	69
TABLA XII.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE DEXTRANA SOBRE LOS NIVELES DE HIDRÓLISIS DE SACAROSA Y DE TRANSFERENCIA A DEXTRANA DEL CONTROL Y DEL DERIVADO DXS-DER.	73
TABLA XIII.- COMPARACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL DERIVADO DXS-DER ANTES Y DESPUÉS DE UNA REACCIÓN DE SÍNTESIS DE DEXTRANA.	75

RESUMEN

Las dextrantransferasas (DXS) E.C. 2.5.1.4 son enzimas que pertenecen al grupo de las glucosiltransferasas. Catalizan la reacción de transferencia de residuos glucosilo de la sacarosa a aceptores distintos al agua formando así un polímero de glucosa llamado dextrana. Son producidas por diversos microorganismos entre los que se encuentra distintas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

En este trabajo se trabajó con la DXS de la cepa NRRL B-512F ya que es la mejor caracterizada y además es la que tiene una mayor aplicación a nivel industrial. Este tipo de enzimas tienen su temperatura óptima de actividad alrededor de los 40°C pero a esta temperatura son muy inestables, por lo que se trabaja la enzima a 30 °C en donde se sacrifica en algunos casos hasta el 80% de la actividad máxima.

El objetivo de este trabajo es lograr obtener una DXS que sea estable a 40 °C mediante el desarrollo y la aplicación de métodos de modificación química.

Se desarrollaron y probaron 2 protocolos de derivatización para la DXS que involucran en entrecruzamiento de las cadenas laterales de azúcar de la enzima previa oxidación. El primero utiliza ácido adípico dihidrazida (AAD) como agente entrecruzante para obtener el derivado DXSAAD (2) y el segundo se basa en el acoplamiento de dextrana a la enzima utilizando una alquilación reductiva para obtener el derivado DXSDEX. Se comparó la estabilidad y la especificidad de los derivados con respecto a la enzima sin modificar utilizando el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) a 40 °C y el perfil de producción de oligosacáridos con maltosa respectivamente.

Los $t_{1/2}$ calculados a partir de los datos de desactivación son de 19.69 min., 28.88 min. y 72.20 min. para el control (DXS), los derivados DXSAAD y DXSDEX respectivamente. La estabilización observada puede deberse al entrecruzamiento inter o intramolecular en el caso de DXSAAD y a la unión covalente entre la dextrana y la enzima en el caso de DXSDEX, ya que la estabilidad persiste aún después de una reacción de síntesis de dextrana, lo que indica que la DXS no intercambia la dextrana acoplada.

En cuanto a la especificidad, cabe notar que DXSAAD no presenta diferencias en el perfil de oligosacáridos producidos con maltosa si se compara con DXS. En cambio, DXSDEX casi no produce oligosacáridos y presenta una tendencia mayor a hidrolizar la sacarosa a costa de la reacción de transferencia. Sin embargo, la actividad transferasa se recupera si se añade dextrana a la reacción, este cambio en la especificidad puede deberse a que la enzima no puede por sí sola, intercambiar los derivados de dextrana que se agregan y generan durante la derivatización.

Se logró incrementar la estabilidad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F mediante la modificación química de su estructura glicolítica. Hasta la fecha, todo intento por estabilizar esta enzima había sido infructuoso.

I. INTRODUCCION

Las dextranasacarasas (E.C. 3.5.1.4) son enzimas que pertenecen al grupo de las glucosiltransferasas. Estas enzimas catalizan la reacción de transferencia de residuos glucosilo de moléculas donadoras (sacarosa) a moléculas aceptoras diferentes al agua, formando así un polímero de glucosa llamado dextrana. Son producidas por bacterias de la especie *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum* así como por especies de *Bacillus* y *Streptococcus*. Existen varios tipos de glucosiltransferasas producidas por diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, cuya diferencia principal es el tipo de polímero que cada una de ellas sintetiza. Los tipos de polímeros difieren entre sí según las propiedades derivadas de su estructura, tipo de enlace, tamaño de la cadena y ramificaciones.

En general, las dextranasacarasas pueden también transferir residuos de glucosa a diferentes aceptores que casi siempre son azúcares de bajo peso molecular (maltosa, fructosa, isomaltosa) para formar oligosacáridos. De este modo se definen como buenos aceptores aquellos que producen un gran cantidad de oligosacáridos y una pequeña cantidad de polisacárido (dextrana). Algunos de estos oligosacáridos tienen un gran potencial de aplicación en la industria. Las aplicaciones de las dextranas en la industria son muy variadas y numerosas y dependen justamente de la estructura y propiedades del polímero.

Este trabajo forma parte de un proyecto cuyo objetivo en la primera etapa fue estudiar la síntesis de oligosacáridos utilizando dextranasacarasas de diversas cepas de *Leuconostoc mesenteroides* tanto de colección como aisladas durante la realización del proyecto. En la segunda etapa se ha venido intentando mejorar las características en cuanto a su estabilidad y a su especificidad de las enzimas de las cepas seleccionadas, dado que algunas de ellas han alcanzado aplicaciones a nivel industrial, como es el caso de la enzima de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F y B-1299.

En este trabajo se pretende mejorar la estabilidad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Tiene como antecedentes inmediatos el hecho de que, en el grupo de ingeniería enzimática del Instituto de Biotecnología de la UNAM se han elaborado trabajos relacionados con la caracterización y producción de esta y otras enzimas de cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, incluyendo la 512, la 1299, la 1386, entre otras. Actualmente se estudia el mecanismo de reacción con base en la caracterización cinética de la enzima. Existe también un proyecto que tiene como objetivo la clonación del gene que codifica para esta enzima, ya que a la fecha se conoce muy poco acerca del genoma de *Leuconostoc mesenteroides*.

En la actualidad, se presenta una paradoja entre actividad y estabilidad para este tipo de enzimas, es decir, tienen su temperatura óptima de actividad alrededor de los 40°C pero a esta temperatura la enzima es muy inestable. Esto se resuelve llevando a cabo la reacción con la enzima a 30°C, en donde es mucho más estable pero se sacrifica en algunos casos hasta el 80% de la actividad máxima que podría desarrollar. Por otro lado, la posibilidad de contar con enzimas termoestables resulta de gran interés en los procesos industriales, ya que se contaría con catalizadores que presentan mayor velocidad de reacción y sobre todo menor susceptibilidad a la contaminación. De este modo, lograr obtener una dextranasa estable a 40°C y que conserve su actividad normal, representaría una gran ventaja desde el punto de vista de rendimiento de la reacción y de la productividad.

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó la dextranasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, la cual puede sintetizar oligosacáridos con una estructura que consta de una cadena principal de glucosa con enlaces α -1,6. Se decidió trabajar con la enzima de esta cepa ya que es la mejor caracterizada y sirve como un buen modelo de estudio. Además es la que tiene una mayor aplicación industrial en la actualidad.

OBJETIVOS

GENERAL:

Obtener una dextransacarasa estable para la síntesis de oligosacáridos mediante el desarrollo y aplicación de diferentes estrategias de modificación química.

II. GENERALIDADES

2.1 ESTABILIZACION DE ENZIMAS

Se dice que una enzima es termoestable cuando es capaz de conservar su actividad catalítica después de ser expuesta a altas temperaturas. La actividad catalítica de las enzimas depende de su estructura tridimensional. En ésta, los residuos involucrados en la catálisis están alineados de modo que reconocen a su sustrato y pueden llevar cabo la reacción. En otras palabras, una enzima es más termoestable que otra mientras más resistente sea su estructura contra la desnaturalización térmica, es decir, mientras esa estructura sea capaz de mantener alineados a los residuos de catálisis. Por esta razón, si se pretende modificar una enzima para que adquiera termoestabilidad, se deben buscar estrategias para que la estructura tridimensional de la proteína resista mejor las reacciones de desnaturalización térmica.

2.1.1 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

Las interacciones que mantienen la estructura tridimensional de una proteína son bien conocidas:

- 1.- Interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos. Este tipo de interacciones es considerada como la mayor fuerza estabilizadora en las proteínas.
- 2.- Puentes disulfuro, que se generan cuando dos cisteínas se encuentran lo suficientemente cerca en la estructura tridimensional. Este tipo de interacciones proveen de estabilidad conformacional.
- 3.- Interacciones iónicas, que son interacciones de cargas formales dentro de la estructura de la proteína y se da entre las cadenas laterales de los aminoácidos que a un cierto pH se encuentran cargados.
- 4.- Por último, los puentes de hidrógeno, responsables de la estructura secundaria, juegan un papel importante en la estabilidad de la estructura tridimensional.

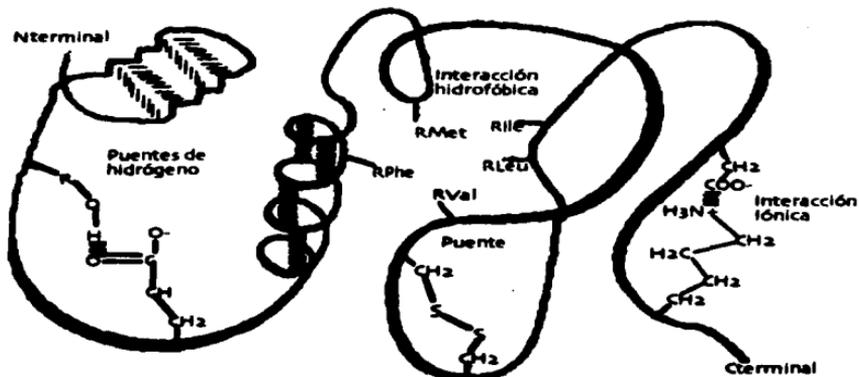


Figura 1.- Esquema de las interacciones responsables de mantener la estructura tridimensional de las proteínas.

2.1.2 DESNATURALIZACION

El proceso de desnaturalización térmica que conduce a la pérdida de la actividad, puede explicarse mejor si se divide en dos etapas⁵. En la primera, el desplegamiento de la cadena polipeptídica, consiste en la pérdida de la estructura tridimensional y por lo tanto de su actividad. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, algunas proteínas son capaces de plegarse de nuevo, de modo que recuperan completamente su actividad. La segunda etapa, la inactivación, consiste en cambios químicos irreversibles en la cadena polipeptídica desplegada, ya que un polipéptido desplegado es más susceptible a cambios químicos como la proteólisis. La Figura 2 muestra este proceso de manera esquemática.



Figura 2.-Esquema del proceso de desnaturalización térmica de las proteínas.

2.2 GENERALIDADES DE LAS DEXTRANSACARASAS

Las dextranasacarasas E.C.2.5.4.1. catalizan la formación de dextrana a partir de sacarosa transfiriendo residuos de glucosa a una cadena creciente de dextrana como se esquematiza a continuación:



Las dextranas son polímeros de glucosa con enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$ y pueden presentar ramificaciones en $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 2$ y $\alpha 1 \rightarrow 4$. Los tipos y las proporciones de los enlaces en el polímero varían dependiendo del microorganismo que lo produce.

Así, en la Tabla 1, se presentan los tipos y los proporción de enlaces en la cadena principal del polímero, así como los tipos y los porcentajes de enlaces en las ramificaciones que se logran empleando dextranasacarasas de distintas cepas de *Leuconostoc mesenteroides* incluyendo la cepa B-512F seleccionada para realizar este trabajo.

Cabe hacer notar que en general, las distintas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, producen la enzima de manera extracelular (soluble) y solo algunas cepas de esta especie presentan actividad dextranasacarasasa asociada a las células (insoluble). Como se puede ver en la Tabla 1, los productos de las diferentes fracciones de una misma cepa varían en cuanto a su composición de enlaces.

Tabla 1.- Tipos y proporción de-enlaces en las dextranas producidas por diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.⁴

MICROORGANISMO	% DE ENLACES EN EL POLIMERO				
	$\alpha 1,6$ p	$\alpha 1,3$ p	$\alpha 1,3$ r	$\alpha 1,2$ r	$\alpha 1,4$ r
L.m. B-512F(soluble)	95		5		
L.m. B-1299 (soluble)	65			35	
L.m. B-1299 (insoluble)	66		1	27	
L.m. B-742 (insoluble)	87				13
L.m. B-742 (soluble)	50		50		
L.m. B-1355 (soluble)	54	35	11		
L.m. B-1355 (insoluble)	95		5		

p= Enlaces en la cadena principal.

r= Enlaces de las ramificaciones.

Las dextranas han sido utilizadas como agentes texturizantes, viscosificantes o gelificantes en la industria de los alimentos. Se ha observado que evitan la cristalización de los azúcares en jarabes y se utilizan también como agentes floculantes. En la industria farmacéutica, se utilizan como agentes de encapsulación y como vectores de medicamentos. También se utilizan dextranas de peso molecular controlado como sustituto de plasma sanguíneo y como complejo Fe-dextrana en el tratamiento de anemia. Derivados de dextrana se utilizan como tamiz molecular para la separación y purificación de compuestos biológicos, siendo el más conocido de todos el Sephadex.³

En general, las dextran-sacarosas son capaces de llevar a cabo las llamadas "reacciones de aceptor", que consisten en la transferencia del residuo glucosilo de la sacarosa a un aceptor, que por lo general son carbohidratos pequeños, dando como resultado la síntesis de oligosacáridos.



La variedad, así como la concentración de oligosacáridos producidos por estas enzimas depende de varios factores como son la naturaleza y la concentración del aceptor. Los aceptores pueden clasificarse en fuertes y débiles dependiendo de su capacidad para desviar la síntesis de dextrana hacia la formación de oligosacáridos. De este modo, los aceptores fuertes son aquéllos que casi eliminan la formación de dextrana haciendo que la enzima produzca principalmente oligosacáridos. En cambio, los aceptores débiles son aquéllos que al no tener gran afinidad por la enzima, permiten la formación de dextrana en la reacción. El tipo de oligosacáridos también depende de la fuente de la enzima. En la Figura 3 se esquematizan los diferentes productos de la reacción con maltosa como aceptor, utilizando diferentes dextransacarasas.

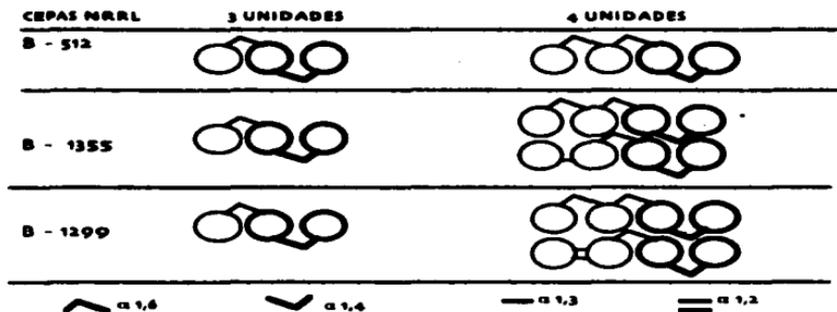


Figura 3.- Esquema de los oligosacáridos producidos con maltosa como aceptor utilizando dextransacarasas provenientes de diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.⁴

La síntesis enzimática de oligosacáridos representa una alternativa ventajosa a la síntesis química. La catálisis enzimática presenta una alta especificidad, en cuanto al tipo de enlaces. Además, las condiciones de reacción son fáciles de controlar y no es necesario la utilización de reactivos peligrosos o dañinos. Los oligosacáridos pueden tener aplicaciones industriales, por ejemplo como edulcorantes, agentes probióticos y sustitutos no cariogénicos de la sacarosa, entre otros.

2.3 PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Esta cepa fue aislada de la caña de azúcar y en la actualidad se utiliza para la producción de dextrana a nivel industrial. Existen numerosas publicaciones en donde se describen métodos para producir y purificar a la dextranasacarasa de este microorganismo^{3,4,7}. De hecho, aunque el objetivo de estas publicaciones no sea la purificación de la enzima, generalmente los protocolos son mencionados, lo que nos da una idea de la importancia de este punto.

2.3.1 FERMENTACION

La enzima es excretada por el microorganismo durante la fermentación de manera asociada al crecimiento del mismo, de modo que la máxima actividad en un cultivo en lote se logra al final de la fase de crecimiento exponencial⁸. Cabe mencionar que la producción de la enzima es inducida por la presencia de sacarosa en el medio de cultivo. La ausencia de sacarosa se traduce en la no expresión de la actividad. Puede realizarse la fermentación de manera alimentada ya que la alimentación con sacarosa reduce el fenómeno de represión catabólica incrementando la formación de la enzima, obteniéndose un sobrenadante con mayor actividad⁹.

2.3.2 PURIFICACION

El hecho de que la dextranasacarasa se produzca sólo en presencia de sacarosa, implica que exista producción de dextrana paralela a la producción de la enzima. De hecho, una de las técnicas de purificación mas sencillas, consiste en la precipitación de la enzima asociada a la dextrana, en una partición de dos fases acuosas. Esto se logra con la adición de polietilenglikol (PEG), al sobrenadante de la fermentación de modo que la dextrana se agrega y precipita junto con la enzima asociada a ella.

La presencia de dextrana y la alta afinidad de la enzima por ella, dificulta su caracterización. El problema es por lo tanto, obtener extractos enzimáticos libres de dextrana. Para este fin se recurre entonces a la adición de dextranasas (que

hidrolizan la dextrana produciendo isomaltosa) seguida de diálisis y diversos tipos de cromatografías.

Los problemas para la caracterización de la enzima, así como para obtener un extracto enzimático libre de dextrana, ha sido el objeto de varios trabajos de investigación con resultados diversos. Por ejemplo, existen reportes en la literatura en los que se logra purificar proteínas con actividad dextransacarasa con un peso molecular de 64-65 kDa⁹, y otros con pesos moleculares de hasta 170 kDa^{7,6,10}.

Una forma de evitar el problema de la presencia de dextrana, ha sido generando cepas constitutivas a partir de la B-512 utilizando nitrosoguanidina para producir mutaciones al azar y posterior selección de colonias para obtener una cepa nueva con la capacidad de producir dextransacarasa libre de dextrana^{11,12}.

2.4 ESTRATEGIAS DE ESTABILIZACION

Teniendo conocimientos previos acerca de la estructura de la proteína es posible implementar estrategias para lograr mantener la estructura tridimensional. Los tipos de estrategias para estabilizar enzimas pueden clasificarse en dos grandes tipos:

- 1.- **GENETICAS.**- En donde quedan incluidas las técnicas de manipulación del DNA, ingeniería de proteínas, y mutagénesis dirigida.
- 2.- **QUIMICAS.**- Que incluyen los distintos tipos de reacciones que se pueden realizar sobre las proteínas como acoplamientos y entrecruzamientos, y también la adición de solutos al medio de reacción.

Durante la realización del proyecto, se implementaron diversas estrategias químicas para estabilizar la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. Estas estrategias incluyeron el entrecruzamiento con ácido adípico dihidrazida y el acoplamiento de la enzima con dextrana de alto peso molecular.

2.4.1 MODIFICACIONES GENÉTICAS PARA LA ESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS.

La modificación racional de residuos en las proteínas con un fin determinado es actualmente un área de investigación de frontera de la ciencia. Se trata de el poder predecir el efecto que tendrá cierta mutación en una posición determinada de una proteína, lo que constituye aún un reto para la ciencia.

Para poder llevar a cabo con éxito una estrategia de este tipo, es necesario un conocimiento profundo acerca de la enzima en cuestión en cuanto a su secuencia y estructura tridimensional, además de contar de preferencia con protocolos bien establecidos para el aislamiento del gen, para la expresión de la proteína y por supuesto un sistema eficiente de búsqueda y selección de mutantes. Se han reportado éxitos en la estabilización de enzimas por estos métodos^{14,15,16,17,18}. Las estrategias van desde incrementar la hidrofobicidad de la proteína sustituyendo aminoácidos en la superficie de la enzima, hasta mutaciones puntuales en donde se generan incluso nuevos puentes disulfuro o bien, modificaciones en los dominios de interacción de las subunidades para evitar inactivación por disgregación.

2.4.2 MODIFICACIONES QUIMICAS

Existen reportes en la literatura en los que se reportan modificaciones químicas a diversos tipos de enzimas con objetivos diversos, entre los que destacan el cambiar la actividad de la enzima hacia reacciones de interés, estabilización térmica, o bien, simplemente el buscar la posibilidad de nuevas actividades que puedan ser de utilidad para la industria o la investigación.¹⁹

Es necesario entender que las enzimas son entes químicos, susceptibles de modificación. Dentro de la estructura del polipéptido existen grupos funcionales que pueden ser modificados. En general, se trata de las cadenas laterales de algunos de los aminoácidos que conforman el polipéptido, incluyendo grupos amino y grupos carboxilo libres, así como grupos hidroxilo.

El caso de las glicoproteínas es especial, ya que presentan cadenas laterales de carbohidratos covalentemente unidas a la cadena polipeptídica, lo que hace que la gama de reacciones que se pueden llevar a cabo sea mayor. Es decir, se pueden hacer reaccionar estas cadenas y así lograr derivatizaciones sin hacer intervenir a la cadena polipeptídica, disminuyendo el riesgo de inactivación de la enzima.

La gama de reacciones que se pueden llevar a cabo están limitadas, además de la naturaleza de los grupos funcionales, por las condiciones a las que es posible someter a la enzima sin que ésta pierda su actividad de manera definitiva, como son pH extremos y altas temperaturas e incluso, la susceptibilidad a reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones de derivatización. A menudo, dentro de los protocolos de derivatización, se incluye la adición del sustrato natural de la enzima o bien, de algún inhibidor competitivo con el propósito de proteger los residuos de aminoácidos involucrados en la catálisis.

Otro aspecto importante que debe tomarse en cuenta, es la accesibilidad de los reactivos hacia los grupos funcionales susceptibles de la proteína. En algunos casos es deseable modificar solamente los grupos que se encuentran en la superficie de la enzima, como en el caso de cambiar la hidrofobicidad de la proteína.²

En otros se trata de un reacción química dirigida para hacer reaccionar grupos seleccionados de la enzima que se encuentran en el interior de la enzima, o incluso cerca del sitio de catálisis. En estos casos se pueden llevar a cabo reacciones previas de protección, o bien, reacciones de activación de grupos funcionales.²

Se han realizado numerosas revisiones en donde se describen los diferentes métodos de modificación química de enzimas,^{2,19,20} así como los mecanismos que intervienen en la estabilización de la estructura activa de las enzimas. En la Tabla II se enlistan los tipos de modificaciones químicas mas frecuentes que se han utilizado para estabilizar enzimas¹⁹.

Tabla II.- PRINCIPALES TECNICAS DE MODIFICACION QUIMICA DE ENZIMAS.

INMOVILIZACION COVALENTE EN MULTIPLES SITIOS

INMOVILIZACION DINAMICA (Co-precipitación de la enzima con polímeros biológicos sobre una membrana).

USO DE SUSTANCIAS BIFUNCIONALES:

Díimidoésteres.

Ditíoles.

Ácidos dicarboxílicos activados con Carbodílimidas.

Diaminas con la proteína activada con Carbodílimidas.

Díisocianatos.

Díhidrazidas.

MODIFICADORES DE GRUPOS FUNCIONALES:

Glooxidación de grupos amino.

Acetilación de grupos amino.

Guanidinación de grupos amino.

Succinilación de grupos amino.

Acetimidación de lisinas.

HIDROFILIZACION DE GRUPOS SUPERFICIALES.

ACOPLAMIENTOS:

Con PEG

Con carbohidratos.

Según O'Fágáin y colaboradores (1988)¹⁹, los mayores logros en la termoestabilidad se han dado principalmente utilizando estrategias que involucran acoplamientos con polímeros de alto peso molecular y mediante la utilización de protocolos de entrecruzamiento inter e intramolecular.

Los tipos de modificaciones varían de acuerdo con el tipo de enzima y al objetivo del trabajo en cuestión. En concreto, los tipos de modificaciones que se pueden llevar a cabo sobre una enzima con el objeto de lograr que ésta adquiera termoestabilidad, incluyen la inmovilización de las enzimas en soportes a los que la enzima se une covalentemente, las modificaciones en el medio de reacción como la concentración de algunos iones y la presencia de elevadas concentraciones de sustrato, también se incluyen a las reacciones de acoplamiento de la enzima con poli u oligosacáridos (como las dextranas)^{25,26} o bien, con otro tipo de polialcoholes²⁷ como el polietilenglicol^{28,29} y el polivinil alcohol. En este último caso, previa activación de sus grupos hidroxilo vía oxidación, para unirse de manera covalente a grupos amino disponibles de la enzima y formar así una base de Schiff. La molécula que se obtiene muestra una mayor resistencia a la desactivación térmica^{24,25,26}.

Otro tipo de estrategia mediante la cual se ha obtenido cierto éxito, es la utilización de "agentes bifuncionales"²⁷ como los diimidoésteres (que reaccionan con grupos amino), ditioles (que actúan sobre grupos -SH), ácidos dicarboxílicos activados con carbodiimidas,²⁸ diaminas (que reaccionan con la enzima previamente activada con carbodiimidas), o bien, diisocianatos.²³

Otra estrategia en este sentido es la posibilidad que ofrecen las glicoproteínas (proteínas que en su estructura cuentan con cadenas de carbohidratos unidas a la cadena de aminoácidos). Estas cadenas de carbohidratos pueden reaccionar con periodato, de modo que rinden en grupos aldehído que pueden ser modificados posteriormente utilizando agentes bifuncionales como las dihidrazidas y efectuar un entrecruzamiento entre unidades de enzimas oligoméricas o bien, entrecruzamiento intramolecular que lleve a una rigidización de la estructura y la "proteja" contra la denaturalización térmica.²⁹

La estabilización por estos procesos está dada por el entrecruzamiento que causa la presencia de estos compuestos en la forma activa de la proteína, lo que previene la desnaturalización térmica de la misma. También en este caso son muchas las variantes pues se incluye a los reactivos, tiempos de reacción y las temperaturas y dependen de la disponibilidad de grupos reactivos que posea la proteína a modificar².

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

3.1.1 CONDICIONES DE LA FERMENTACION

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, se mantiene en glicerol al 25% v/v a 0°C.

Para activar el microorganismo e iniciar la fermentación, 4 mL de glicerol que contiene células viables de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F se traspasan a un matraz erlenmeyer de 250 mL que contiene 50 mL de medio de cultivo estéril y se coloca a 30°C, 200rpm durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo, los 50 mL de medio se transfieren a un matraz fembach que contiene 450 mL de medio estéril. Este matraz se coloca de nuevo a 30°C, 200rpm.

MEDIO DE CULTIVO:

Tabla III.- Composición del medio de cultivo para el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F .

COMPONENTE	g/L
Sacarosa	20
Extracto de Levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
NaCl	0.01
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01

Ajustar pH a 6.9 utilizando ácido ortofosfórico o bien, hidróxido de potasio.

3.1.2 PURIFICACION

Durante el desarrollo del proyecto, el proceso de purificación de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F se fue modificando introduciendo mejoras derivadas de la experiencia generada. A continuación, se describen cuatro procesos en orden cronológico de desarrollo.

Los pasos elementales de purificación y las "mejoras" al proceso de purificación a partir del sobrenadante de la fermentación, quedan ilustrados de la siguiente manera:

I

- 1.- Ajustar el pH a 5.2 y separar células por centrifugación.
- 2.- Ultrafiltrar a través de fibras huecas con un peso molecular de corte de 100,000 (la enzima tiene un peso molecular de 170,000).

II

- 1.- Ajustar el pH a 5.2 y separar células por centrifugación.
- 2.- Agregar DEXTRANASA de la marca AMANO hasta 1 U/mL y permitir la acción de la enzima durante 24 h. a 4 °C.
- 3.- Ultrafiltrar a través de fibras huecas con un peso molecular de corte de 100,000 (la enzima tiene un peso molecular de 170,000).

III

- 1.- Ajustar el pH a 5.2 y separar células por centrifugación.
- 2.- Agregar DEXTRANASA (Sigma) hasta 1 U/mL y permitir la acción de la enzima durante 24 h. a 4 °C.
- 3.- Ultrafiltrar a través de fibras huecas con un peso molecular de corte de 100,000 (la enzima tiene un peso molecular de 170,000).
- 4.- Concentrar hasta un volumen pequeño.

IV

- 1.- Ajustar el pH a 5.2 y separar células por centrifugación.
- 2.- Agregar DEXTRANASA (extracto crudo) hasta 1 U/mL y permitir la acción de la enzima durante 24 h. a 4 °C.
- 3.- Ultrafiltrar a través de fibras con un corte en 100.000.
- 4.- Agregar DEXTRANASA de alta pureza hasta 1 U/mL y permitir la acción de la enzima durante 24 h. a 4 °C.
- 5.- Ultrafiltrar a través de fibras con un corte en 100.000.
- 6.- Concentrar hasta un volumen pequeño.
- 7.- Liofilizar y resuspender.

En la sección de Resultados y Discusión, se podrá observar cómo los diferentes protocolos de purificación resultan en extractos enzimáticos con diferentes características, principalmente en el contenido de dextrana y en la proporción de carbohidratos asociados a la proteína.

3.2 TECNICAS ANALITICAS.

3.2.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La unidad de actividad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F se define como las micromoles de fructosa liberadas por minuto, y se reporta en unidades volumétricas (para los diferentes extractos), o bien, referida a los miligramos de proteína para expresar la actividad específica.

La cantidad de fructosa se mide utilizando la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS), reportada por Summer³⁰. El fundamento de esta técnica es la reacción cuantitativa de la fructosa con el DNS que da lugar a un compuesto colorido que se determina espectrofotométricamente a 540 nm.

Los pasos generales para la determinación son:

- 1.- Tomar una alícuota del extracto enzimático al cual se le va medir actividad y diluirla con amortiguador de acetatos 0.05M a pH=5.2 hasta 10 mL. La cantidad de extracto y de amortiguador dependen de la actividad esperada. Incubar a 30°C
- 2.- Agregar 2 mL de una solución al 60% de sacarosa en amortiguador de acetatos 0.05M a pH=5.2 para iniciar la reacción, asegurandose de lograr un buen mezclado.
- 3.- Tomar alícuotas de 0.5 mL de la reacción a intervalos de tiempo determinados y traspasar a tubos de ensayo que contienen 0.5 mL de DNS. (El pH del DNS es suficiente para inactivar a la enzima instantáneamente).
- 4.- Los tubos de ensayo conteniendo las diferentes muestras y el DNS son traspasados a un baño María en ebullición y dejándose incubar durante 5 minutos, con el objeto de que la reacción entre la fructosa liberada de la reacción enzimática y el DNS se lleve a cabo.
- 5.- Enfriar los tubos inmediatamente en un baño de hielo y agua.
- 6.- Agregar 5 mL de agua destilada a cada tubo.
- 7.- Leer absorbancia a 540 nm.

La actividad es calculada a partir de la pendiente que se obtiene del análisis de regresión lineal de estos datos, utilizando una curva patrón de un estándar de fructosa para convertir la absorbancia a micromoles de fructosa liberadas.

3.2.2 DETERMINACION DE PROTEÍNA (LOWRY)

El método de Lowry²¹ para la determinación de proteína, se basa en la formación del complejo colorido entre el ion de cobre II y los nitrógenos de los enlaces peptídicos. Este complejo se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de 590 nm.

Los pasos generales para la cuantificación de proteína son:

- 1.- Tomar una alícuota de la muestra que se quiere determinar y se lleva a 1 mL con agua destilada.
- 2.- Agregar 5 mL de la solución E¹ y agitar.
- 3.- Incubar durante 10 minutos.
- 4.- Añadir 0.5 mL del reactivo de Folin, (diluido 1:1 con agua) y agitar.
- 5.- Incubar durante 30 min.
- 6.- Leer la absorbancia a 590 nm utilizando como blanco una mezcla de todos los reactivos con 1 mL de agua destilada.

¹ Esta solución se prepara de la siguiente manera:

Sol. A. - Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N.

Sol. B. - CuSO_4 al 0.5% en agua destilada.

Sol. C. - Tartrato de sodio y Potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) al 1% en agua destilada.

Sol. E. - 1 mL de B + 1 mL de C aforados a 100 mL con A.

La concentración de proteína se obtiene comparando la absorbancia de la muestra con una curva patrón de albúmina, tomando en cuenta la dilución de la muestra en el paso 1.

3.2.3 CARBOHIDRATOS TOTALES (ANTRONA)

El método empleado para determinar carbohidratos totales se basa en la reacción entre la antrona y los monosacáridos para dar un compuesto colorido que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 630 nm. El reactivo es una solución de antrona 0.2% en ácido sulfúrico. El papel de este último es el de hidrolizar totalmente los polisacáridos para que los monosacáridos que los constituyen puedan reaccionar y ser cuantificados.

Los pasos generales para la determinación de carbohidratos totales son:

- 1.- Tomar una alícuota de la muestra problema y llevarla a 1 mL con agua destilada. Colocar los tubos en un baño de hielo y agua.
- 2.- Añadir 2 mL del reactivo de Antrona.
- 3.- Tapar los tubos y mezclar.
- 4.- Incubar los tubos en un baño de agua a 80°C durante 15min.
- 5.- Enfriar nuevamente los tubos en un baño de hielo y agua durante 5min.
- 6.- Mezclar.
- 7.- Leer la absorbancia a 630 nm.

La concentración de carbohidratos totales se obtiene comparando la absorbancia de la muestra con una curva patrón de dextrana, tomando en cuenta la dilución de la muestra.

3.2.4 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA A DIVERSOS COMPUESTOS QUIMICOS

Durante la modificación química, es necesario someter a la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F a la acción de agentes químicos que pueden por sí solos ser nocivos para la integridad de la estructura o bien atacar los sitios de catálisis, traduciéndose en una pérdida de la actividad. Es necesario entonces, caracterizar a la enzima en términos de su "resistencia" a la acción de los agentes químicos involucrados en las reacciones de modificación:

3.2.4.1 SENSIBILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA A LA ACCION DE LA CARBODIIMIDA

Existen diferentes carbodiimidas disponibles comercialmente. En este trabajo se utilizó la 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC), de SIGMA, por ser soluble en agua. Las carbodiimidas reaccionan con los grupos carboxilo de modo que quedan "activados" para reaccionar con grupos amino cercanos. Debido a que los mecanismos propuestos para las dextranases involucran grupos carboxilos como responsables de la catálisis, es necesario hacer este estudio. En la Tabla IV, se describe el procedimiento utilizado en esta prueba.

Tabla IV.-Esquema del estudio experimental realizado para determinar el efecto de la EDC carbodiimida en la actividad de la dextran sacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Concentración molar de EDC	μL de amortiguador	μL de sacarosa 60%	μL de dxs. 5 U/mL	μL de 0.5M de EDC	Volumen Total (mL)
0	900	100	1000	0	2
0.01	860	100	1000	40	2
0.02	820	100	1000	80	2
0.03	780	100	1000	120	2
0.04	740	100	1000	160	2
0.05	700	100	1000	200	2

La adición de sacarosa se hace con el objeto de "proteger" los carboxilos que pueden estar involucrados en la catálisis.

Los pasos generales de la prueba se describen a continuación.

- 1.- Agregar los reactivos en el orden y cantidades como se indica la Tabla IV.
- 2.- Dejar incubar 30 minutos en un baño de hielo y agua.
- 3.- Añadir 8 mL de amortiguador helado para detener la reacción por dilución.
- 4.- Dializar a 4°C inmediatamente en bolsas con un corte de 12,000 14,000 kDa contra 1 L de amortiguador, 4 recambios de 1 hora cada uno.
- 5.- Medir actividad enzimática.

3.2.4.2 SENSIBILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA A LA OXIDACION CON PERIODATO DE SODIO

El periodato de sodio es un agente oxidante que en condiciones controladas puede dar lugar a reacciones "específicas". En el caso de la oxidación de carbohidratos, este reactivo puede generar grupos aldehídos que pueden aprovecharse para nuevas reacciones. El esquema de la prueba de sensibilidad se resume en la Tabla V.

Tabla V.- Esquema del estudio experimental realizado para determinar el efecto del periodato de sodio en la actividad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

Concentración molar de NaIO_4	μL de amortiguador	μL de DXS 2U/mL	μL de 0.2M de NaIO_4	Volumen Total (mL)
0	1000	1000	0	2
0.01	900	1000	100	2
0.02	800	1000	200	2
0.03	700	1000	300	2
0.04	600	1000	400	2

(DXS= Dextranasa)

Los pasos generales para la realización de la prueba se describen a continuación:

- 1.- Agregar los reactivos en el orden y cantidades indicadas en la Tabla V.
- 2.- Incubar durante 24 horas en la oscuridad a 4°C .
- 3.- Agregar 0.5 mL de bisulfito de sodio 0.4 M con el fin de terminar la reacción con periodato.
- 4.- Dializar a 4°C contra 1 L de amortiguador en bolsas con un corte de $12,000$ $14,000$, 4 recambios de 1 hora cada uno..
- 5.- Medir actividad enzimática.

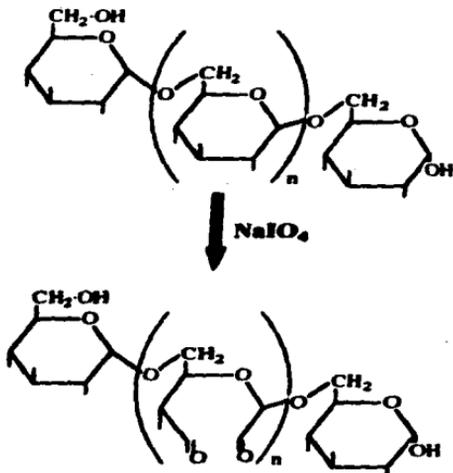


Figura 4.- Esquema de la reacción entre la dextrana y el periodato de sodio.

3.3 DETERMINACION DE ESTABILIDAD TERMICA DE LA ENZIMA

Para caracterizar a la enzima en términos de su estabilidad térmica, se diseñaron 2 tipos de experimentos. El primero consiste en una prueba preliminar rápida de la que se puede concluir si una derivatización es o no exitosa sin necesidad de gastar tiempo y enzima. Con base en este resultado preliminar, se realiza la segunda prueba, mas rigurosa.

3.3.1 PRUEBA DE ACTIVIDAD RESIDUAL

Con la experiencia generada al caracterizar a la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, se sabe que la enzima pierde gran parte de su actividad al incubarla durante 5 minutos a 40°C, dejando actividad "suficiente" para realizar la determinación de la actividad por DNS. Así, los derivados, supuestamente más estables, deberán retener más actividad aún. Se tiene entonces una prueba rápida que nos da una idea de la estabilidad.

Los pasos que se siguieron para estas determinaciones son:

- 1.- Incubar 5 mL de la muestra y del blanco (1 U/mL) en un baño a 40 °C durante 5 minutos.
- 2.- Tomar 2 mL de cada muestra al tiempo cero, otros 2 mL a los 5 minutos y traspasarlos a tubos en un baño a 30 °C que contienen 4 mL de amortiguador.
- 3.- Medir la actividad enzimática residual.

3.3.2 CURVA DE DESACTIVACION A 40 °C

Este experimento se realiza con el fin de determinar de manera precisa el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), que es el tiempo en el que la enzima pierde la mitad de su actividad a una temperatura dada. Con este parámetro, podemos comparar cuantitativamente la estabilidad de los derivados y compararla con la de la enzima sin derivatizar.

Los pasos que se siguieron para esta determinación son:

- 1.- Incubar 10 mL de la muestra y del blanco (1 U/mL) en un baño de agua a 40°C.
- 2.- Tomar alícuotas de 2 mL a diferentes tiempos y pasarlas a tubos que contienen 1 mL de amortiguador en un baño de agua a 30°C.
- 3.- Medir la actividad enzimática residual.
- 4.- Calcular el $t_{1/2}$ a partir del modelo de desactivación de 1^{er} orden:

$$A = A_0 e^{-kt}$$

Cuando $A = \frac{A_0}{2}$ se obtiene que

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

Donde:

A = Actividad residual.

$t_{1/2}$ = Tiempo de vida media

A_0 = Actividad inicial.

k = Constante de desactivación.

t = Tiempo.

3.4 MODIFICACIONES QUIMICAS

A continuación se describen diversas estrategias de derivatización que se implementaron para la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

3.4.1 ENTRECruzAMIENTO CON CARBODIIMIDAS

Como ya se mencionó en los antecedentes, las carbodiimidas en general y en especial la 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC) han sido utilizadas para la generación de agregados de proteínas²², o bien, como agentes químicos de modificación²³.

3.4.1.1 FUNDAMENTO

El fundamento químico de esta modificación es la activación de grupos carboxilo "libres" en la proteína, lo que los hace muy reactivos contra cualquier grupo amino, ya sea del mismo o de otro polipéptido, logrando así entrecruzamientos intra o intermoleculares respectivamente. El tamaño relativamente pequeño del reactivo permite activar prácticamente todos los grupos carboxilo de la proteína y hacerlos disponibles para la reacción con los amino sin la necesidad de hacer intervenir catalizadores ni estabilizadores.

Como se ilustra en Figura 5, la reacción solo requiere de la adición de la carbodiimida para llevarse a cabo y no añade átomos a la estructura molecular.

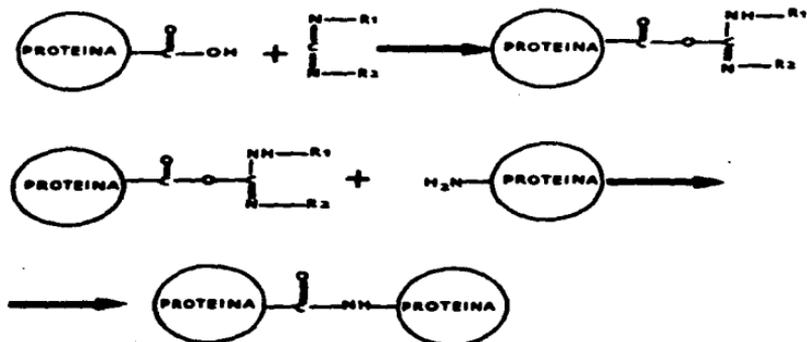


Figura 5.-Esquema de la reacción de entrecruzamiento de proteínas utilizando carbodiimidas.

3.4.1.2 PROTOCOLO

Tomando como base las condiciones reportadas en la bibliografía por Grabarek y Gergely²² y por Kasumi et.al.²³ se desarrolló el siguiente protocolo de derivatización para la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F.

Los pasos generales para la derivatización son:

1. Mezclar 500 μl de extracto enzimático, con 300 μL de sacarosa al 60% en tubos de ensayo en un baño de hielo y agua.
2. Agregar 200 μl de la solución stock de EDC (0.5M).
3. Incubar 30 minutos en el hielo.
4. Añadir 9 mL de amortiguador helado.
5. Dializar contra 1 L de amortiguador a 4°C en bolsas con un corte de 12,000 14,000 kDa, 4 recambios de 1 hora cada uno.
6. Medir actividad enzimática.

3.4.2 ENTRECruzAMIENTO CON ACIDO ADIPICO DIHIDRAZIDA

Kobayashi³⁶ demostró que la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F se encuentra unida covalentemente a la dextrana que produce, además, encontró carbohidratos que son insensibles al tratamiento con endodextranasas y que se mantienen unidas a la proteína, de modo que la enzima es una glicoproteína que contiene 17.4% de carbohidratos en su estructura. Por otro lado Robyt y Walseth³⁷ encontraron que las bandas de esta enzima en geles de poliacrilamida, se tifican también con técnicas para detectar carbohidratos, demostraron que el carbohidrato presente en mayor proporción es manosa mediante una hidrólisis ácida y posterior cromatografía en papel de la enzima purificada y confirmaron el carácter manoglicoproteico de la enzima al demostrar que la Concavallina A elimina totalmente la actividad.

Siendo la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F una glicoproteína^{36,37}, es posible entrecruzarla utilizando ácido adipico dihidrazida (AAD), previa oxidación con periodato de sodio.

3.4.2.1 FUNDAMENTO

El fundamento de este protocolo se ilustra en la Figura 6 y como se puede apreciar, se lleva a cabo en dos pasos. El primero, consiste en una etapa de "activación", en el que las cadenas laterales de carbohidratos de la proteína se someten a la oxidación con periodato de sodio, de tal manera que se producen carbonilos que son susceptibles, en el siguiente paso, de llevar a cabo la reacción de "entrecruzamiento", mediante la unión con los grupos dihidrazida. La técnica ha sido reportada con anterioridad en la literatura para el entrecruzamiento de varias glicoproteínas.^{36, 37, 38}. Inclusive, es posible aprovechar las cadenas laterales de las glicoproteínas para inmovilizarlas³⁹.

No se descarta la posibilidad de que la dextrana endógena, aquella que no fué removida en la purificación, se pueda unir covalentemente a las cadenas laterales de la enzima logrando así un entrecruzamiento que podría estabilizar a la enzima.

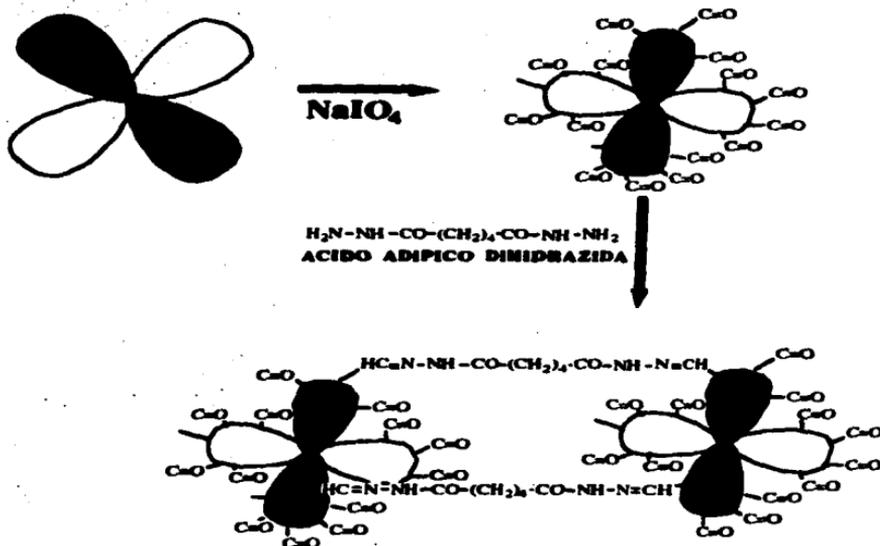


Figura 6.- Esquema del entrecruzamiento intermolecular de proteínas via las cadenas laterales de carbohidratos utilizando ácido adipico dihidrazida.

3.4.2.2 PROTOCOLO

Durante el desarrollo del proyecto, las condiciones de la derivatización de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F se perfeccionó de manera que, como se describe en la sección de Resultados y Discusión, con cada "mejora" al proceso, se logró obtener un derivado más estable, además de resolver problemas asociados a la baja concentración en la que se obtuvo el derivado como consecuencia de la dilución de la actividad.

I

✓ DERIVATIZACION DEL CONCENTRADO CON 0.2 M DE ACIDO ADIPICO DIHIDRAZIDA

- 1.- Oxidar en frío y en la obscuridad 5 mL de extracto enzimático 2.5 U/mL con 0.01 M de periodato de sodio durante 24 horas.
- 2.- Después de transcurridas las 24 horas, se agregan 2.5 mL de una solución de bisulfito de sodio 0.4 M. (de este modo el bisulfito queda en exceso contra el periodato en la reacción).
- 3.- Dializar toda la noche en frío contra amortiguador en bolsas con un corte de 12,000 a 14,000.
- 4.- Agregar 2.5 mL de solución de AAD 1.0 M (para lograr 0.2 M) e incubar por 4 horas temperatura ambiente.
- 5.- Dializar en frío contra amortiguador durante toda la noche en bolsas con un corte de 12,000 a 14,000.
- 6.- A este derivado se le denomina DXSAAD-1.

II

✓ DERIVATIZACION EN "SECO" CON ACIDO ADIPICO DIHIDRAZIDA 0.2 M.

Se denomina "en seco" ya que los reactivos se agregan en polvo y no en solución, con el objeto de no diluir la actividad enzimática.

- 1.- Utilizando como base 20 mL de extracto enzimático.
- 2.- Oxidar con 0.0428g de periodato (0.01 M) por 24 h a 4 °C y en la obscuridad.
- 3.- Parar la reacción con 0.2521g de sulfito (0.1 M). Dializar inmediatamente a 4 °C contra amortiguador en bolsas con un corte de 12,000 a 14,000.
- 4.- Agregar 0.6968g de AAD (0.2 M) dejando reaccionar 6 horas a 4 °C.
- 5.- Dializar vs. amortiguador pH= 5.2 en bolsas con un corte de 12,000 a 14,000.
- 6.- A este derivado se le denomina DXSAAD-2.

3.4.3 ACOPLAMIENTO CON DEXTRANA

La simple adición de dextrana u otros polímeros a una solución de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F es suficiente para lograr una relativa estabilización^{40,41}. Existen además, ejemplos en la literatura en los que la estabilización térmica es lograda por medio de acoplamiento vía enlace covalente entre polímeros de alto peso molecular y las enzimas^{42, 43, 44}.

3.4.3.1 FUNDAMENTO

El acoplamiento se logra por medio de una reacción de alquilación reductiva entre los grupos carbonilo, generados en la oxidación de las manosas u otros azúcares laterales de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, con los grupos amino, introducidos en la dextrana de alto peso molecular por medio de una oxidación con periodato de sodio, similar a la descrita anteriormente, y una alquilación reductiva utilizando etilendiamina. El proceso se ilustra en la Figura 7.

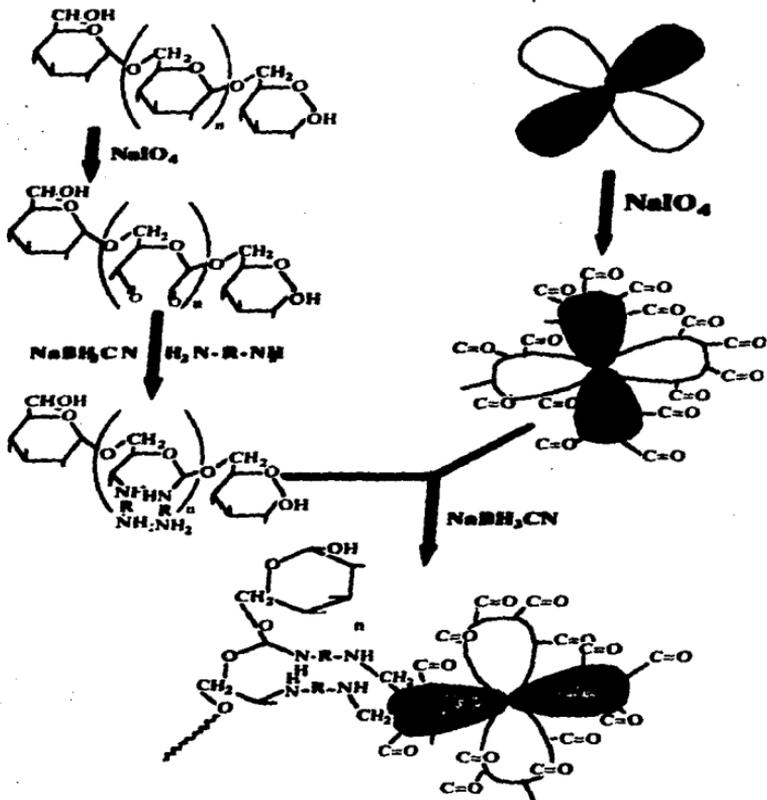


Figura 7.- Esquema de la derivatización y acoplamiento de la dextransacarosa con dextrana de alto peso molecular.

3.4.3.2 PROTOCOLO

Para evitar pérdida de actividad debida a los cambios de pH así como la naturaleza de las reacciones involucradas en la derivatización, se desarrolló el siguiente protocolo de derivatización y acoplamiento.

1.-AMINACION DE LA DEXTRANA DE ALTO PESO MOLECULAR.**a)OXIDACION CON PERIODATO PARA GENERAR GRUPOS CARBONILO.**

- 1.- A una solución de dextrana 50 mg/mL (PHARMACIA) con un alto peso molecular (2,000,000), agregar periodato de sodio hasta una concentración de 0.3M.
- 2.- Agitar en la obscuridad durante 3 horas a temperatura ambiente.
- 3.- Dializar contra agua destilada en bolsas con un corte en 12,000 a 14,000 (4 recambios de 1 L cada uno).

b)ALQUILACION REDUCTIVA UTILIZANDO ETILENDIAMINA.

- 1.- Pesar 0.125 g de cianoborohidruro de sodio.
- 2.- Añadir 20 mL de la solución de dextrana oxidada.
- 3.- Añadir 0.3 mL de etilendiamina de modo que se tenga una concentración final de 0.1 M de cianoborohidruro y 0.2 M de etilendiamina.
- 4.- Dializar contra agua destilada toda la noche.
- 5.- Dializar contra amortiguador pH=5.2

11.-GENERACION DE GRUPOS CARBONILO EN LAS CADENAS LATERALES DE AZUCAR EN LA DEXTRANSACARASA.

- 1.- Utilizando como base 20 mL de solución de enzima (1mg/mL de proteína).
- 2.- Oxidar con 0.0428 g de periodato (0.01 M) por 24 h a 4 °C y en la obscuridad.
- 3.- Parar la reacción con 0.3521 g de sulfito (0.1 M). Dializar inmediatamente a 4 °C.
- 4.- Dializar vs. amortiguador pH= 5.2

III.-ACOPLAMIENTO.

- 1.- A 0.0628 g de cianoborohidruro de sodio:
- 2.- Agregar 5 mL de la solución de dextrana aminada (25 mg/mL).
- 3.- Agregar 5 mL de la solución de enzima oxidada. (1mg/mL).
- 4.- Dejar la reacción 24 horas a 4 °C. agitando.
- 5.- Agregar 0.9 g de fructosa (0.5 M.) y dejar la reacción por otras 24 horas a 4 °C.
- 6.- Dializar contra amortiguador pH=5.2.

Para poder asegurar la interacción entre los aminos de la dextrana aminada y los carbonilos de los azúcares oxidados de la enzima, es necesario contar con un extracto enzimático que tenga la menor cantidad posible de dextrana (dextrana endógena), para evitar reacciones entre la dextrana aminada (exógena) y los carbonilos que se generarían en la dextrana endógena durante la oxidación con periodato de sodio.

La adición de fructosa en el acoplamiento, asegura que todos los grupos amino de la dextrana exógena reaccionen, evitando de esta manera interferencias durante la caracterización cinética del derivado, ya que estos grupos amino son capaces de reaccionar con la fructosa que se libera en la reacción enzimática.

3.5 TECNICAS DE ANALISIS DE AZUCARES Y OLIGOSACARIDOS

A continuación se presentan las condiciones de reacción y la metodología empleada para la caracterización cinética de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F y sus derivados.

3.5.1 PERFIL DE OLIGOSACARIDOS

Como ya se mencionó en los antecedentes, la dextranasa es capaz de producir oligosacáridos utilizando diferentes azúcares como aceptores. La maltosa es considerada como un aceptor fuerte, es decir, capaz de desviar significativamente la síntesis de dextrana hacia la formación de oligosacáridos. Es posible comparar la especificidad, en términos del perfil de oligosacáridos (tipo y cantidad) que, en condiciones similares, produzcan los diferentes derivados con la enzima sin derivatizar.

✓ REACCION DE FORMACION DE OLIGOSACARIDOS UTILIZANDO MALTOSA COMO ACEPTOR

Para poder comparar la especificidad de los derivados con la enzima sin derivatizar es necesario fijar las condiciones de reacción en cuanto a la cantidad y proporción de sacarosa/maltosa, la actividad volumétrica, el pH y la temperatura.

En este estudio las reacciones de aceptor se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

Concentración de sustratos:

Sacarosa 300 g/l

Maltosa 100 g/l

Concentración de enzima o del

derivado: 1 U/mL

Temperatura : 30 °C. pH: 5.2.

✓ DETERMINACION DEL PERFIL DE OLIGOSACARIDOS POR HPLC.

El análisis de los oligosacáridos se llevó a cabo mediante una cromatografía de fase reversa o inversa, en la que la fase móvil (agua) es mucho más polar que la fase estacionaria, de modo que los diferentes compuestos eluyen de acuerdo a su polaridad, eluyendo primero los más polares.

Los parámetros y condiciones para la determinación del perfil de oligosacáridos son las siguientes:

COLUMNA: mBONDAPAK™C₁₈.
FASE MOVIL: AGUA.
FLUJO: 0.7 mL/min.
DETECTOR Índice de refracción.
Sensibilidad 64:
Volumen inyectado: 10 µL (1:50)

3.5.2 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

Siguiendo con el estudio cinético, es necesaria la cuantificación de los carbohidratos que intervienen en la reacción: la sacarosa como sustrato y la fructosa y glucosa como productos de la transferencia y de la hidrólisis respectivamente. En las reacciones de aceptor, es posible cuantificar maltosa. El análisis de estos resultados, nos da una opción mas para comparar las especificidades de la enzima y sus derivados.

✓ CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR HPLC.

La cuantificación de los carbohidratos se llevó a cabo mediante una cromatografía de fase reversa, en la que la fase móvil (acetonitrilo-agua) es mucho mas polar que la fase estacionaria, de modo que los diferentes compuestos eluyen de acuerdo a su polaridad, eluyendo primero los mas polares. Integrando los picos de respuesta de cada compuesto y comparándolos con la curva patrón de una mezcla realizada en las mismas condiciones se puede tener de manera cuantitativa las cantidades de los diferentes compuestos.

Los parámetros y las condiciones para la cuantificación de carbohidratos mediante HPLC se describen a continuación:

COLUMNA: mBONDAPAK™NH₂.
FASE MOVIL: ACETONITRILLO:AGUA. 80:20
FLUJO: 1.4 mL/min.
DETECTOR: Índice de refracción.
Sensibilidad: 16.
Volumen inyectado: 10 µL (1:50)

3.5.3 PESO MOLECULAR DE LAS DEXTRANAS PRODUCIDAS

Otro parámetro para comparar la especificidad de la enzima y sus derivados es el peso molecular de las dextranas producidas en una reacción con sacarosa. Una diferencia en el tamaño promedio de las dextranas producidas indicaría una posible alteración de la catálisis debida probablemente a un impedimento estérco.

En este estudio las reacciones de formación de dextrana se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

Concentración de sustrato:
Sacarosa 300 g/l
Concentración de enzima o del
derivado: 1 U/mL
Temperatura: 30°C.
pH: 5.2.

✓ ANALISIS DEL PESO MOLECULAR DE LAS DEXTRANAS

Para analizar el perfil de las dextranas producidas se llevo a cabo una cromatografía de permeación en gel en la que los compuestos son separados de acuerdo a su peso molecular, de modo que los mas grandes eluyen antes que los mas pequeños.

Los parámetros y las condiciones para el análisis del peso molecular de las dextranas producidas por la dextranasa y sus derivados son:

COLUMNA: SEC 4000.

FASE MOVIL : AGUA.

FLUJO: 1.0 ml/min.

DETECTOR Índice de refracción.

Sensibilidad: 64.

Volumen inyectado: 50 μ L

3.5.4 PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS

Con el objeto de determinar si el entrecruzamiento logrado con el AAD es intra o intermolecular, se hace pasar las muestras de la dextranasa y de sus derivados con AAD por una columna de permeación en gel. Esto permite observar diferencias en el patrón de elución de las proteínas de modo que, si se forman agregados intermoleculares habrá formas de alto peso molecular que eluirán antes que las formas que no se entrecruzaron.

✓ ANALISIS DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS

La determinación se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes. En estas condiciones, las interacciones no covalentes entre la dextrana y la proteína se pierden, dejando en evidencia el peso molecular "real" de las proteínas, además de aportar evidencia de una posible interacción covalente entre la dextrana endógena y las cadenas laterales de la dextranasa.

✓ CONDICIONES DESNATURALIZANTES (0.5% DE SDS).

Muestras del extracto enzimático y del derivado fueron hervidas por 15 minutos en presencia de 0.5% de SDS y luego, inyectadas a la columna utilizando como fase móvil agua con 0.5% de SDS.

COLUMNA: SEC 4000.

FASE MOVIL : AGUA CON 0.5% SDS

FLUJO: 1.0 mL/min.

DETECTOR U.V.

LONGITUD DE ONDA: 280 nm.

Volumen inyectado: 25 μ L (25 μ g)

3.5.5 CONFIRMACION DE LA FORMACION DE DEXTRANA

Debido a que el derivado del acoplamiento con dextrana de alto peso molecular presentó una alta liberación de glucosa al medio de reacción cuando se hacía reaccionar con sacarosa, se diseñó este experimento que busca evidencias de la formación de dextrana. En este experimento, la adición de dextranasa debía liberar isomaltosa proveniente de la dextrana que se produjese en una reacción del derivado con sacarosa.

Se siguieron varios puntos de la reacción con sacarosa:

- 1.- Tomar 83 μ L del tiempo 0, 3, 6, y 20 horas de la reacción con sacarosa del derivado y llevarlos a 1 mL con amortiguador de fosfatos a pH de 6.
- 2.- Agregar a cada muestra dextranasa pura hasta 1U/mL y dejar incubando a 35°C, durante 6 horas e inactivando después cada una hirviendo durante 15 minutos.
- 3.- Analizar las muestras en el HPLC para observar si existe la formación de isomaltosa.

3.5.6 EFECTO DE LA DEXTRANA EXOGENA EN LA ESPECIFICIDAD

Se ha reportado que la dextrana inicial adicionada (exógena) en las reacción con sacarosa de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F es capaz de modificar la especificidad en términos de la cantidad de transferencia que la enzima lleva a cabo.^{40,43}

CONDICIONES DE REACCIÓN:

Concentración de sustratos:

Sacarosa	100 g/l
Dextrana**	100 g/l

Concentración de enzima o del

derivado: 1 U/mL

Temperatura : 30 °C. pH: 5.2.

Tiempo de reacción: 24 horas.

**Al mismo tiempo, se realizaron reacciones que solo contenían Sacarosa, de manera que sirvieran de "blanco".

Transcurrido el tiempo de reacción, se toman alícuotas y se analizan en el HPLC para calcular la relación entre la hidrólisis y la transferencia en presencia y en ausencia de dextrana exógena.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Para llevar a cabo las reacciones químicas involucradas en la modificación de la dextranasa es necesario contar con un extracto enzimático con una alta actividad específica, una alta actividad volumétrica (unidades de actividad por unidad de volumen de extracto) y un bajo contenido de dextrana. La dextrana puede interferir, como se detallará mas adelante al describir cada una de las modificaciones, con algunas de las reacciones químicas. Tal es el caso de la oxidación y el entrecruzamiento con ácido ádicico dihidrazida, pudiendo en algunos casos consumir prácticamente todo el reactivo y hacerlo inaccesible para modificar a las moléculas de la enzima.

Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, durante el desarrollo del proyecto, el proceso de purificación de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F se modificó paulatinamente de manera que, como describe en la siguiente serie de tablas, se logró reducir la cantidad de dextrana proveniente de la fermentación, aumentando la actividad volumétrica y específica del extracto final.

Tabla VI.- Purificación de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F mediante los diferentes protocolos descritos en Materiales y Métodos.

I

Muestra	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Act. esp. (U/mg)	Act. total (U)	%Act. Rec
Sobrenadante	900	0.52	-	-	260.27	100
Extracto	90	2.52	0.41	6.15	228.12	87.65

II

Muestra	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Act. esp. (U/mg)	Act. total (U)	%Act. Rec
Sobrenadante	950	0.42	3.55	0.12	398.68	100
Extracto	150	2.05	0.34	5.95	307.68	77.29

Muestra	Volumen (ml)	Dextrana (mg/ml)	Act.dxna. (U/mgd)	Dxna total (mg)	%dex. Rem
Sobrenadante	950	7.12	0.06	6760.86	100
Extracto	150	12.68	0.16	1902	28.13

III

Muestra	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Act. esp. (U/mg)	Act. total (U)	%Act. Rec
Sobrenadante	1000	0.54	2.41	0.22	514.26	100
Extracto	52	2.27	0.08	27.05	118.00	22.95

Muestra	Volumen (ml)	Dextrana (mg/ml)	Act.dxna. (U/mgd)	Dxna total (mg)	%dex. Rem
Sobrenadante	1000	4.82	0.1065	4828.4	100
Extracto	52	9.62	0.2355	501.1	10.92

IV

Muestra	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Act. esp. (U/mg)	Act. total (U)	%Act. Rec
Sobrenadante	900	0.28	4.70	0.06	255.51	100
Extracto	115	1.00	0.15	6.68	115.31	45.12
Liofilizado	13	6.10	1.26	4.47	79.3	31.04

Muestra	Volumen (ml)	Dextrana (mg/ml)	Act.dxna. (U/mgd)	Dxnatotal (mg)	%dex. Rem
Sobrenadante	900	4.95	0.06	4.454	100
Extracto	115	7.28	0.14	837.48	18.8

Rec.- Recuperada. Rem.-Residual. Act. esp.-Actividad específica (por unidad de proteína). Act.dxna.-Actividad específica (por unidad de dextrana).

El extracto final IV de la tabla VI tiene una menor actividad volumétrica y también una menor relación Actividad/Dextrana que el extracto final III en la misma tabla. Esto se debe únicamente a que la actividad que se obtuvo en la fermentación es casi el 50% menor. Nótese que el proceso de purificación no cambia, solo se añade el paso de liofilización previa adición de dextranasa para concentrar y convertir el "Extracto" en "Liofilizado" con el fin de concentrar la actividad volumétrica. (Ver Materiales y Métodos).

La importancia de presentar estos resultados es que los diferentes extractos sirvieron como materia prima para las distintas derivatizaciones químicas. Además, la experiencia acumulada con cada uno de los protocolos dió lugar a nuevas ideas para la purificación. Por otro lado, la caracterización del extracto enzimático, que sirve como materia prima, es fundamental para el análisis de los resultados de la derivatización.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA DEXTRANSACARASA EN TERMINOS DE SENSIBILIDAD A LOS REACTIVOS DE ACTIVACION

La activación de ciertos grupos funcionales de las enzimas es un paso obligado previo a la derivatización. Se probaron 2 métodos de activación para la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, como se describe en Materiales y Métodos. A continuación se presentan los resultados obtenidos en estos experimentos.

4.2.1 CARBODIIMIDA

En la Figura 8 se ilustra la sensibilidad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F a la acción de la EDC carbodiimida. La utilización de EDC para modificar químicamente a la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F ya había sido reportada en la literatura.⁵ En la referencia citada, el objetivo era modificar grupos funcionales en el sitio activo de la enzima activando con EDC y añadiendo un éster de glicina, en su estudio, reportan la labilidad de la actividad y el efecto protector de la sacarosa.

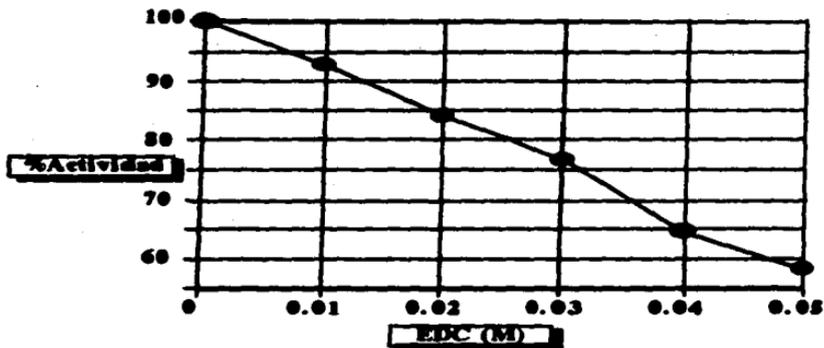


Figura 8.-Sensibilidad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F a la EDC. Se probaron las diferentes concentraciones de EDC manteniendo el tiempo de incubación constante (30 min a 4 °C). La reacción se detiene por dilución y diálisis. La actividad residual se determinó por DNS.

Es evidente de este resultado que la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F resulta ser muy sensible a la acción de las carbodilimidias. Esta labilidad puede deberse a que en el sitio activo de esta enzima existen uno o más grupos carboxilo. Es muy factible que estos grupos sean alcanzados y modificados por el EDC que es una molécula relativamente pequeña aún en presencia de la sacarosa, en consecuencia, la activación de los grupos carboxilo con carbodilimidias no es una buena estrategia para modificar químicamente esta enzima.

4.2.3 PERIODATO DE SODIO

Mediante una oxidación con periodato de sodio es posible generar grupos aldehído a partir de carbohidratos. Esta técnica ha sido utilizada en el análisis estructural de carbohidratos⁴⁶ así como en la modificación de dextranas⁴⁷.

En nuestro caso, resulta interesante utilizar esta reacción de oxidación para, en un caso, llevar a cabo un entrecruzamiento con ácido adípico dihidrazida, "activando" las cadenas laterales de manosa en la superficie de la dextranosa, y en otro caso, acoplar a la enzima con dextrana, para generar grupos dialdehído en ésta.

Ensayos preliminares de oxidación fueron realizados con una dextranosa purificada, con anterioridad a este trabajo, con el método de precipitación con polietilenglicol, descrito brevemente en las Generalidades. El extracto no mostró sensibilidad a concentraciones de periodato aún a 0.5M, ya que la concentración de dextrana es tan alta que consume todo el periodato sin dejar que éste afecte la actividad enzimática. De este modo, no puede asegurarse que el periodato haya reaccionado con las cadenas laterales de manosa. Así pues, fue necesario la implementación de protocolos de purificación que tuvieran por objeto contar con extractos enzimáticos con una bajo contenido de dextrana.

Contando con extractos enzimáticos con un bajo contenido de dextrana mediante la adición de dextranasa según se describe en el protocolo de purificación, la acción del periodato de sodio puede ser "medida" en cuanto a su capacidad de inactivar a la enzima. De esta forma, se considera que la oxidación de las cadenas laterales de manosa de la dextranosa solo puede darse en la medida que se tiene el suficiente reactivo para que además de afectar a estas cadenas, se afecte también la actividad de la enzima.

En la Tabla VII se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de oxidación de tres experimentos independientes, utilizando el mismo extracto enzimático obtenido con el protocolo de purificación "I". En seguida, en la Figura 9, se grafica el promedio de esos datos y la desviación estándar para cada punto.

Tabla VII.- SENSIBILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* NRRL B-512F AL PERIODATO DE SODIO. (Datos de tres experimentos independientes)

NaIO ₄ (M)	% Act.	% Act.	% Act.
0	100	100	100
0.01	59.18	69.87	83.25
0.02	25.12	20.62	37.56
0.03	17.68	15.00	23.94
0.04	16.57	15.31	24.41

El 100% corresponde a la enzima con 6.15 U/mg de proteína.

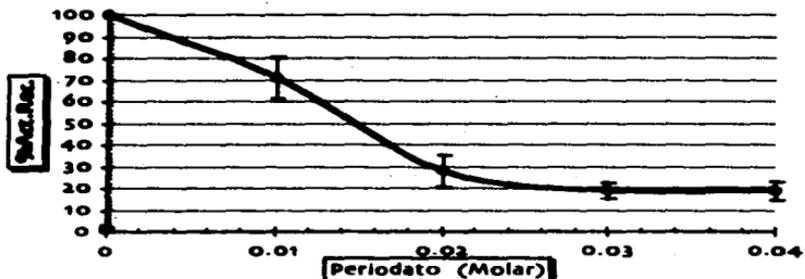


Figura 9.- Susceptibilidad de la actividad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F a la acción de diferentes concentraciones de periodato de sodio a 4 °C y en la oscuridad por 24 horas.

Aún con la concentración más baja de periodato de sodio y en condiciones "suaves" (4 °C), la enzima pierde actividad, lo que asegura que las cadenas laterales fueron alcanzadas por el reactivo y que no solo la dextrana presente en el extracto es afectada.

4.3 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA DEXTRANSACARASA DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* NRRL B-512F.

Con el fin de caracterizar a la dextransacarasa y conocer su estabilidad a 40°C, se realizó la curva de desactivación de acuerdo con el protocolo en la sección de Materiales y Métodos

Los resultados se muestran en la Figura 10, donde puede observarse como la actividad que se recupera es menor mientras mas tiempo se incubaba la enzima a 40 °C. En la misma figura se puede apreciar el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) calculado a partir de estos datos.

El experimento se llevó a cabo por triplicado con el extracto enzimático obtenido con el protocolo de purificación "I" descrito en Materiales y Métodos.

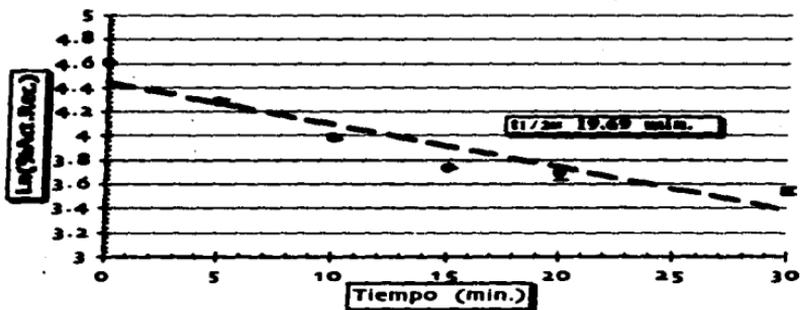


Figura 10.- Curva de desactivación térmica de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F a 40 °C.

Como podrá apreciarse cuando se discutan los resultados para los derivados, en todos los casos el $t_{1/2}$ para la enzima sin modificar (control) no varía mucho si se compara con este resultado. Lo que significa que aunque los extractos tienen menos dextrana, la cantidad removida no afecta la estabilidad de la enzima.

4.4 MODIFICACIONES QUIMICAS

4.4.1 ENTRECruzAMIENTO CON CARBODIIMIDAS

Debido a la gran labilidad de la dextranasa a la acción de este tipo de reactivos, el entrecruzamiento, aún en condiciones "suaves", es decir, agregando sacarosa para "proteger el sitio activo" y llevar a cabo la reacción a 4 °C, no fue posible obtener derivados que resultaran ser mas estables que la enzima original.

4.4.2 ENTRECruzAMIENTO CON ACIDO ADIPICO DIHIDRAZIDA (AAD).

Como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se emplearon dos protocolos de derivatización utilizando AAD para derivatizar la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. En la Tabla VIII se muestran los resultados de la prueba de actividad residual de los derivados obtenidos con el protocolo de derivatización "I". Llamaremos a este derivado DXSAAD-1. Por otro lado, en la Figura 11, se grafican los datos para comparar la diferencia en estabilidad. Cabe hacer notar que estos experimentos se llevaron a cabo con el extracto enzimático obtenido a partir del protocolo de purificación "II" descrito en la sección de Materiales y Métodos.

En este caso, el Control consiste en el extracto enzimático tratado de la misma forma que los derivados excepto que se omite la adición de AAD. En su lugar, se agregó al extracto oxidado y dializado un volumen igual de amortiguador de acetatos 0.05M a pH=5.2.

Estabilidad del derivado DXSAAD-1:

Tabla VIII.- RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ACTIVIDAD RESIDUAL DEL CONTROL Y DEL DERIVADO DXSAAD-1.

MUESTRA	% recuperado	U/ml Iniciales	U/ml recuperadas
Control	51.34	0.62	0.32
DXSAAD-1	67.13	0.47	0.31
MUESTRA	% recuperado	U/ml Iniciales	U/ml recuperadas
Control	45.02	0.64	0.29
DXSAAD-1	62.87	0.49	0.30
DXSAAD-1	61.07	0.54	0.33

Extracto enzimático (II) con 0.2 M de AAD según el protocolo de derivatización I.

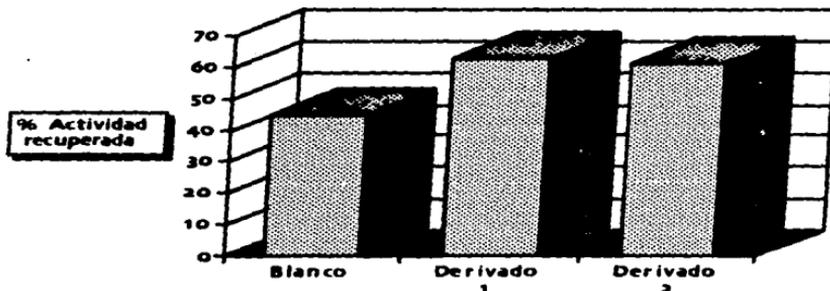


Figura 11.- Actividad residual del Blanco y los Derivados con AAD, según el protocolo I, (DXSAAD-1), del extracto enzimático obtenido a partir del protocolo de purificación II.

Como puede constatarse en la Figura 11, el derivado DXSAAD-1 retiene, en promedio, un 15% más de actividad que el Blanco cuando se incubaba a 40 °C durante 5 minutos.

Tomando como base la experiencia obtenida durante esta derivatización, se planteó un nuevo protocolo de derivatización con AAD (ver Materiales y Métodos) que arrojó los resultados que a continuación se presentan.

DERIVATIZACION EN "SECO" CON AAD 0.2 M.

El protocolo de derivatización II se aplicó a un nuevo extracto enzimático, que se obtuvo con el protocolo de purificación III. Ambos protocolos son descritos en la sección de Materiales y Métodos. A este derivado se le asignó la clave DXSAAD-2. Como se pudo constatar con anterioridad, el extracto enzimático III tiene una mayor actividad enzimática en relación con el contenido de dextrana, es decir, la actividad específica es mayor y el contenido de dextrana en mg/ml es menor. Esto se debe probablemente a la utilización de dextranasa de alta pureza en el protocolo en lugar del extracto crudo, que por lo visto es una enzima mucho menos eficiente.

En esta ocasión, debido a la experiencia con el derivado anterior, la prueba de actividad residual fue omitida y se realizó directamente la curva de desactivación a 40 °C, de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados de las tres derivatizaciones independientes realizadas se presentan en la Tabla IX en la que cada uno de los datos en las columnas es el promedio de dos determinaciones. De igual manera que para el caso anterior, el control consiste en el extracto enzimático tratado de la misma manera que el derivado excepto por la adición de AAD. Estos datos se grafican en la Figura 12.

Tabla IX.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD TERMICA A 40 °C DEL DERIVADO DXSAAD-2 Y EL CONTROL.

TIEMPO (min) 40°C	Actividad rec. (bco).	Actividad rec. (der).	Actividad rec. (bco).	Actividad rec. (der).	Actividad rec. (bco).	Actividad rec. (der).
0	100	100	100	100	100	100
5	66.68	67.69	69.35	72.25	73.62	74.71
10	52.84	56.58	49.36	64.04	54.98	60.44
15	38.77	50.75	44.43	59.89	nd	nd
30	34.61	47.12	38.74	48.09	41.76	52.52
30	26.17	42.62	32.80	37.47	37.85	54.04

Extracto Enzimatico (III) utilizando el protocolo de derivatización (II).
 nd.- No determinado. rec.- Recuperada.
 bco.- Control. der.- DXSAAD-2.

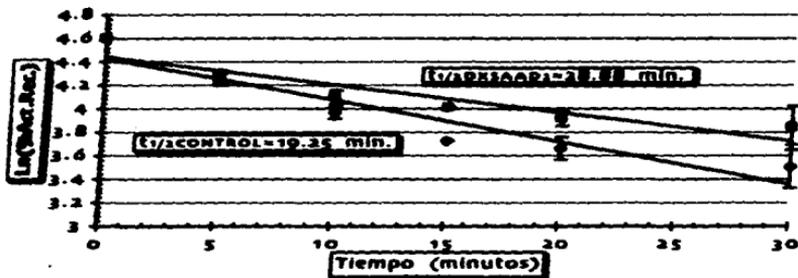


Figura 12.-Estabilidad del control (○) y los derivados DXSAAD-2 (■) obtenidos con AAD a partir del extracto enzimático (III) utilizando el protocolo de derivatización (II). Las líneas continuas representan el ajuste lineal para los datos donde el coeficiente de correlación para el control es 0.94 y para el derivado 0.92 y las pendientes -0.036 para el control y -0.024 para el derivado.

En la Figura 12, se grafican los promedios y las desviaciones estándar de los datos de la Tabla IX. Como puede apreciarse, el DXSAAD-2 es un 50% más estable que el control. Los datos del análisis de regresión lineal para el modelo de desactivación de primer orden también se presentan ahí y como se puede apreciar, se cuenta con una reproducibilidad aceptable de acuerdo con la desviación estándar (ver las barras de error). La baja correlación de los datos se discutirá cuando se analicen los resultados para el siguiente derivado (Figura 17).

4.4.2.2 PERFIL DE OLIGOSACARIDOS

En la Figura 13 se muestra un cromatograma comparativo del perfil de los oligosacáridos producidos durante una reacción de aceptores en presencia de maltosa (llevada a cabo según se describe en la sección de Materiales y Métodos), del extracto enzimático obtenido a partir del protocolo de purificación "II" y de su derivado con ácido adípico dihidrazida utilizando el protocolo de derivatización "I" DXSAAD-1 (ambos protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos).

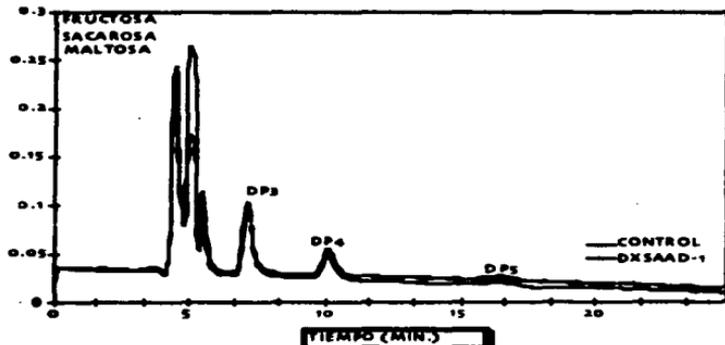


Figura 13.- Perfil de oligosacáridos producidos con maltosa como aceptor del extracto enzimático, que se obtuvo con el protocolo de purificación II (CONTROL) y el derivado de ácido adípico dihidrazida con el protocolo de derivatización I (DXSAAD-1).

Como puede apreciarse, prácticamente no existe diferencia en el perfil de los oligosacáridos producidos; ni aún en la cantidad relativa que de estos se produce. Con esto, se concluye que el entrecruzamiento con ácido adípico dihidrazida no afecta la especificidad de la dextran sacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Del mismo modo que para el derivado anterior, a continuación, en la Figura 14, se muestra la comparación del perfil de oligosacáridos producidos con el extracto enzimático "III"(CONTROL)-y el derivado con el protocolo "II" (DXSAAD-3).

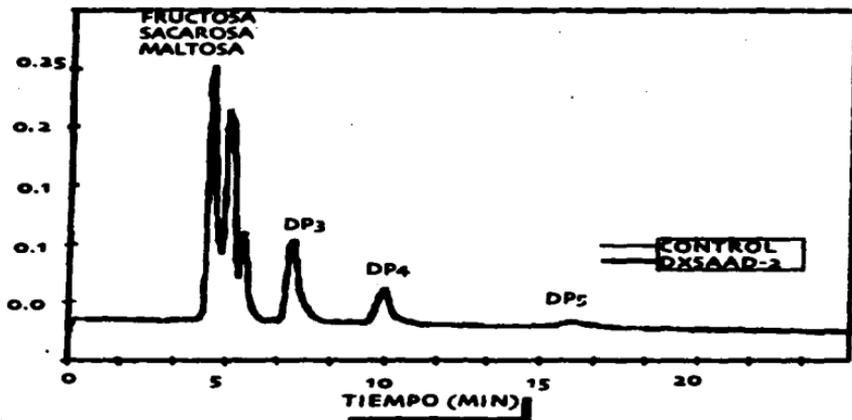


Figura 14.- Perfil de oligosacáridos producidos con maltosa como aceptor del extracto enzimático, que se obtuvo con el protocolo de purificación III(CONTROL) y el derivado de ácido adípico dihidrazida con el protocolo de derivatización II (DXSAAD-3).

El resultado es similar al obtenido para el derivado anterior, ya que el entrecruzamiento con ácido adípico dihidrazida no afecta la especificidad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F y tanto el extracto enzimático como el derivado producen el mismo perfil de oligosacáridos.

4.4.2.3 PERFIL DE LAS DEXTRANAS PRODUCIDAS

Otra prueba mas para comparar la especificidad de DXSAAD-2 es el perfil del peso molecular de las dextranas producidas durante una reacción con sacarosa (ver Materiales y Métodos). Una ves colectada, la muestra de las reacciones (blanco y derivado) se inactiva en un baño de agua hirviendo por 15 minutos. Enseguida, se diluye con agua destilada para tener la concentración apropiada de carbohidratos para el análisis. Como puede observarse en la Figura 15, el derivado tiende a hacer dextranas de mayor peso molecular, aunque la cantidad es relativamente pequeña, el pico se presentó de manera reproducible por el derivado y un pico similar nunca se obtuvo para el blanco.

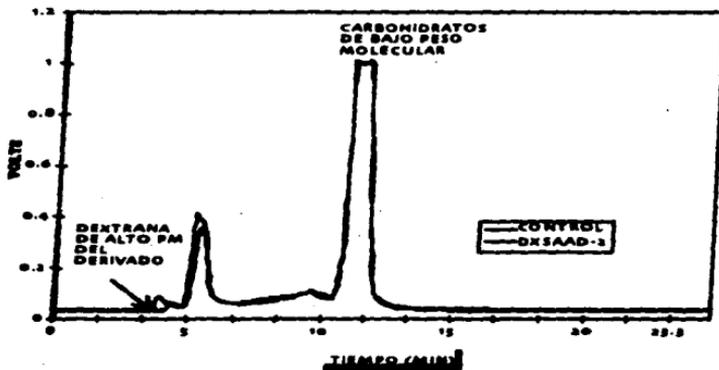


Figura 15.- Comparación del peso molecular de las dextranas producidas por DXSAAD-2 y el control del extracto enzimático (II).

La presencia de este pico en el cromatograma del derivado puede explicarse como la dextrana entrecruzada durante la derivatización.

4.4.2.4 PERFIL DE PROTEÍNAS

Este experimento se realizó con el objeto de determinar si el entrecruzamiento logrado con el AAD es intra o intermolecular. Consistió en hacer pasar muestras del extracto enzimático y de sus derivados con ácido adípico dihidrazida por una columna de permeación en gel. Esto permite observar diferencias en el patrón de elución de las proteínas, de modo que es posible observar si se forman agregados intermoleculares, ya que habría formas de alto peso molecular que eluirán antes que las formas que no se entrecruzaron. El resultado se muestra en la Figura 16.

4.4.2.4.1 CONDICIONES DESNATURALIZANTES

En la Figura 16 se muestra un cromatograma comparativo en el que se pueden observar diferencias en el perfil del peso molecular de las proteínas. En primer lugar, se observan formas de alto peso molecular del control y del derivado. Hay que hacer notar que la presencia de estos picos (los primeros en eluir) es mucho mayor en el derivado que en el blanco. Lo anterior nos habla de un posible entrecruzamiento entre la dextrana endógena y la enzima. La presencia de una pequeña señal de este pico en el control, se explica por la presencia de dextrana en el extracto ya que como se mencionó anteriormente la dextrana se encuentra fuertemente unida a la enzima en condiciones nativas. Además, Kobayashi⁴⁸ encontró que la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F tiende a formar agregados de alto peso molecular en presencia de dextrana, uniéndose fuertemente a ésta de manera que el peso molecular aparente de las proteínas varíe.

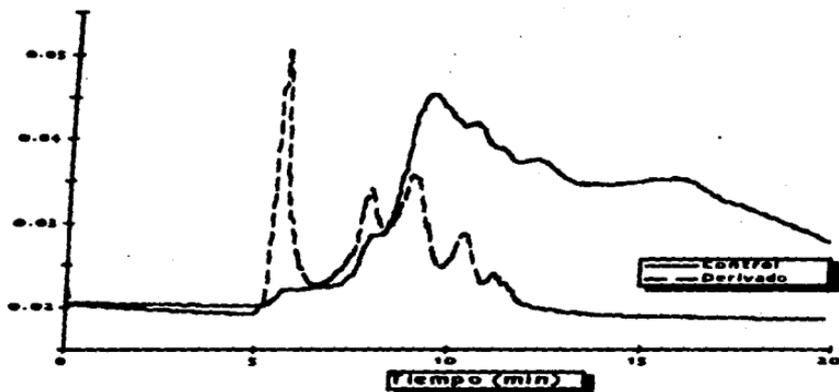


Figura 16.-Cromatograma del perfil de elución de proteínas del extracto enzimático (Control) y del derivado utilizando AAD en condiciones desnaturalizantes.

Los resultados anteriores confirman que la derivatización con AAD da lugar a formas de la enzima de mayor peso molecular que son resistentes a las condiciones desnaturalizantes, es decir, que la naturaleza de la unión entre la enzima y la dextrana endógena, o bien, el entrecruzamiento de dos o más moléculas de proteína es de tipo covalente.

4.4.3 ACOPLAMIENTO CON DEXTRANA DE ALTO PESO MOLECULAR

A continuación, se presentan los resultados de la caracterización de un segundo derivado de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Se trata de una enzima acoplada con dextrana de alto peso molecular. Como se mencionó en los antecedentes, el acoplamiento con polímeros ha sido una de las estrategias de modificación más exitosas para estabilizar a las enzimas. A este derivado se le denominará DXS-DEX.

Es necesario hacer notar que para esta derivatización se utilizó el extracto enzimático obtenido con el protocolo de purificación IV, descrito en la sección de Materiales y Métodos. Para la caracterización, el control consistió en el extracto enzimático (IV) tratado del mismo modo que el derivado, incluyendo la adición de periodato y de dextrana aminada, excepto por la adición de cianoborohidruro de sodio, lo que impide el acoplamiento entre la dextrana aminada y la enzima.

En la Tabla X se puede observar que la actividad de la enzima se va perdiendo durante la derivatización. Al final, sólo se recupera aproximadamente el 50% de la actividad inicial

Tabla X.-ACTIVIDAD DEL EXTRACTO ENZIMATICO (IV) RECUPERADA DURANTE LAS REACCIONES DEL ACOPLAMIENTO CON DEXTRANA DE ALTO PESO MOLECULAR.

MUESTRA	DILUCION	ACTIVIDAD (U/ml)	% Act. Recuperada
EXTRACTO (IV)	1:1 ¹⁰⁰	3.1	100
OXIDADA	1:1 ¹⁰⁰	2.9	93.5
DXS-DEX	1	1.60	51.6

¹⁰⁰Debido al protocolo de derivatización y para poder comparar la actividad fue necesario diluir 1:1 las muestras con la misma solución de dextrana aminada utilizada durante el acoplamiento.

4.4.3.1 CURVA DE DESACTIVACION

Al igual que para el derivado DXSAAD-2, la prueba de actividad residual fue omitida y se llevó a cabo directamente el estudio de desactivación. La justificación para omitir la prueba es que la cantidad de derivado con la que se cuenta es muy limitada.

En la Tabla XI se presentan los resultados obtenidos en dos derivatizaciones independientes realizadas. Cada uno de los datos en las columnas es el promedio de dos determinaciones. Estos datos se grafican igualmente en la Figura 17.

Tabla XI.-ESTUDIO DE ESTABILIDAD TERMICA A 40 °C DEL CONTROL Y DEL DERIVADO DXS-DEX.

TIEMPO (min) 40°C	%Actividad recuperada (bco).	%Actividad recuperada (der).	%Actividad recuperada (der).
0	100	100	100
5	nd	nd	86.85
10	53.82	87.19	85.25
15	nd	nd	83.42
20	43.69	84.61	80.22

nd.- No determinado.

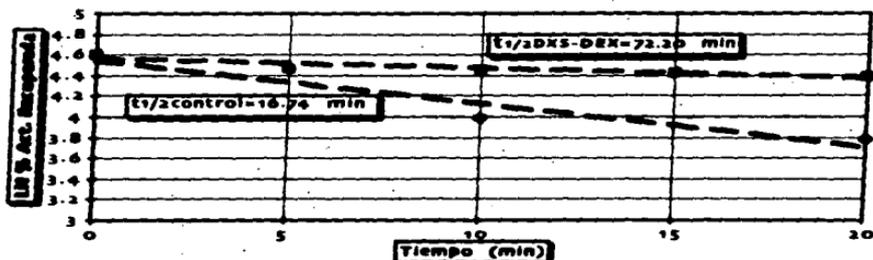


Figura 17.- Estabilidad del control (○) y el derivado DXS-DEX (■) obtenidos a partir del extracto enzimático (IV). Las líneas punteadas representan el ajuste lineal para los datos donde el coeficiente de correlación para el control es 0.96 y para el derivado 0.91 y las pendientes -0.041 para el control y -0.009 para el derivado.

En la Figura 17, se grafican los promedios de los datos de la Tabla XI. Como puede observarse, comparando los tiempos de vida media $t_{1/2}$, el derivado resulta ser más de 4 veces más estable que el control. Los valores del coeficiente de correlación pueden considerarse "bajos" y la desviación de los datos de desactivación con el modelo de primer orden puede deberse a que, el protocolo de derivatización no asegura que la totalidad de la enzima se haya modificado, de modo que el proceso de desactivación se observa en dos o más etapas. Es decir, durante los primeros minutos de incubación la pérdida de actividad observada podría provenir principalmente de la enzima que NO ESTA DERIVATIZADA, luego, en una segunda etapa de inactivación, la pérdida de actividad observada se debe a la inactivación del DERIVADO.

Lo que explicaría el hecho de que a los cinco minutos de incubación, el CONTROL y el DERIVADO DXSAAD, han perdido casi la misma actividad. (Ver Tabla IX y Figura 12).

4.4.3.2 PERFIL DE OLIGOSACARIDOS OBTENIDOS CON EL DERIVADO DXS-DER UTILIZANDO MALTOSA COMO ACEPTOR.

En la Figura 18, se muestra un cromatograma del perfil de los oligosacáridos, producidos durante una reacción de aceptores en presencia de maltosa, del derivado DXS-DEX. Las condiciones para la reacción de aceptor con maltosa, así como las condiciones del análisis cromatográfico se describen en la sección de Materiales y Métodos.

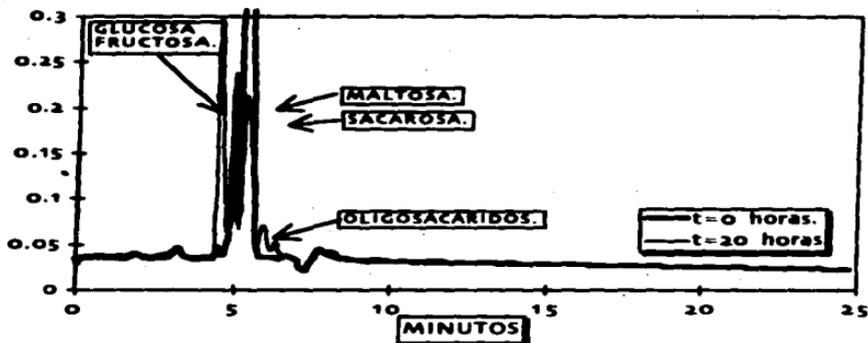


Figura 18.- Perfil de oligosacáridos producidos con maltosa como aceptor del derivado acoplado DXS con dextrana de alto peso molecular DXS-DEX.

Como se aprecia en el cromatograma, la producción de oligosacáridos es casi nula, lo que indica que la especificidad de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F ha sido afectada por la derivatización. Es necesario hacer notar que en el caso del control, la producción de oligosacáridos es muy similar a la obtenida en los experimentos anteriores.

Resulta pues interesante ahondar en la caracterización de este derivado en términos de su especificidad. A continuación, se muestran los resultados derivados de esa caracterización.

4.4.3.3 PRODUCCION DE DEXTRANA

Quedó claro que el derivado prácticamente no produce oligosacáridos. Sin embargo, no podemos decir que toda la sacarosa consumida haya sido utilizada para la síntesis de dextrana. Para verificar si el derivado produce dextrana, la alternativa más simple, es agregar dextranasa para poder determinar isomaltosa que es el producto de la degradación de la dextrana.

En la Figura 19, se muestra un cromatograma comparativo en el que se observa como la reacción de la dextranasa avanza consumiendo sacarosa, produciendo fructosa y glucosa. Por otro lado, al parecer, no hay producción de dextrana, ya que no existen rastros de isomaltosa. Lo que resulta raro en este cromatograma es que la dextranasa fué incapaz siquiera de degradar la dextrana endógena, lo que resultaría en la producción de isomaltosa en el tiempo cero de la reacción de la dextranasa con sacarosa. En un experimento posterior (no mostrado), se comprobó que la dextranasa no hidroliza a la dextrana aminada. Esto podría explicar la ausencia de isomaltosa, ya que en el derivado existe una gran cantidad de dextrana aminada que podría inhibir la acción de la dextranasa.

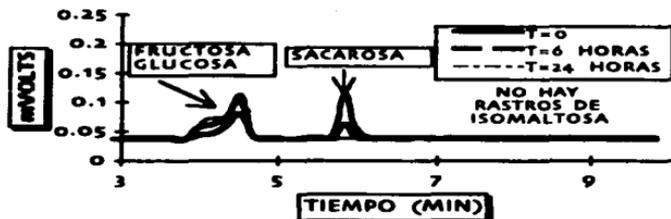


Figura 19.- Reacción con dextranasa. Alicuotas de la reacción de la dextranasa con sacarosa, son expuestas a la acción de la dextranasa por 24 h a 35 °C y pH=6.

Por lo anterior, no es posible verificar la formación de dextrana mediante la adición de dextranasa, por lo que otras estrategias para cuantificar la hidrólisis y la transferencia deben ser utilizadas.

4.4.3.4 EFECTO DE LA DEXTRANA EXOGENA

Se cuantificaron por HPLC los productos de la reacción con sacarosa del control y del derivado DXS-DEX y se calcularon los niveles de hidrólisis y de transferencia como sigue:

$$\% \text{HIDROLISIS} = \left(\frac{\text{GLUCOSA LIBRE}}{\text{SACAROSA CONSUMIDA}} \right) \times 100$$

$$\% \text{TRANSFERENCIA} = 100 - \% \text{HIDROLISIS}$$

Las reacciones se llevaron a cabo como se especifica en Materiales y Métodos y los resultados se presentan en la Tabla XII.

Tabla XII.- Efecto de la adición de dextrana sobre los niveles de hidrólisis de sacarosa y de transferencia a dextrana del control y del derivado DXS-DER.

REACCIÓN (1 U/mL)	%HIDROLISIS (GLU/SAC*100)	%TRANSFERENCIA (POR DIFERENCIA)
BLANCO SIN DEXTRANA	51.6	48.4
BLANCO CON DEXTRANA	28.72	71.28
DERIVADO SIN DEXTRANA	81.79	18.21
DERIVADO CON DEXTRANA	21.69	78.31

Tanto el blanco como el derivado en ausencia de dextrana exógena presentan un alto porcentaje de hidrólisis. Este cambio en la especificidad puede explicarse considerando que la dextransacarasa es incapaz de desplazar la dextrana aminada (añadida durante la derivatización) o la dextrana oxidada (generada en la oxidación) observándose un efecto de impedimento. Sin embargo, añadiendo dextrana a la reacción, los niveles de transferencia para ambos se recuperan hasta niveles similares, una explicación puede ser que la dextrana exógena desplaza a las otras dos formas de dextrana devolviendo a la enzima la capacidad de transferir.

4.4.3.5 ESTABILIDAD A LARGO PLAZO.

Con el fin de comprobar si el acoplamiento de la dextrana aminada se llevó a cabo sobre las cadenas laterales de la enzima, o bien, sobre la dextrana endógena oxidada unida a ella, se realizó la siguiente prueba, que consistió en comprobar que el derivado mantuviera su estabilidad a la temperatura después de una reacción de síntesis de dextrana. Esto ante la posibilidad de que la enzima intercambie o desplace dextrana aminada durante la reacción dando como resultado la pérdida de la estabilidad.

Así pues, se llevó a cabo una reacción con sacarosa EN PRESENCIA DE DEXTRANA EXÓGENA para favorecer la síntesis de dextrana. Las condiciones para estas reacciones son las mismas que para los experimentos anteriores y se describen en la sección de Materiales y Métodos. Si después de sintetizar dextrana, el derivado pierde su estabilidad, entonces el acoplamiento de la dextrana aminada se dió solo en la dextrana endógena que es "desplazada" por al dextrana que se forma durante la reacción. En cambio, si la estabilidad se conserva, entonces el acoplamiento se la dextrana aminada es probable que se haya dado con las cadenas laterales de la enzima.

A continuación se presentan los resultados a manera de comparación:

Tabla XIII.- Comparación de la estabilidad del derivado DXS-DER antes y después de una reacción de síntesis de dextrana.

TIEMPO DE INCUBACIONA 40 °C	% ACTIVIDAD RECUPERADA	
	DERIVADO (antes de la reacción)	DERIVADO (después de la reacción)
0 MINUTOS	100	100
5 MINUTOS	86.85	86.74
10 MINUTOS	85.25	85.35
15 MINUTOS	83.42	83.38
20 MINUTOS	80.22	80.29

El tiempo de vida media calculado a partir de estos datos para el derivado antes de la reacción con sacarosa es 72.03 minutos, mientras que para el derivado después de la reacción con sacarosa es de 72.41 minutos, mientras que el control, como se definió en la Figura 17 es de 16.7 minutos. De este modo, queda demostrado que la estabilidad de este derivado no es transitoria y que durante la reacción de síntesis de dextrana, la enzima no intercambia la dextrana acoplada a ella y que le brinda estabilidad.

V. CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrolló un protocolo de purificación sencillo con el que es posible obtener extractos enzimáticos con una alta actividad específica y un bajo contenido de dextrana.
- 2.- Se desarrolló un protocolo de derivatización utilizando 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC) para la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. La enzima mostró una alta sensibilidad a este reactivo aún en presencia de sacarosa, esto debido a que en el sitio catalítico existen grupos carboxilos susceptibles de ser modificados por la EDC, por lo que no fue posible obtener derivados estables con este método.
- 3.- Se desarrolló un protocolo de derivatización para la enzima utilizando ácido adípico dihidrazida (AAD) con el que es posible obtener un derivado (DXSAAD-2) que demostró tener un $t_{1/2}$ de 28.88 minutos a 40°C, es decir, 1.5 veces mayor el control.
- 4.- La especificidad de DXSAAD-2 no varía con respecto a la enzima sin modificar en cuanto a su capacidad de formar oligosacáridos con maltosa. Tampoco, se observan cambios al comparar el perfil del peso molecular de las dextranas que produce en las mismas condiciones.
- 5.- Se demostró mediante un cromatografía de permeación en gel, que el derivado DXSAAD-2 a diferencia del control, presenta formas de alto peso molecular debidas posiblemente al entrecruzamiento entre moléculas de la enzima y moléculas de dextrana endógena o bien a un entrecruzamiento entre dos o mas moléculas de enzima.
- 6.- Se desarrolló un protocolo para el acoplamiento entre la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F y dextrana de alto peso molecular, con el que se obtuvo el derivado DXS-DEX que demostró tener un $t_{1/2}$ de 72.20 minutos a 40°C, es decir, mas de cuatro veces mayor que el control.

- 7.- La especificidad del derivado DXS-DEX es distinta a la de la enzima sin modificar. A diferencia de ésta, el derivado practicamente no produce oligosacáridos con maltosa.
- 8.- Por otro lado, la derivatización afecta la especificidad de tal manera que el derivado hidroliza el 80% de la sacarosa que reacciona, sin embargo, la actividad transferasa se recupera si se añade dextrana a la reacción.
- 9.- Se comprobó que los efectos de la derivatización sobre la estabilidad y la especificidad del derivado DXS-DEX no se pierden luego de una reacción de formación de dextrana, lo cual indica que es probable que el acoplamiento se haya dado con los azúcares de las cadenas laterales de la enzima de manera covalente.

Como conclusión general podemos establecer que la estabilidad de la dextranacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F puede incrementarse mediante la modificación química de su estructura glicolítica. Hasta la fecha, todo intento por estabilizar esta enzima habia sido infructuoso. Así pues, los resultados de este trabajo sirven como base para futuras derivatizaciones de modo que los derivados que se obtengan puedan ser incorporados en un proceso industrial.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ¹ JANECEK S. "Strategies for obtaining Stable Enzymes" (Review). 1993. *Process Biochemistry* 28 435-445.
- ² Ó FÁGÁIN C. "Understanding and increasing protein stability" (Review). 1995. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1252 1-14.
- ³ ROBYT J.F. 1986 "Dextran" En. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Vol. 4 2nd edición. John Wiley & Sons, Inc. N.York. E.U.A. 752-767.
- ⁴ CASTILLO E., ITURBE F., LOPEZ-MUNGUÍA A., PELEC V., PAUL F., MONSAN P. 1992 "Dextran and oligosaccharide production with glucosyltransferases from different strains of *Leuconostoc mesenteroides*". *Annals of the New York Academy of Science*. 672 425-430.
- ⁵ ROBYT J.F., WALSETH T.F. 1979.- "Production, purification and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". *Carbohydrate Research*. 68 95-111.
- ⁶ MILLER A.W., EKLUND S.H., ROBYT J.F.- 1986. "Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". *Carbohydrate Research*. 147 119-133.
- ⁷ FU D. RIBYT J.F. 1990. "A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase". *Preparative biochemistry* 20(2) 93-106
- ⁸ LOPEZ-MUNGUÍA A. 1979. "Production purification et immobilisation de la dextransaccharase de *Leuconostoc mesenteroides*". Tesis doctoral. Presentada en: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- ⁹ KOBAYASHI M., MATSUDA K. (1980). "Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". *Biochimica et Biophysica Acta*. 614 46-62.
- ¹⁰ MILLER A.W., ROBYT J.F. 1986 "Functional molecular structure of dextransucrase by radiation inactivation and gel electrophoresis" *Biochimica et Biophysica Acta*. 870 198-203.
- ¹¹ KIM D., ROBYT J.F. 1994 "Properties of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512FMC constitutive dextransucrase" *Enzyme and Microbial Technology*. 16 1010-1015.
- ¹² KIM D., ROBYT J.F. 1994. "Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases". *Enzyme and Microbial Technology*. 16 659-664.

- ¹³ MIZUTANI N., YAMADA M., TAKAYAMA K., SHODA M. 1994 "Constitutive mutants from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". *Journal of fermentation and Bioengineering*. 77 (3) 248-251.
- ¹⁴ B. VAN DEN BURG, B. W. DIJKSTRA, G. VRIEND, B. VAN DER VINNE, G. VENEMA & V. G. EIJSINK 1994 "Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface". *European Journal of Biochemistry*. 220: 981-5.
- ¹⁵ W. J. QUAX, N. T. MRABET, R. G. LUITEN, P. W. SCHUURHUIZEN, P. STANSENS & I. LASTERS 1991 "Enhancing the thermostability of glucose isomerase by protein engineering". *BIOTECHNOLOGY (N Y)* 9: 738-42.
- ¹⁶ M. W. PANTOLIANO, R. C. LADNER, P. N. BRYAN, M. L. ROLLENCE, J. F. WOOD & T. L. POULOS. 1987. "Protein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond". *Biochemistry* 26: 2077-82.
- ¹⁷ T. J. AHERN, J. I. CASAL, G. A. PETSKO & A. M. KLIBANOV. 1987. "Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering". *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 84: 675-9.
- ¹⁸ L. J. PERRY & R. WETZEL. 1984 "Disulfide bond engineered into T₄ lysozyme: stabilization of the protein toward thermal inactivation". *Science* 226: 555-7.
- ¹⁹ O'FAGAIN C., SHEEHAN H., O'KENNEDY R., KILTY C. 1988 "Maintenance of enzyme structure (Possible methods for enhancing stability)". *Process Biochemistry*. 12 166-171.
- ²⁰ COMBES D., YOOVIDHYA T., GIBRAL E., WILLEMONT R., MONSAN P. 1988. "Mechanism of enzyme stabilization". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 59-62.
- ²¹ COMBES D., GRABER M., YE W. N. 1988. "Stabilizing effect of Polyhydric alcohols (Influence of the enzyme)". *Annals of the New York academy of Sciences*. 559-563.
- ²² YANG Z., DOMACH M., AUGER R., XIAO F. Y., RUSSELL A. J. 1986. "Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin". *Enzyme and Microbial Technology*. 18 82-89.
- ²³ BESSON C., FAVRE-BONVIN G., O'FAGAIN C., WALLACH J. 1995. "Chemical derivatives of *Pseudomonas aeruginosa* elastase showing increased stability". *Enzyme and Microbial Technology*. 17 877-881.
- ²⁴ YAMAGATA Y., ARAKAWA K., YAMAGUCHI M., KOBAYASHI M., ICHISIMA E. 1994. "Functional changes of dextran-modified alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp.". *Enzyme and Microbial Technology*. 16 99-103.
- ²⁵ LENDERS J.P., CRICHTON R.R. 1984 "Thermal stabilization of amyolytic enzymes by covalent coupling to soluble polysaccharides" *Biotechnology and Bioengineering*. 24 1343-1351.

- ²⁶ LENDERS J.P., CRICHTON R.R. 1987 "Chemical stabilization of glucoamylase from *Aspergillus niger* against thermal inactivation". *Biotechnology and Bioengineering*, 31 267-277.
- ²⁷ MARTINEK K., TORCHILIN V.P. 1988 "Stabilization of enzymes by intramolecular cross-linking using bifunctional reagents". *Methods in Enzymology*, 137 615-626.
- ²⁸ GRABAREK Z., GERGELY J., 1990.- "Zero-Lenght Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters". *Analytical Biochemistry*, 185, 131-135
- ²⁹ BARBARIC S., LEUSTEK I., PAVLOVIC B., CESI V., MILDNER P. 1988.- "Stabilization of Glycoenzymes by Cross-linking of Their Carbohydrate Chains". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 173-179
- ³⁰ SUMMER J.B., HOWELL S.F., 1935.- "A Method for Determination of Invertase activity". *Journal of Biology and Chemistry*, 108, 51-54.
- ³¹ LOWRY O.H., ROSENBROUGHT N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951.- "Protein Mesurement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biology and Chemistry*, 193, 265-275.
- ³² GRABAREK Z., GERGELY J., 1990.- "Zero-Lenght Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters". *Analytical Biochemistry*, 185, 131-135.
- ³³ KASUMI F., MASAKAZU S., KENYA H., EIJI I., MIKIHICO K., 1993.- "An Active-Site peptide Containing the Second Essential Carboxyl Group of Dextranucrase of *Leuconostoc mesenteroides* by Chemical Modification". *Biochemistry*, 32, 13696-13702.
- ³⁴ ROBYT J.F., WALSETH T.F. 1979.- "Production, Purification and Properties of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". *Carbohydrate Research*, 68, 95-111.
- ³⁵ MIKIHICO K., MATSUDA K., 1980.- "Characterization of the Multiple Forms and Main Component of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". *Biochimica and Biophysica Acta*, 614, 46-62.
- ³⁶ BARBARIC S., LEUSTEK I., PAVLOVIC B., CESI V., MILDNER P. 1988.- "Stabilization of Glycoenzymes by Cross-linking of Their Carbohydrate Chains". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 173-179.
- ³⁷ KOZULIC B., LEUSTEK I., PAVLOVIC B., MILDNER P., BARBARIC S. 1987.- "Preparation of the Stabilized Glycoenzymes by Cross-Linking Their Carbohydrate Chains". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 15 265-278.
- ³⁸ HEIMGARTNER U., KOSULIC B., MOSBACH K. 1990.- "Reversible and Irreversible Cross-linking of Immunoglobulin Heavy Chains Through Their Carbohydrate Residues". *Biochemistry Journal*, 267 585-591.
- ³⁹ ROYER G.P. 1987.- "Immobilization of Glycoenzymes through Carbohydrate Chains" *Methods in Enzymology*, 135 141-146.

-
- ⁴⁰ WILLEMONT R.M., MONSAN P., DURAND. 1988.- "Effects on Dextran on the Activity and Stability of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*". Annals of the New York Academy of Sciences., 169-172.
- ⁴¹ MILLER A.W., ROBYT J.F. 1984.- "Stabilization of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by Nonionic Detergents, Poly(EthyleneGlycol) and High-Molecular- Weight Dextran". Biochimica et Biophysica Acta., 785 89-96.
- ⁴² YANG Z., DOMACH M., AUGER R., XIAO F., RUSSELL A.J. 1996.- "Polyethylene glycol-induced Stabilization of Subtilisin". Enzyme and Microbial Technology. 18 82-89.
- ⁴³ LENDERS J.P., CRICHTON R.R. 1984.- "Thermal Stabilization of Amylolytic Enzymes by Covalent Coupling to Soluble Polysaccharides". Biotechnology and Bioengineering., 26 1343-1351.
- ⁴⁴ LENDERS J.P., CRICHTON R.R. 1988.- "Chemical Stabilization of Glucoamylase from *Aspergillus niger* against Thermal Inactivation". Biotechnology and Bioengineering., 31 267-277
- ⁴⁵ ROBYT J.F., KIM D., YU L. 1994 "Mechanism of dextran activation of dextranucrase". Carbohydrate Research 266 293-299.
- ⁴⁶ JACKSON E., HUDSON C. 1941.- "Crystalline b-methyl-D ribopyranoside". J. Am. Chem. Soc. 63 1229-1231.
- ⁴⁷ YAMAGATA Y., ARAKAWA K., YAMAGUCHI M., KOBAYASHI M., ICHISIMA E. 1994 "Functional changes of dextran-modified alkaline proteinase from alkalophilic *Bacillus sp*". Bioscience. Biotechnology Biochemistry 16 99-103.
- ⁴⁸ FUNANE K., YAMADA M., SHIRAIWA M., TAKAHARA H., YAMAMOTO N., ICHISHIMA E., KOBAYASHI M. 1995. "Aggregated form of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and its constitutive mutant". Bioscience. Biotechnology Biochemistry. 59 (5) 776-780.