

03072



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**APLICACION DE LA LEVANSACARASA DE *Bacillus subtilis*
EN LA SINTESIS DE OLIGOSACARIDOS**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A :
MARIANA BEATRIZ CANEDO SOLAR**

CUERNAVACA, MORELOS.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO AL TEMA:

Presidente
Secretario
Vocal
Suplente
Suplente

Dr. Rafael Vázquez Duhak
Dr. Agustín López Munguía Canales
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Dr. Enrique Merino Pérez
Dra. Carmen Beltrán Nuñez

**.EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO
DE BIOINGENIERÍA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
(UNAM); BAJO EL ASESORAMIENTO DEL DR. AGUSTÍN LÓPEZ-
MUNGUÍA CANALES.**

Los estudios de maestría fueron posibles gracias al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca crédito 90289, así como a la beca de alimentación y hospedaje por parte del Instituto de Biotecnología.

AGRADECIMIENTOS

El culminar esta etapa de mi formación ha sido para mí un reto y por ello no quisiera dejar de manifestar mi gratitud a todas y cada una de las personas que, de una u otra forma ayudaron a que esto fuera posible:

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento y admiración al Dr. Agustín López-Munguía por su paciencia, dedicación y su gran calidad humana que me han permitido aprender en muchos aspectos en esta etapa de mi vida.

Agradezco a los miembros del jurado sus atinadas observaciones para la adecuada presentación de este trabajo.

Al Dr. Enrique Merino por su espíritu de ayuda y sus comentarios que siempre me reanimaron.

A María Elena Rodríguez y Fernando González las aportaciones y ayuda técnica prestada. De la misma manera a Leopoldo Güereca su valiosa colaboración en la parte de purificación de la enzima, y a Julia Cassani su amable ayuda en los análisis por resonancia magnética nuclear.

A todos los compañeros del laboratorio por sus críticas constructivas.

A mis padres Pedro Canedo Abascal y Margarita Solar de Canedo, agradezco infinitamente haberme brindado la oportunidad de superarme, por impulsarme siempre a enfrentar la vida con serenidad y sobretodo por su amistad incondicional.

A Fernanda y Eduardo por su entusiasmo y alegría además de sus invaluable consejos que me han dado ánimos de continuar.

A Margarita por sus palabras de aliento cuando más las necesité.

A mi amigo Gustavo por compartir conmigo inolvidables momentos y su disponibilidad a ayudarme en toda ocasión.

A mis amigas Ana Luisa Calderón y Paty Corona porque a pesar de la distancia, siempre su mente y su corazón han estado conmigo.

A mi tía Teresa Solar por aceptarme como una hija y tener conmigo siempre tantas atenciones.

Con todo amor y cariño a Daniel por escucharme, darme su apoyo, paciencia y comprensión que me han hecho sentir que no estoy sola.

“ Todo lo grande, majestuoso y bello en este mundo, nace y se forja en el interior del hombre, a una sola idea y a un solo sentimiento. Todos los acontecimientos verdaderos y efectivos que nos legaron los siglos pasados, fueron, antes de realizarse, una idea oculta en la razón y en la mente de un hombre, o un sentimiento sutil en el corazón de una mujer...”

Gibran Jalil Gibran

RESUMEN

La levansacarasa (LVS) es una enzima extracelular, producida por una gran cantidad de microorganismos. La LVS mejor caracterizada es la que se obtiene a partir de *Bacillus subtilis*. De una manera general la enzima cataliza la transferencia de fructosa a diversos aceptores. En presencia de sacarosa, lleva a cabo dos reacciones al mismo tiempo: la de transferencia, en la que el aceptor es el polímero levana, o bien la reacción de hidrólisis, en la que la fructosa es transferida al agua. Sin embargo, si además de sacarosa se adicionan monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polímeros, la LVS es capaz de transferirles la fructosa y con ello dar lugar a una gran variedad de compuestos. Los compuestos que se obtienen a partir de este tipo de reacciones tienen gran impacto comercial porque además de su poder edulcorante, actúan como probióticos, en la flora intestinal de hombres y animales. Actualmente en Japón y otros países son utilizados como aditivos de alimentos.

Uno de los retos en la actualidad es obtener altos rendimientos de los fructósidos, lo que obliga a minimizar las reacciones alternas que lleva a cabo la enzima (hidrólisis y transferencia al polímero). Es por ello que el conocimiento y optimización de las reacciones de aceptor en estas enzimas resulta de interés.

En el presente trabajo se encontraron las condiciones para la adecuada producción de la LVS de *Bacillus subtilis*, seguido de una semipurificación por precipitación con PEG.

Por otro lado se analizó la capacidad de dos levansacarasas, una proveniente de *B. circulans* y la de *B. subtilis*, de transferir fructosa a sorbitol, galactosa, glicerol, lactosa y maltosa, llevando a cabo un estudio comparativo tanto cualitativo como cuantitativo.

Por último se estudiaron las condiciones que favorecen la reacción de transferencia de fructosa a maltosa utilizando la LVS de *Bacillus subtilis*. Para ello se evaluó el efecto que tienen las relaciones sacarosa:maltosa (s/m) en el medio de reacción. Posteriormente la purificación y caracterización del fructósido obtenido.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 6 |
| II. GENERALIDADES | 10 |
| II.1 <i>Bacillus subtilis</i> | 10 |
| II.2 Glicosiltransferasas | 12 |
| II.3 Levaduras y sus aplicaciones | 13 |
| II.4 Levansacarasas | 15 |
| II.4.1 Microorganismos productores | 15 |
| II.4.2 Levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> . | 16 |
| a) Cepas productoras | 16 |
| b) Producción | 16 |
| c) Purificación | 17 |
| d) Estudio Físicoquímico | 17 |
| f) Mecanismo de reacción | 18 |
| e) Estructura de la enzima y sitio activo | 25 |
| II.5 Producción de oligosacáridos | 26 |
| II.5.1 Generalidades | 26 |
| II.5.2 Fructooligosacáridos | 28 |
| a) Aspectos generales | 28 |
| b) Organismos productores | 29 |
| II.5.3 Uso de levansacarasa en la producción de oligosacáridos | 31 |
| III. OBJETIVO GENERAL | 35 |
| III.1 Objetivos específicos | 35 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| IV.1 Producción de la enzima | 36 |
| IV.1.1 Ccpa | 36 |
| IV.1.2 Medio de Almacenamiento | 36 |
| IV.1.3 Medios de Cultivo | 36 |
| IV.1.4 Fermentación | 38 |
| IV.1.5 Curva de crecimiento y actividad | 38 |
| IV.1.6 Precipitación con polietilenglicol (PEG) | 38 |
| IV.2 Medición de Actividad | 39 |
| IV.2.1 Azúcares reductores | 39 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| IV.2.2 | Proporciones de hidrólisis y transferencia | 39 |
| IV.2.3 | Gel de actividad | 40 |
| IV.3 | Identificación de la enzima | 41 |
| IV.3.1 | Electroforesis en geles de poliacrilamida | 41 |
| IV.3.2 | Cromatografía de permeación en gel | 41 |
| IV.3.3 | Análisis de fracciones | 42 |
| a) | Productos de reacción | 42 |
| b) | Carbohidratos totales | 42 |
| c) | Electroforesis | 42 |
| IV.4 | Caracterización de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> | 42 |
| IV.4.1 | Obtención de Levana | 42 |
| IV.4.2 | Influencia de la levana en el medio de reacción | 43 |
| IV.4.3 | Influencia de la concentración de sacarosa | 43 |
| IV.5 | Reacciones con aceptores | 43 |
| IV.6 | Purificación y caracterización del fructósido | 44 |
| V. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 48 |
| V.1 | Purificación de la enzima | 46 |
| V.1.1 | Precipitación con polietilenglicol (PEG) | 47 |
| V.2 | Identificación de la levansacarasa | 50 |
| V.2.1 | Electroforesis en geles de poliacrilamida | 50 |
| V.3 | Caracterización de la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> | 54 |
| V.4 | Reacciones con aceptores | 57 |
| V.4.1 | Reacción optimizada con glicerol | 59 |
| V.4.2 | Reacciones utilizando maltosa como aceptor | 61 |
| V.5 | Purificación y caracterización del fructósido | 68 |
| VI. | CONCLUSIONES | 71 |
| VII. | PERSPECTIVAS | 72 |
| VIII. | ANEXOS | 73 |
| IX. | BIBLIOGRAFÍA | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de la levana. | 14 |
| Figura 2. Esquema del mecanismo cinético de reacción propuesto para la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> . | 21 |
| Figura 3. Mecanismo de transfructosilación propuesto para la lvs de <i>B. subtilis</i> . | 23 |
| Figura 4. Estructuras químicas de algunos fructooligoacáridos. | 28 |
| Figura 5. Esquema general para producción de FOS a nivel industrial. | 32 |
| Figura 6. Curva de crecimiento y actividad, durante la fermentación para la producción de LVS de <i>B. subtilis</i> . | 47 |
| Figura 7. Electroforesis de proteínas obtenidas en el cultivo de <i>B. subtilis</i> . | 50 |
| Figura 8. Cromatografía de permeación en gel en hplc de la enzima levansacarasa de <i>B. subtilis</i> obtenida mediante la precipitación con polietilenglicol. | 51 |
| Figura 9. Representación de los análisis realizados a las fracciones recuperadas de la cromatografía de permeación en gel. | 53 |
| Figura 10. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en el que se presentan las proteínas de <i>Bacillus subtilis</i> . | 55 |
| Figura 11. Gel de poliacrilamida de las proteínas purificadas de <i>Bacillus subtilis</i> , después de recuperar la actividad de síntesis de levana. | 55 |
| Figura 12. Influencia de la adición de levana en las dos reacciones que lleva a cabo la levansacarasa <i>Bacillus subtilis</i> . | 56 |
| Figura 13. Cromatograma de HPLC de los productos de reacción en presencia de 175 mM de lactosa y sacarosa. | 58 |
| Figura 14. Transferencia total de fructosa (al polímero y al aceptor). | 60 |
| Figura 15. Transferencia de fructosa al aceptor en reacciones con relación sacarosa:aceptor | 60 |
| Figura 16. Comparación entre las levansacarasa de <i>B. subtilis</i> y <i>B. circulans</i> en las condiciones de óptimas para la transferencia de fructosa al glicerol. | 61 |
| Figura 17. Proporciones de hidrólisis y transferencia en la velocidad inicial de reacción al exponer a las levansacarasa de <i>B. subtilis</i> y <i>B. circulans</i> a diferentes concentraciones de sacarosa y aceptor. | 62 |
| Figura 18. Comparación de la proporción de transferencia de la LVS a la maltosa en reacciones con diferentes concentraciones de sacarosa y maltosa ($s/m=1$). | 62 |
| Figura 19. Efecto de concentraciones crecientes de reactivos, en las proporciones de transferencia. Utilizando maltosa como aceptor en relación $s/m=1$. | 64 |
| Figura 20. Perfil de producción de fructósido durante la reacción con levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> utilizando maltosa como aceptor. | 66 |
| Figura 21. Evolución de la reacción de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> en presencia de maltosa como aceptor en la que se muestra el perfil de producción de fructósido y el consumo de sacarosa. | 67 |
| Figura 22. Cromatograma de HPLC en una columna Nova Pack <i>cs</i> , para análisis de carbohidratos, en el que se muestran los productos de reacción para la obtención del fructósido. | 69 |
| Figura 23. Cromatograma de HPLC, en el que se muestran los productos de reacción de la lvs de <i>Bacillus subtilis</i> con el maltosil-fructósido como sustrato. | 70 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I. Enzimas sacarolíticas presentes en <i>Bacillus subtilis</i> , con sus respectivos genes estructurales. | 11 |
| Tabla II. Bacterias productoras de levansacarasa. | 15 |
| Tabla III. Valores de las constantes de velocidad propuestas para la reacción que cataliza la LVS. | 22 |
| Tabla IV. Principales fuentes de fructosiltransferasas productoras de FOS. | 30 |
| Tabla V. Patentes industriales reportadas recientemente. | 34 |
| Tabla VI. Medio de cultivo propuesto para producción de levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> . | 37 |
| Tabla VII. Medio de cultivo propuesto para el crecimiento de <i>B. circulans</i> . | 37 |
| Tabla VIII. Purificación de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> . | 49 |
| Tabla IX. Constantes de michaelis-menten de levansacarasa de diferentes cepas de <i>Bacillus subtilis</i> . | 57 |
| Tabla X. Influencia de la concentración de sacarosa y maltosa en relación $s/m=1$, sobre las reacciones que lleva a cabo la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> . | 63 |
| Tabla XI. Efecto de diferentes relaciones s/m sobre las reacciones de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> . | 65 |

I. INTRODUCCIÓN

El incesante interés del hombre por el conocimiento de los fenómenos biológicos y sus posibles modificaciones ha impulsado el amplio estudio de moléculas biológicas, como son proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, llegando a conjuntar diversas ramas de la ciencia, como la microbiología, la tecnología enzimática, la ingeniería genética y la química, para dar lugar a lo que hoy se conoce como biotecnología, actividad multidisciplinaria relativamente nueva y definida como la utilización de agentes biológicos o sus partes para la producción de bienes y servicios.

A partir de microorganismos productores de diversas enzimas, desde mediados de este siglo por medio de biotecnología se ha llevado a nivel industrial la producción de antibióticos y detergentes, entre otros productos. Desde hace años, una gran variedad de microorganismos del género *Bacillus* han sido ampliamente utilizados como fuente de obtención de diversos productos comerciales mediante fermentación. Inicialmente fueron utilizados sin mucho conocimiento de su genética, p.e. *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* para la producción de proteasas y amilasas. Dentro de las enzimas derivadas de este género, que a lo largo de las últimas décadas han tenido un papel sumamente importante a nivel industrial destacan alcalin-serin proteasas como son las subtilisinas y proteasas neutras utilizadas en la industria de detergentes; las amilasas, la glucosa isomerasa, las β -glucanasas, las DNA polimerasas y las endonucleasas de restricción. Otros productos de importancia por sus múltiples aplicaciones que se obtienen a partir de este género son: bioinsecticidas, nucleósidos (como la inosina y la guanosina utilizados como potenciadores de sabor, o bien la uridina usada como precursor de productos farmacéuticos); aminoácidos extracelulares (triptofano, fenilalanina, histidina); vitaminas (riboflavina, cobalamina, biotina) y antibióticos peptídicos (bacitracina, gramicidina S).

Las técnicas de ingeniería genética e ingeniería de proteínas han incrementado el entendimiento básico de la genética y bioquímica de *Bacillus* y sus proteínas. Un ejemplo clásico es la cepa de *B. subtilis* Marburg 168 cuyo mapa genómico está casi completamente

descifrado permitiendo con ello el mejoramiento de cepas que expresen genes de interés, así como el desarrollo de vectores con genes regulatorios, o bien, la construcción de cepas modificadas para incrementar la productividad (hiperexcretoras, carentes de proteasas y con un control en el proceso de esporulación) que en años recientes ya han sido objeto de una elevada explotación comercial.

No es por lo tanto de extrañar que hoy en día *B. subtilis* se considere como un huésped ideal para clonar DNA recombinante de diversa índole, ya que además de lo antes mencionado, presenta también la capacidad de excretar gran cantidad de proteínas al medio y es considerado como microorganismo GRAS (del término en inglés, "generally recognized as safe"), por la U.S. Food & Drug Administration.

Por otro lado, los carbohidratos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza como parte constitutiva de vegetales, animales y microorganismos, donde están presentes en una gran diversidad de formas como son polisacáridos y oligosacáridos. Desde tiempos remotos se les han atribuido funciones que involucran principalmente la protección a condiciones ambientales adversas, así como mecanismos específicos de reconocimiento en sistemas biológicos como: anticuerpos, hormonas y toxinas. En vegetales por ejemplo, se les conoce como fuente de almacenamiento energético, crioprotectores y reguladores osmóticos. Para los microorganismos constituyen una protección contra la desecación, material de adhesión a sus huéspedes, además de servirles como medio de selectividad impidiendo la fagocitosis o el ataque de otros organismos.

Los estudios de polisacáridos, oligosacáridos y sus derivados en bioquímica y medicina han permitido desarrollar una gran cantidad de aplicaciones de éstos en diversas áreas de las industrias agrícola, farmacéutica y alimentaria principalmente. Las fuentes de extracción más comunes han sido las plantas y algas marinas o bien hongos u otros microorganismos. Su obtención por síntesis química resulta sumamente complicada dada la gran diversidad y complejidad de estructuras glicosídicas, aunado a la dificultad en la determinación de las mismas. Además, los procesos químicos tradicionales en general son ineficientes y requieren de un gasto elevado de energía. Esta situación aunada al avance de técnicas instrumentales para su análisis, como son la resonancia magnética nuclear, la espectroscopía de masas e infrarrojo, rayos X, técnicas cromatográficas, etc., ha generado

finalmente la utilización de técnicas biotecnológicas más sencillas y eficientes para la producción de estos compuestos a gran escala.

En el caso de la síntesis de los polisacáridos y oligosacáridos, la tecnología enzimática como parte de la biotecnología presenta diversas ventajas sobre los procesos químicos tradicionales dada su alta especificidad, lo que conlleva a un mayor control de calidad, y mejores rendimientos, dando lugar a productos de bajo costo, biodegradables y seguros. Las enzimas microbianas más utilizadas actualmente son del tipo hidrolítico como amilasas, celulasas, glucanasas, pectinasas etc.. Sin embargo, una tendencia actual en esta área es la síntesis de oligosacáridos por medio de glicosiltransferasas, las cuales son capaces de producirlos a partir de moléculas sencillas como la sacarosa, provenientes de la producción agrícola.

En el laboratorio de Tecnología Enzimática del IBT, una de las líneas principales de investigación es el uso de glicosiltransferasas, con el interés específico de desarrollar nuevos procesos de producción de oligosacáridos con ciertas propiedades que permitan, a corto o largo plazo, su uso comercial.

El presente trabajo involucra, por un lado, la utilización de una cepa de *Bacillus subtilis* capaz de hiperexpresar el gen de la levansacarasa como fuente de obtención de la enzima y, por otro lado, la aplicación de la tecnología enzimática por medio de esta fructosiltransferasa como posible vía de producción de fructooligosacáridos, cuyo impacto a nivel comercial lo constituyen sus propiedades como preprobióticos y edulcorantes bajos en calorías.

Con el fin de continuar con trabajos precedentes realizados en el mismo grupo de investigación, una parte de este trabajo se dedicó a un estudio comparativo, en cuanto a las reacciones de aceptor, entre la LVS de *Bacillus subtilis* y una LVS de *Bacillus circulans*. En 1990, en la Facultad de Química de la UNAM se llevó a cabo el aislamiento de la cepa de *B. circulans* (a partir del jugo de caña de azúcar) seleccionada por su capacidad de producir colonias mucoides. En este estudio se concluyó que dicho organismo produce una levansacarasa (Bibbins, 1990). En un trabajo posterior, en el IBT, se realizó una caracterización tanto fisicoquímica como de las propiedades catalíticas de esta levansacarasa; en él se encontró que esta enzima tiene propiedades muy similares a las

levansacarasa reportada en la bibliografía, ya que es capaz de realizar las reacciones de hidrólisis y de transferencia tanto al polímero como a diferentes moléculas aceptoras. (Pérez y col., 1996). Dada la disponibilidad de ambas levansacarasa en el laboratorio, resultó interesante el poder compararla con la hipótesis de que al ser originarias de distintos habitats, el comportamiento catalítico así como la especificidad hacia aceptores podría ser diferente.

II. GENERALIDADES

II.1 *Bacillus subtilis*

B. subtilis es un microorganismo gram-positivo, esporulado, móvil, que tiene la propiedad de excretar una gran cantidad de proteínas al sobrenadante del medio de cultivo, lo que lo hace interesante a nivel industrial por la facilidad en los procesos de obtención de productos de interés, además de ser GRAS.

Existen básicamente 2 tipos de cepas silvestres genéticamente diferentes de este género de las cuales se han derivado una gran cantidad de mutantes: *B. subtilis* var nigra BSS y *B. subtilis* Marburg 168.

Estas dos variantes han sido objeto de profundos estudios genéticos, principalmente dirigidos al conocimiento de la regulación metabólica de este organismo y por ello se han secuenciado los cromosomas. En el caso específico de la cepa 168, se cuenta con el mapa genómico casi completo. Para estos estudios regulatorios se ha utilizado la producción de la levansacarasa (LVS) como característica fenotípica, ya que esta enzima es responsable de la aparición de colonias mucoides (Kunst y col., 1972).

Durante la fase estacionaria de crecimiento produce una levansasa inducible y, constitutivamente, proteasas, α -amilasas, nucleasas y proteínas de lisis celular. En cambio la síntesis de LVS es inducible en presencia de sacarosa y se produce sólo durante la fase exponencial.

Mediante la construcción de mutantes, Lepesant y col. (1974), identificaron y nombraron *sacB* al gen estructural que codifica para la LVS y, junto con otros investigadores, han clonado y secuenciado este fragmento de 2kb que contiene el gen, encontrando además una región reguladora a 200 pares de bases del inicio de *sacB*, a la que denominaron *sacR*.

En las cepas de *B. subtilis*, a partir de estudios encaminados a analizar genéticamente el metabolismo de sacarosa, se ha encontrado la presencia de varias enzimas sacarolíticas, que tienen un complejo sistema de regulación aún no descifrado completamente. En la Tabla I se muestran algunas de ellas así como los genes responsables de su expresión. En algunos de estos trabajos, se han localizado diversos sitios de regulación de la síntesis de levansacarasa mediante mutaciones pleiotrópicas en el cromosoma de *B. subtilis* 168. Estas

afectan simultáneamente los niveles de expresión de LVS, así como de otras actividades proteolíticas. Así mismo, la zonas han sido mapeadas localizándose en 3 diferentes sitios designados como *sacU*, *sacQ* y *sacS*, cuya característica principal es no estar ligados directamente al gen estructural *sacB*. Otra característica de estas mutantes es que también muestran defectos en funciones relacionadas a la superficie celular, la ausencia de flagelos o la incapacidad de incorporar DNA del medio ambiente (competencia) y, por otro lado, presentan alteraciones en el proceso de esporulación. (Lepesant y col., 1972; Kunst y col.; 1974 y Chambert y col., 1984).

Tabla I. Enzimas sacarolíticas presentes en *B. subtilis*, con sus respectivos genes estructurales (Débarbouillé y col., 1991)

| ENZIMA | GEN |
|---------------------------------|--------------|
| SACARASA (Intracelular) | <i>sac A</i> |
| LEVANSACARASA (Extracelular) | <i>sac B</i> |
| LEVANASA (Extracelular) | <i>sac C</i> |

Uno de los genotipos de mayor interés en este tipo de mutantes es el designado como *sacU^h* (*h*= hiperproductora), que tiene la propiedad de sobreexpresar la LVS, además de otras actividades proteolíticas. En estudios sistemáticos sobre este genotipo, se ha encontrado que *sacU* controla la síntesis de diversos componentes celulares y, junto con *sacQ*, controla la producción de actividades enzimáticas extracelulares (entre ellas la LVS) y las condiciones de esporulación (Kunst y col., 1974).

Por otro lado, la capacidad de *B. subtilis* de secretar proteínas ha sido explotada para expresar genes de células eucariotas. Sin embargo, uno de los primeros problemas que hubo que resolver es el que se origina por la gran cantidad de proteasas extracelulares que degradan cualquiera de las proteínas extrañas, recién clonadas.

Debido a lo anterior, una alternativa es construir cepas que carezcan de estas proteasas; He y col. (1991) eliminaron diversos genes de proteasas y con ello pudieron

expresar adecuadamente el gene del activador de plasminógeno humano (htPA) y el gene de la α -amilasa de arroz.

En el Laboratorio de regulación de la expresión genética que dirige el Dr. Fernando Valle, en el departamento de microbiología molecular en el Instituto de Biotecnología (UNAM), se han construido cepas derivadas de *B. subtilis* Marburg 168 con las dos características descritas anteriormente, es decir, son del genotipo *sacU^h* hiperproductoras de LVS y además no poseen los genes de proteasas. La cepa que nos fue facilitada para este trabajo por el Dr. Valle cae dentro de este tipo, con el siguiente genotipo: Δnpr , Δapr , Cm^R , *degU32* (Hy). La letra griega Δ , indica que carece del gen *npr* (proteasas neutras) y *apr* (proteasas alcalinas).

La abreviación *DegU*, se introdujo recientemente después de llevar a cabo estudios de regulación más finos, designándose así al conjunto de genes que controla todas las enzimas degradativas presentes, mediante un sistema de dos componentes (Débarbouillé y col., 1991; Kunst y col., 1991).

Existen otros trabajos en los que se han utilizado cepas hiperproductoras de LVS. Por ejemplo Perlot y col. (1980) emplean una LVS de *B. subtilis* BS5 denominada BS5 C4 que sobreexpresa constitutivamente la levansacarasa, lo que le da la ventaja de producir la enzima en ausencia de polímero. Sin embargo, requiere de condiciones muy especiales de cultivo para lograr niveles altos de actividad en el sobrenadante; ya que posee los genes de las proteasas.

II.2 Glicosiltransferasas

Las transglicosidasas o glicosiltransferasas son enzimas que de una manera general transfieren residuos de azúcares a diversos aceptores. Son producidas por diversos organismos en la naturaleza. Particularmente las producidas por hongos y bacterias son una herramienta importante en la preparación de oligosacáridos con diferentes tipos de azúcares y enlaces.

Existen 2 grupos de ellas ampliamente estudiados, que se caracterizan por transferir residuos desde la sacarosa hacia polímeros:

a) las glucosiltransferasas, como la dextranasa (producida principalmente por *Leuconostoc mesenteroides*) que transfiere el residuo de glucosa a la posición 6 del extremo no reductor de la dextrana para dar crecimiento a la cadena. La dextrana es un polímero de glucosa con enlaces $\alpha(1-6)$ y ramificaciones en $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-3)$. Las dextranas y sus derivados tienen gran diversidad de aplicaciones, como se mencionará posteriormente.

b) las fructosiltransferasas, este tipo de enzimas son productoras de fructanas, una gama de polímeros de fructosa que se han encontrado principalmente en vegetales. Un ejemplo es la inulinsacarasa, que a partir de sacarosa forma un polímero de fructosa con enlaces $\beta(2-1)$ llamado inulina. Las plantas poseen diversos complejos enzimáticos que llevan a cabo las reacciones de formación de fructanas, pero el aislamiento de las enzimas de esta fuente es complicado.

Otra enzima importante que está clasificada dentro de este grupo es la fructosiltransferasa producida por diversos hongos. Esta enzima transfiere fructosa desde sacarosa, trisacáridos o polímeros hacia la propia sacarosa o fructanas.

Por último, también dentro de este grupo se encuentran las levansacarasas. Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas y son producidas por una gran cantidad de microorganismos. Su reacción principal es la transferencia de fructosa desde la sacarosa hacia diferentes aceptores, formando oligosacáridos o el polímero levana:



II.3 Levanas y sus aplicaciones

Las levanas son homopolímeros de fructosa, producidos tanto por plantas como por microorganismos, cuyo peso molecular varía dependiendo de la fuente de obtención, aunque por lo general, son menores los obtenidos de plantas.

La levana está constituida por unidades de fructosa con enlaces $\beta(2-6)$ y aproximadamente cada 9 o 10 residuos se presentan ramificaciones en $\beta(2-1)$, como se muestra en la Figura 1. Las levanas de origen microbiano llegan a tener más de diez mil residuos.

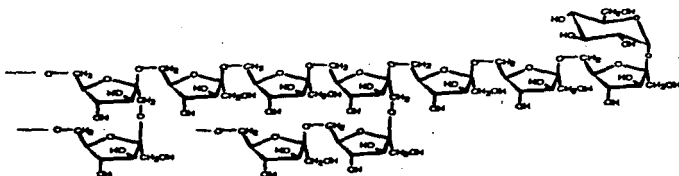


Figura 1. Estructura de la levana

Numerosos organismos productores de levana han sido descritos en la literatura. Fundamentalmente pertenecen a géneros bacterianos como: *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acetobacter*, *Phytobacterium*, *Serratia*, *Arthrobacter* y *Asotobacter* (Han & Clarke, 1990; Parlot, 1980).

Las levanas tienen potencialmente las mismas aplicaciones que las dextranas. Por ejemplo como sustituto de plasma sanguíneo, como vehículo de medicamentos, agente antitumoral y antiinmunitario. También se han producido derivados como el sulfato éster de dextrana, con características muy similares a la heparina, por lo que se han utilizado para producir anticoagulantes (Parlot, 1980; Robyt, 1986).

En el campo de la farmacología, los biopolímeros (Glucanas, fructanas y lipopolisacáridos entre otros), son generalmente conocidos por carecer de efectos colaterales al ser administrados a humanos. Se consideran modificadores de la respuesta inmune ya que activan la liberación de células líticas y de citotoxinas inhibidoras del crecimiento celular (Franz y col., 1988; Lifely, 1988). Liepa y col. (1993) reportan que la administración de levana a ratones estimula la leucopoesis, la producción de anticuerpos y promueve la actividad tumoricida de los fagocitos. También, se ha visto que ejerce un papel protector contra la radiación. Es por ello que los estudios de la levana y otros biopolímeros son de gran importancia en la actualidad.

II.4 Levansacarasa

II.4.1 Microorganismos productores

La levansacarasa fue reportada por primera vez en 1942 en estudios realizados en *Aerobacter levanicum* por Aschner y col.(1942). Se trata de una enzima constitutiva e intracelular. Posteriormente, entre 1943 y 1945, otros investigadores reportaron haber encontrado la enzima en este organismo y en *B. subtilis*, aunque con diferentes características (Periot, 1980). Actualmente, se conocen levansacarasa de diversos géneros bacterianos tanto gram-positivos como gram-negativos como se resume en la Tabla II.

Tabla II. Bacterias productoras de levansacarasa (Hettwer y col., 1995)

| GRAM-POSITIVAS | GRAM-NEGATIVAS |
|--|---|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Pantoea agglomerans (Erwinia herbicola)</i> |
| <i>Bacillus polymyxa</i> | <i>Erwinia amylovora</i> |
| <i>Bacillus natto</i> | <i>Zymomonas mobilis</i> |
| <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> | <i>Acetobacter suboxydans</i> |
| <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Gluconobacter oxydans</i> |
| <i>Actinomyces viscosus</i> | <i>Rahnella aquatilis</i> |
| <i>Bacillus circulans</i> ^a | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola |
| | <i>Acetobacter diazotrophicus</i> SRT4 ^b |

^a- Paros y col., 1986.

^b- Hernández y col., 1995.

Se ha encontrado similitud de más de 50% en la secuencia de aminoácidos en la región amino-terminal entre las levansacarasa de *Erwinia amylovora*, *Zymomonas mobilis* y *Pseudomonas syringae*. En general, las levansacarasa provenientes de microorganismos gram-negativos presentan características similares como por ejemplo el peso molecular, el punto isoeléctrico, o el hecho de que sean producidas constitutivamente.

Sin embargo, la principal diferencia que se observa entre todas las levansacarasa caracterizadas es su especificidad hacia el tipo de aceptor de fructosa y con ésto el tipo de producto obtenido. Un ejemplo lo constituye lo reportado por Hernández y col. (1995), quienes específicamente comparan la LVS de *Acetobacter diazotrophicus* con la enzima de

B. subtilis, demostrando que bajo las mismas condiciones de reacción en presencia de sacarosa la LVS de *A. diazotrophicus* produce como principales productos 1-kestotriosa y kestotetraosa, mientras que la de *B. subtilis* libera fructosa, glucosa y levana.

II.4.2 Levansacarasa de *Bacillus subtilis*.

a) Cepas productoras

La levansacarasa mejor caracterizada es la que se obtiene de *B. subtilis*. Es una enzima extracelular producida durante la fase exponencial de crecimiento, inducible en presencia de sacarosa, aunque, existen mutantes constitutivos capaces de producirla en ausencia de sacarosa. Los principales estudios cintéticos y de caracterización de la enzima se han realizado básicamente en dos tipos de cepas de *Bacillus subtilis*: la BS5 inducible, su derivada constitutiva C4 y la *B. subtilis* Marburg 168 y mutantes derivadas.

b) Producción

La LVS se produce generalmente a pH 7, entre 30-37°C en medio de cultivo líquido que consta de una cantidad mínima de sales y una fuente de carbono que dependiendo de la cepa productora, puede ser: sacarosa para las cepas inducibles y glucosa o glicerol para las cepas constitutivas). En cuanto a la fuente de nitrógeno, puede emplearse sulfato de amonio o nitrato de potasio, siendo éste último el más utilizado. Existen casos en los que se reporta el uso de extracto de levadura (Dedonder, 1966; Perlot, 1980; Ohtsuka y col., 1992).

Dedonder (1960) propone que, aún con cepas constitutivas, la presencia de sacarosa induce la producción de una permesa responsable de la excreción de la enzima. En el mismo estudio, pone en evidencia la importancia de la presencia del hierro en el medio de cultivo para favorecer la producción de la LVS. Recientemente mediante estudios más finos, se ha llegado a proponer un mecanismo de excreción de la LVS (Petit-Giatron y col., 1987). Estos autores sugieren que la excreción se lleva a cabo en 2 pasos: primeramente una ruptura proteolítica a nivel del N-terminal del péptido señal para dar lugar a la formación de una proteína madura asociada a la membrana. El segundo paso, que es el limitante, consta de la liberación y el cambio conformacional de la proteína. Por otro lado, se ha logrado el plegamiento de la LVS *in vitro*, promovido por la adición de Ca^{+2} o Fe^{+3} , lo que indica la

importancia de la presencia de estos iones en el plegamiento *in vivo* de la LVS. También se ha propuesto que se requiere la presencia de la proteína con una carga determinada que favorezca su traslado de un lado a otro de la membrana, a través de un control del pH del medio (Chambert y col., 1995).

Se ha involucrado a la pared celular en los eventos de plegamiento y liberación de proteínas maduras; se propone que juega un papel importante en la provisión de metales, ya que los ácidos lipoteicóicos presentes en la pared de *B. subtilis* tienen la capacidad de acumularlos (Sonsenshein y col., 1993).

Otros estudios de regulación revelan que agregar 1 M de NaCl al medio de cultivo promueve un aumento de hasta nueve veces la expresión del gen *sacB*. (Kunst & Rapoport, 1995).

Por todo lo anterior, es evidente que las condiciones ambientales que rodean a la cepa de *B. subtilis* en cultivo son determinantes en la adecuada producción de la enzima.

c) Purificación

La LVS de *B. subtilis* ha sido objeto de diversos estudios de purificación. Existen varias metodologías reportadas, siendo la más utilizada la propuesta por Dedonder (1966). Este proceso consta de varios pasos, comenzando por una precipitación con etanol, seguida de un fraccionamiento con sulfato de amonio y por último, una cromatografía en columna de hidroxilapatita, obteniéndose así una preparación homogénea. Básicamente, los métodos reportados tanto para esta LVS, como para otras, involucran uno o dos pasos de los anteriores, con ligeras variantes, como puede ser el tipo de cromatografía. Pérez y col. (1996) reportan por primera vez la precipitación de una levansacarina de *B. circulans* con polietilenglicol (PEG).

d) Estudio Fisicoquímico

Desde 1963 Dedonder calculó el peso molecular de la LVS de *B. subtilis* BS5 por métodos de sedimentación, difusión y ultracentrifugación, encontrando en promedio 40,000 daltones. Posteriormente en 1975, Gounzy-Téboul y col., mediante tres métodos diferentes: sedimentación, permeación en gel y electroforesis en geles de poli(acrilamida), reportaron una

LVS con un peso molecular promedio de 50,000 daltones. Actualmente este último valor es el más aceptado para la LVS de *B. subtilis*.

La enzima consiste de un monómero, cuya composición de aminoácidos revela que es una proteína relativamente ácida, carente de cisteína y con una alta proporción de aminoácidos aromáticos.

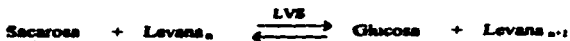
e) Mecanismo químico de reacción de la LVS

La levansacarasa, E.C.2.4.1.10 (sacarosa $\beta(2-6)$ D-fructan, 6- β -D fructofuranosil transferasa) cataliza la reacción de intercambio de fructosa que se muestra a continuación:



Glu (1,2) Fru = sacarosa
 Fru = fructosa
 Glu = glucosa
 * = ^{14}C

La determinación del mecanismo de reacción de la LVS ha sido difícil ya que en presencia de sacarosa es capaz de realizar varias reacciones al mismo tiempo. La enzima puede transferir la fructosa hacia diferentes aceptores, con la liberación de glucosa, mediante dos tipos de reacción: la reacción transferasa o polimerasa:



o bien, la reacción hidrolítica:



Se ha demostrado que la proporción de estas dos reacciones se puede modular en función las condiciones y la composición del medio de reacción en el que se encuentre la enzima. Por ejemplo, la temperatura es un factor importante ya que conforme aumenta, la reacción de hidrólisis se favorece sobre la transferencia. La presencia de solventes orgánicos afecta el balance de estas reacciones ya que la enzima es capaz de catalizar al 100% la reacción polimerasa en un medio de reacción con 60% de acetonitrilo (Chambert & Petit-Glatron, 1989). Estos mismos autores lograron una inmovilización de LVS en gel de fosfato de calcio, lo cual incrementó la síntesis de levanas hasta un 85% (Chambert & Petit-Glatron, 1993). Finalmente, mediante la adición de levana con diferentes grados de polimerización al medio de reacción se logra un aumento en la proporción de transferencia. Como se muestra mas adelante, esta característica permitió los estudios cinéticos reportados más importantes relacionados con el mecanismo de reacción (Tanaka y col. 1989; Chambert y col., 1974).

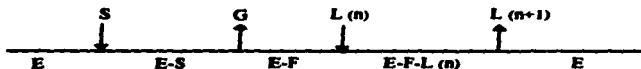
Diversos autores han demostrado tres tipos de especificidad de la enzima:

- **Hacia el grupo transferido.** Rapoport y Dedonder (1963) utilizando análogos de sacarosa encontraron que, además de fructosa, la enzima es capaz de transferir L-sorbosyl o D-xyloil hacia L-sorbose, D-fructosa, 1^ofructosil-sacarosa o pequeñas cadenas de levana.
- **Hacia la sustancia donadora.** Se ha demostrado que sólo moléculas que tengan una fructosa unida a un grupo aldósilo, de manera análoga que en la sacarosa, pueden actuar como donadoras como es el caso de la rafinosa. Por otro lado, la glucosa de la sacarosa puede ser sustituida por diferentes azúcares como D-xyloza, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, etc...
- **Hacia el accepter.** Numerosas sustancias que contengan grupos alcohólicos tales como metanol, monosacáridos u oligosacáridos como trehalosa o kestosas, etc.. pueden ser buenos aceptores del residuo de fructosa (Dedonder, 1966).

A partir de estos estudios, se sugirió que para proponer un modelo que describa el complicado comportamiento de la enzima, es necesaria la existencia de un complejo cetosil-enzima.

Mecanismo cinético de la reacción de la LVS

Una propuesta sobre el mecanismo cinético de la levansacarasa ha sido planteada por Chambert, Dedonder y col., a través de una serie de estudios entre 1972 y 1976. Considerando las diferentes reacciones que lleva a cabo la enzima (transferencia del residuo de fructosa desde la sacarosa a la levana y la reacción reversible; transferencia del residuo de fructosa desde la levana al agua y desde la sacarosa al agua), estos autores adicionaron levana al medio de reacción para asegurar que la reacción hidrolasa fuera completamente eliminada y con ello poder proponer un modelo más sencillo. Bajo estas condiciones midieron la velocidad inicial de las diferentes reacciones, así como del intercambio isotópico en el equilibrio. A partir de los datos obtenidos, concluyen que el comportamiento de la enzima se ajusta a un modelo básico de tipo Ping-Pong Bi-Bi, que se puede representar mediante la notación de Cleland como:



E= Levansacarasa

S= Sacarosa

G= Glucosa

F= Fructosa

L (n) = levana con n residuos de fructosa

Como puede apreciarse, en el mecanismo se plantea la unión de la enzima a la sacarosa formando un complejo intermediario enzima-sacarosa que, después de liberar glucosa, da origen al complejo enzima-fructosa. A partir de este último, la fructosa es transferida para unirse a la cadena de levana aumentando así en un residuo el tamaño del polímero. Nótese que el aceptor y el producto son prácticamente el mismo compuesto.

En la Tabla III se muestran los valores de las nueve constantes de velocidad calculadas con base en el esquema cíclico que se muestra en la Figura 2 a su vez derivado del diagrama anterior. De los resultados obtenidos por Chambert y col. (1974), se deduce que la levana afecta considerablemente la velocidad inicial de liberación de glucosa. Lo anterior demostró lo previamente reportado por Peaud-Lenoel y col. (1957), quienes afirman que la levana tiene un papel activador cuando está a bajas concentraciones y un papel inhibitor si se encuentra en exceso. Este papel dual se explica ya que actúa como donador y aceptor del residuo de fructosa al mismo tiempo. De acuerdo a los valores de las constantes obtenidas en presencia de levana $k_5 \gg k_6$, lo que indica que la reacción de síntesis de levana es mucho más rápida que la hidrólisis de sacarosa. Por lo tanto, el modelo predice que a partir del complejo E-F, la enzima puede dar lugar preferentemente al crecimiento de la levana, o bien, cuando no existe levana en el medio de reacción, dar lugar a la hidrólisis, liberando a la fructosa. El papel inhibitor de la levana puede entonces atribuirse a una competencia entre la levana y la sacarosa por dar lugar al complejo E-F. En el trabajo antes mencionado se concluye también que la formación del complejo E-F es un paso obligado para cualquiera de las reacciones que cataliza la LVS.

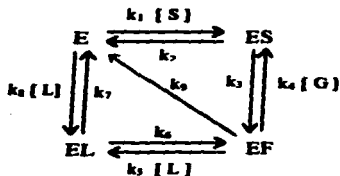


Figura 2. Esquema del mecanismo cinético de reacción propuesto para la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (Chambert y col., 1974).

Tabla III. Valores de las constantes de velocidad propuestas para la reacción que cataliza la LVS, en presencia de sacarosa y levana a 20 °C. (Chambert y col., 1974)

| CONSTANTE CINÉTICA | VALOR |
|--------------------|--|
| k_1 | $6.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
| k_2 | $8.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ |
| k_3 | $5.2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ |
| k_4 | $1.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
| k_5 | $2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
| k_6 | $4.7 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ |
| k_7 | $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
| k_8 | $8.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
| k_9 | $5.0 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ |

Por otro lado, el aislamiento y caracterización del complejo E-F permitió a Chambert y Gounzy-Tréboul (1976) proponer un mecanismo molecular para la reacción de transfructosilación que lleva a cabo la levansacarasa. Primeramente, estos autores encontraron que el residuo de fructosa está covalentemente unido a la enzima, probablemente a través de un enlace glicosil éster entre un residuo β -carboxilo de un ácido aspártico de la proteína y el C-2 de la fructosa. Lo anterior los llevó a proponer que la LVS actúa mediante el mecanismo aceptado para las enzimas que catalizan transglucosidaciones con retención de la configuración. Es decir, es un mecanismo de dos pasos en el que se lleva a cabo una catálisis bifuncional, donde participan conjuntamente un grupo ácido y un grupo nucleófilo de la proteína. En el caso de la LVS éste último es el β -carboxilato de aspártico. Aunque aún no existe suficiente evidencia sobre cuál es el grupo ácido que participa, probablemente se trata de la cadena lateral del residuo de arginina en la posición 331 (Chambert & Gounzy-Tréboul, 1976; Chambert & Petit-Glatron, 1991).

El mecanismo propuesto es el siguiente: en el primer paso, una vez formado el complejo enzima-sacarosa, el β -carboxilo ejerce un ataque nucleofílico sobre el C-2 de la fructosa. En seguida, el grupo ácido transfiere un protón a la glucosa para que ésta sea liberada, dando lugar al complejo fructosil-enzima, donde la fructosa está probablemente unida en configuración α . En un segundo paso, después de que la glucosa ha sido disociada

del complejo E-F, el aceptor de fructosa puede unirse. El grupo ácido de la enzima ya desprotonado, actúa sobre el aceptor removiendo un protón, quedando este último como un nucleófilo reactivo. Finalmente el aceptor en forma de oxianión, lleva a cabo un ataque sobre el enlace éster del complejo E-F (Figura 3).

Existen algunas explicaciones para la formación del enlace covalente entre la enzima y la fructosa. La primera es desde el punto de vista de la estereoquímica, planteando que este enlace ayuda a la inversión intermediaria de la configuración y así poder retenerla en el producto. Por otro lado, este intermediario provee probablemente una función catalítica, ya que el grupo carboxilo de aspártico actúa como mejor grupo atrayente que el agua (u otro aceptor) y mejor grupo liberador de la glucosa. Desde el punto de vista químico, se sabe que un grupo carboxilo desprotonado es mejor nucleófilo que el agua y que un enlace éster glicosídico es más reactivo que el glucosídico de la sacarosa.

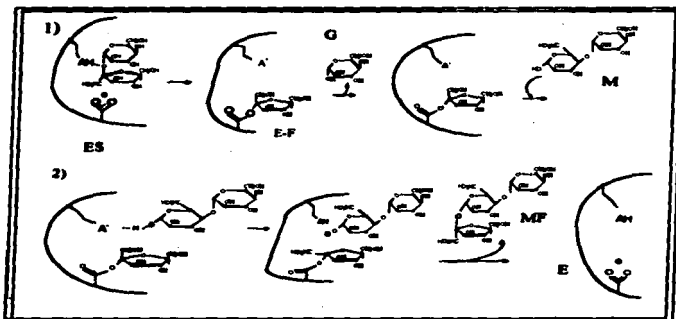


Figura 3. Mecanismo de transfructosilación propuesto para la LVS de *E. subtilis*. Tomando como ejemplo al aceptor maltosa. E= LVS, AH= grupo ácido, F=Fructosa, G= glucosa, M= maltosa, MF, maltosil fructósido.

☺ = β - carboxilo de aspártico

Formación de levana

Existen hasta ahora varias hipótesis para explicar el mecanismo de iniciación y crecimiento de cadenas de levana. Desde los primeros estudios realizados sobre las levansacarasa, se propuso que el aceptor inicial de la síntesis de levana es una molécula de sacarosa, ya que han encontrado trasas de glucosa en las cadenas de polímero. Desde entonces se postuló que la misma enzima es la responsable de la síntesis tanto de la cadena principal como de las ramificaciones, a diferencia de otros complejos poliméricos encontrados en enzimas provenientes de plantas y animales.

Rapoport (1966), propuso que el crecimiento de la cadena se lleva a cabo mediante la adición del residuo de fructosa sobre el carbono 6 de la última fructosa de la cadena en crecimiento. Unos años después, Robyt (1974-79) propuso un mecanismo similar para la síntesis de dextranas (Parlot, 1980).

Primeramente se había postulado la existencia de tres mecanismos de elongación de levana: a) crecimiento de una cadena: en el cual los residuos de fructosa son agregados sucesivamente a la misma molécula de levana. b) crecimiento múltiple: en el que residuos de fructosa van uniéndose al azar a todas las moléculas de levana aceptoras disponibles y c) multirepetitiva, en el que varios residuos de fructosa se agregan a más de una molécula de levana.

Chambert y Gounzy Tréboul (1974) concluyen que el mecanismo que sigue la enzima es el segundo. Esto lo logran mediante la determinación del peso molecular de las levanas antes y después de la reacción, calculando un peso teórico aproximado basado en los modelos propuestos. Los resultados experimentales muestran que el aceptor y el producto son prácticamente del mismo tamaño, esto los llevó a descartar el primer mecanismo y, aunque no pudieron rechazar completamente el tercero, deducen que el que más se ajusta a sus datos es el segundo.

f) Estructura de la enzima y sitio activo

La estructura tridimensional de la enzima no ha sido determinada aún con la suficiente resolución que permita visualizar el sitio activo (Le Brun y col., 1980). En 1991, Chambert y Petit Glatron utilizaron una mutante derivada de la cepa de *B. subtilis* 168 (QB252), que a diferencia de la cepa silvestre, presenta una proporción muy baja de la actividad polimerasa. Estos autores clonaron y secuenciaron el gen *sacB* mutado y con ello, se evidenció que existía un cambio de la Arg³³¹ por una His. Con ese antecedente, construyeron mutantes intercambiando aminoácidos (a.a.) en esta posición y evaluaron las propiedades catalíticas de cada una de ellas. De lo anterior pudieron concluir que el a.a. en la posición 331 modula la especificidad y la eficiencia de la reacción. Esto permitió reforzar y complementar la hipótesis planteada desde 1976 por Chambert y col. sobre el mecanismo de reacción.

Otra aportación interesante a este respecto es la reportada por Chambert y col. en 1992 donde por mutagénesis sitio dirigida en el gen de la LVS de *B. subtilis*, encontraron que cambiando un codón de terminación por glutamina, se generaba una región de lectura abierta que permitía la excreción de una proteína con un peso molecular de 53 KD, rica en aminoácidos básicos e hidrofóbicos y con un residuo de cisteína. Al analizar las propiedades catalíticas encontraron diferencias pues la mutante es capaz de sintetizar una levana de mayor peso molecular y más ramificada. Por otro lado, en este mismo trabajo, se comparó la secuencia de a.a. de esta levansacarasa con una inulinsacarasa de *Streptococcus mutans*, encontrando gran similitud. Con ello concluyen que la naturaleza de la región adicionada contribuye a la formación de enlaces tipo $\beta(2-1)$, explicando porque la levana obtenida es más ramificada.

Es un hecho que las investigaciones en esta dirección tienden a establecer la naturaleza del sitio activo, lo que permitirá eventualmente la construcción de enzimas en las que se pueda controlar el tipo de producto deseado.

11.5 Producción de oligosacáridos

11.5.1 Generalidades

Desde principios de la década de los 80's, en respuesta a la creciente demanda en el consumo de alimentos más saludables y bajos en calorías, una gran cantidad de edulcorantes han surgido, tales como la palatinosa (isomaltulosa) y otros oligosacáridos incluyendo isomaltooligosacáridos, oligosacáridos de soya y fructooligosacáridos (FOS). La importancia de todos ellos radica en sus propiedades biofuncionales además de su sabor dulce. Dentro de las propiedades benéficas de estos productos destaca su carácter de prebiótico (del griego en favor de la vida). Este calificativo se aplica básicamente a compuestos que no son digeridos por las enzimas del tracto digestivo (estómago e intestino delgado), pero que son selectivamente fermentadas en el intestino grueso por las llamadas "bacterias benéficas"; bifidobacterias, bacterias lácticas y *Bacteroides sp.* (que actúan como prebióticos) y con ello previenen la proliferación de bacterias patógenas y la formación de sustancias putrefactas en el intestino. Por lo anterior, en Japón y otros países son utilizados como aditivos en los alimentos para aves de corral, ganado e inclusive en la alimentación humana.

Una vía para producción de estos compuestos la constituye la síntesis enzimática, existiendo para ello básicamente dos tipos de enzimas: hidrolasas y transferasas.

Las enzimas hidrolasas son principalmente utilizadas bajo ciertas condiciones de reacción en las que se favorece la reacción reversible sobre la hidrólisis. Las más utilizadas son α y β glicosidasas, por ejemplo la α -galactosidasa de *M. vinacea* es utilizada para la producción de rafinosa (Monsan y col., 1995).

En las enzimas glicosiltransferasas se denomina reacciones de *acceptor* a aquellas que se llevan a cabo en presencia de su sustrato natural, con la adición de diferentes moléculas capaces de recibir el residuo transferido. Diversidad de moléculas pueden ser utilizadas como aceptores: alcoholes primarios, dando origen a alquil glicósidos utilizados en la industria alimentaria como tensoactivos y emulsificantes; azúcares simples (monosacáridos y disacáridos), originando disacáridos y trisacáridos, que se emplean como probióticos, edulcorantes y texturizantes en la industria alimentaria y por último a cadenas glicosídicas para dar origen a oligosacáridos y polímeros.

Existe una amplia diversidad de enzimas, principalmente de origen microbiano que se han reportado y utilizado hasta la fecha para esta aplicación, de las que a continuación se describen algunos ejemplos:

Las ciclodextrina glucosil transferasas (CGTasas) de diferentes especies de *Bacillus* que se emplean para la producción de ciclodextrinas (CD) a partir de almidón. Las CD son glucooligosacáridos cíclicos utilizadas como solubilizantes de medicamentos hidrofóbicos y como agentes complejantes en alimentos, entre otras aplicaciones (Fujita y col., 1990).

La sacarosa fosforilasa de *Ps. saccharophila* que por su capacidad de utilizar diferentes sustratos da lugar a la formación de productos análogos a la sacarosa (Rapoport & Dedonder, 1963).

Otro ejemplo son las dextranasaasas de *Leuconastoc mesenteroides* que catalizan la síntesis de oligosacáridos de bajo peso molecular a partir de maltosa e isomaltosa, como por ejemplo la panosa, o bien la producción de series homólogas de oligosacáridos de glucosa. Estos glucooligosacáridos (GOS) son utilizados como preprobióticos. También, se les han encontrado aplicaciones para problemas dermatológicos como el acné o irritaciones. De hecho, desde 1993 existen en el mercado líneas de productos cosméticos que contienen GOS como ingredientes activos como es el caso de Liphaderm, subsidiaria de Merck (Monsan & Paul, 1995).

Los oligosacáridos que más impacto han tenido en la industria son los fructooligosacáridos (FOS) microbianos, obtenidos a partir de sacarosa, ya que su producción a gran escala no es complicada y su sabor muy similar a la sacarosa (Won, 1996). Las principales enzimas productoras de FOS son fructosiltransferasas, dentro de las cuales destacan las provenientes de *Aspergillus niger* y *Aureobasidium pullulans* que son utilizadas para la síntesis de oligosacáridos no reductores llamados Neosazúcares ("Neosugar" ® marca registrada de una compañía japonesa llamada Meiji Seika). Se conocen β -fructofuranosidasas y transfructosilasas de diversos hongos y bacterias que son utilizadas para la producción de fructooligosacáridos a nivel industrial. A partir de la salida al mercado de estos productos se generaron una gran cantidad de estudios para la optimización y utilización de procesos enzimáticos diversos con el fin de obtener los llamados "nuevos azúcares".

11.5.2 Fructooligosacáridos

a) Aspectos generales

Los fructooligosacáridos (FOS) son oligómeros que constan de una molécula de sacarosa a la cual se le ha adicionado una, dos o tres unidades de fructosa con enlaces $\beta(2-1)$. Dentro de estos fructooligosacáridos destacan la 1-kestosa (GF_2), nistosa (GF_3) y 1^F-fructofuranosilnistosa (GF_4) (Spiegel, 1994). En la Figura 4 se muestran algunas de estas estructuras.

Sin embargo, algunos autores también utilizan el término de FOS para fructanas, fructofruktananas u oligosacáridos tipo inulina o bien productos similares con enlaces en el C-6, como:

neokestosa ($6^D(1-\beta\text{-D-fructofuranosilsacarosa})$).

6-kestosa ($6^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosilsacarosa})$) y sus derivados.

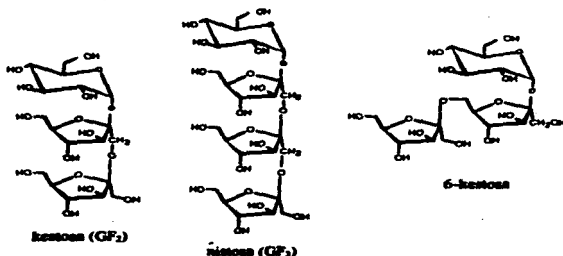


Figura 4. Estructuras químicas de algunos fructooligosacáridos.

Los FOS se encuentran naturalmente en una gran variedad de plantas comestibles que han sido usadas por años como fuente de alimentación por el hombre y los animales. Entre ellos se encuentran: plátano, cebada, ajo, miel, cebolla, azúcar morena, jitomate, espárragos, alcachofa de Jerusalén, trigo, etc.

El primer producto comercial que apareció en el mercado en Japón es "Neosugar" (mencionado anteriormente). En USA se producen FOS bajo la marca NutrafloraTM de la compañía Golden Technologies, Inc., Westminster, Colo., se produce con β -fructofuranosidasa de *Aspergillus niger* a partir de sacarosa y contiene una mezcla de GF₂, GF₃, GF₄, sacarosa, glucosa y fructosa donde es utilizado para endulzar yoghurt.

Estos productos son posiblemente competidores de los edulcorantes más comunes como el azúcar y los jarabes fructosados. Además, son una alternativa como sustitutos de azúcar en alimentos para diabéticos. No son cariogénicos y su consumo se acompaña de una disminución los niveles de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos en la sangre (Spiegel y col. 1994; Won, 1996; Hidaka y col., 1991).

b) Organismos productores

Las fuentes enzimáticas de síntesis de FOS se dividen en dos grupos: las originarias de las plantas y las de microorganismos (hongos y bacterias). En la Tabla IV se enlistan los principales organismos productores de fructosiltransferasas (Won, 1996).

La producción de estos azúcares a partir de vegetales genera bajos rendimientos y es dependiente de las situaciones climatológicas, por lo que para la producción industrial las principales fuentes empleadas son microbianas, en particular los hongos *Aureobasidium sp.* o *A. niger*.

Tabla IV. Principales fuentes de fructosiltransferasas productoras de FOS (Won, 1996)

| MICROBIANAS | VEGETALES |
|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | agave |
| <i>Aureobasidium sp.</i> | (Agave americana) |
| <i>Arthrobacter sp.</i> | agave |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | (Agave vera cruze) |
| <i>Aspergillus niger</i> | raíz de espárrago |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | (Asparagus officinalis) |
| <i>Aspergillus phoenicis</i> | achicoria |
| <i>Aspergillus sydowi</i> | (Cichorium inybus) |
| <i>Claviceps purpurea</i> | hojas de caña de azúcar |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | (Crimum longifolium) |
| <i>Penicillium frequentans</i> | alcachofa de Jerusalem |
| <i>Penicillium spinulosum</i> | (Helianthus tuberosus) |
| <i>Phytophthora parasitica</i> | lechuga. |
| <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> | (Lactuca sativa L.) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | diente de león |
| | (Taraxacum officinale) |

De una manera general la producción de FOS a nivel industrial se lleva a cabo de forma similar a la elaboración de los ingredientes comunes de los alimentos, como jarabes de maltosa y glucosa. El proceso involucra primeramente el crecimiento del microorganismo productor de la enzima seguido de su recuperación, todo ésto bajo las condiciones óptimas para cada caso particular. Posteriormente, tanto en el caso de las enzimas libres, como de células conteniendo la actividad deseada se procede a la inmovilización, para lo cual se han empleado una variedad de soportes. En general se han utilizado básicamente dos clases de procesos de producción de FOS: mediante reacciones en lote, utilizando enzimas solubles y segundo utilizando un sistema continuo ya sea con enzimas o células inmovilizadas. Es interesante aclarar que en la mayoría de los casos se utilizan altas concentraciones de sacarosa en el medio de reacción (entre 600-850 g/l) (Won, 1996).

Una vez concluida la reacción, la separación y purificación de los productos se lleva a cabo mediante decoloración, filtración, desalinización y concentración, ésto último mediante técnicas de cromatografía. Después, son esterilizados principalmente por

exposición a la luz ultravioleta o bien liofilizados para finalmente obtener los cristales blancos característicos de este tipo de productos. Paralelamente, se utilizan técnicas de HPLC para la identificación y cuantificación de los productos. En la Figura 5 se muestra un esquema general del proceso industrial de producción de FOS.

La gran mayoría de los productos terminados contienen además de los FOS grandes cantidades de glucosa y sacarosa, de tal modo que los FOS constituyen entre 55 y 60 % de los sólidos. Es por ello que algunos investigadores actualmente buscan métodos alternativos para la producción de extractos de mayor pureza, es decir, con alto contenido de FOS. Una posibilidad es eliminar la glucosa residual, para lo cual se ha propuesto el uso de microorganismos (*Candida* o *Pichia* sp.) o enzimas como la glucosa isomerasa o glucosa oxidasa, capaces de asimilar o transformar los productos que no son FOS.

II.5.3 Use de levansacarasa en la producción de oligosacáridos

En realidad no existen muchos reportes sobre el uso de LVS en reacciones en presencia de aceptor, sobre todo desde el punto de vista cuantitativo. Sin embargo, existen tres géneros bacterianos productores de levansacarasa, que se han estudiado ampliamente por su capacidad de llevar a cabo este tipo de reacciones. De hecho, las principales diferencias encontradas entre las levansacarasa de diferentes géneros se refieren a su especificidad, y se ha postulado que, aunque llevan a cabo el mismo tipo de reacciones, el complejo EF puede tener distinta afinidad por los aceptores, y con ello *in vivo* constituir un factor selectivo (Hernández y col., 1995).

Tanaka y col. (1981) realizaron un extenso estudio sobre el comportamiento de la LVS de *B. subtilis* en presencia de diferentes azúcares. Ellos encontraron que la enzima es capaz de producir diferentes heterooligosacáridos a partir de sacarosa cuando se adicionan también monosacáridos como D-manosa, D-glucosa y D-xylosa para dar lugar a la producción de disacáridos no reductores, identificados como β -D-fructofuranosil α -D-glicósidos (manosacarosa, sacarosa y xylosacarosa, respectivamente).

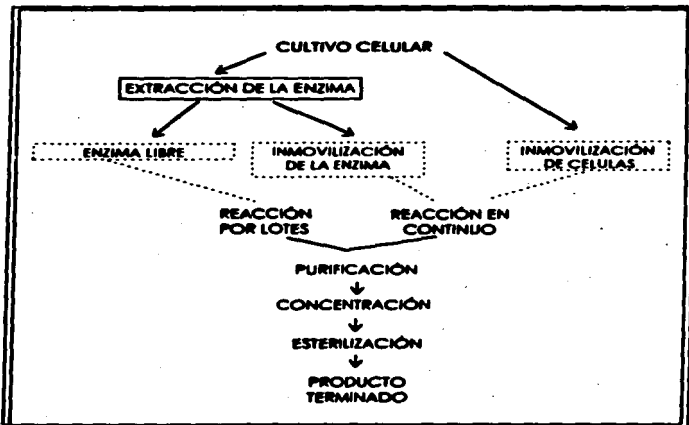


Figura 5. Esquema general para producción de FOS a nivel industrial.

En presencia de D galactosa la enzima sintetiza, di, tri y tetrasacáridos no reductores. Por otro lado, en el mismo estudio se obtuvieron azúcares reductores en presencia de L-arabinosa o bien D-fructosa, donde además se produjeron oligómeros de fructosa como levano bi, tri y tetraosas. De todo ésto se pudo constatar que la levansacarasa puede transferir fructosas tanto al C-1 como al C-6 de los azúcares probados y por otro lado la utilización preferentemente de enlaces $\beta(2-6)$ para la síntesis de fructooligosacáridos similares a la levana.

Por otro lado, Ohtsuka y col. (1992) reportan la capacidad de la levansacarasa de *Rahnella aquatilis* JCM-1683 de transferir fructosa a diferentes azúcares, llevando a cabo un análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Para esta enzima los mejores aceptores resultan ser D-xylosa, L-arabinosa, lactosa, melibiosa, maltosa y celobiosa, entre los azúcares. A diferencia de la LVS de *B. subtilis*, esta enzima no es capaz de transferir a alcoholes. En el mismo trabajo, estos autores optimizan la reacción de transferencia a xylosa, para producir xylosacarosa a 55°C, obteniendo rendimientos mayores al 50%.

Por último Hernández y col. (1995), reportan las propiedades de una levansacarasa de *Aceobacter diazotrophicus* SRT4, una bacteria fijadora de nitrógeno aislada de la caña de azúcar, que es capaz de producir preferentemente 1-kestotriosa y kestotetraosa a partir de sacarosa. Sin embargo, en este caso los rendimientos son relativamente bajos, alrededor de 30%, siendo el 70% restante fructosa transferida al agua.

En la Tabla V se presenta un resumen de las patentes industriales reportadas recientemente para la producción de diferentes oligosacáridos. En ellas se registra la propiedad de microorganismos productores de las enzimas, así como de procesos obtención de productos a partir de ellas. Es interesante recalcar que en la mayoría de ellas se utiliza al menos una levansacarasa.

Tabla V. Patentes industriales reportadas recientemente.

| MICROORGANISMO (S) | ENZIMA (S) | PRODUCTO (S) | APLICACIÓN | COMPAÑIA (PAÍS) | PATENTE No. |
|--|---|---|--|---|-------------------------|
| <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus niger</i> | fructosil transferasa | lactosa (amucosos) | Alimentación humana y animal | Mitsui Soda (JAPON) | 59-95895 |
| <i>B. subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Mucor javanicus</i> | levansucrasa α -glucosidasa | transglucosa | Farmacéutica (anticáncer) | Ambi-Chem (JAPON) | JF0539282 |
| <i>B. sp.</i> <i>B. licheniformis</i> | levansucrasa ácido- termoestable | levana | Industria Farmacéutica y Alimentaria | Selvey- Enzymes (FRANCIA) | FR2691161 |
| <i>Rhizella aquatica</i> JCM- 1683 | β -D- fructofuranosidasa levansucrasa | galactosilglucosidasa xylosucrasa lactosucrasa xylosilfructosido | Edulcorante Propéutico | Nishin-Sugar-Mfg (JAPON) | J04103593 JF05276970 |
| <i>B. megaterium</i> | β -D- fructofuranosidasa levansucrasa | lactosilfructosido | Alimentos para animales, medicinas y cosméticos | Nishin-Sugar-Mfg (JAPON) | JF5130085 |
| <i>Bacillus sp.</i> <i>Aerobacter sp. K-1</i> <i>Sporobolomyces</i> <i>Rhizella</i> | levansucrasa β -fructofuranosidasa galactosil-transferasa | lactosucrasa | Alimentación humana (bebidas) y de animales. Medicinas y cosméticos | Hoyaishiro- Biotech.; Biotech Enzyme- Sugar-refining (EUROPA) | J03290197 EP-047125 |
| <i>B. subtilis</i> | levansucrasa | celobiofructosa galactosilfructosa | Alimentaria | EUROPA | 0337809 |

III. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la enzima levansacarasa producida por *Bacillus subtilis*, con particular énfasis en las reacciones de hidrólisis y transferencia.

III.1 Objetivos específicos

- 1) Encontrar las condiciones adecuadas para la producción de la enzima.
- 2) Purificarla por el método de precipitación con polietilenglicol.
- 3) Evaluar el proceso de purificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.
- 4) Comparar la enzima de *B. subtilis* desde el punto de vista de su especificidad y comportamiento catalítico con otras LVS, en particular la producida por *Bacillus circulans*: analizando la capacidad de ambas enzimas de transferir fructosa a diversos aceptores y comparandolas tanto cualitativa como cuantitativamente.
- 5) Caracterizar y optimizar la reacción con maltosa como aceptor.
- 6) Purificar y caracterizar el fructósido obtenido

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Producción de la enzima

IV.1.1 Cepa

El microorganismo empleado para el desarrollo de este trabajo fue proporcionado amablemente por el Dr. Fernando Valle. Se trata de una cepa derivada de *B. subtilis* 168 Marburg designada con el genotipo Δapr , Δapr , Cm^r, *degU32* (Hy), cuya característica principal es sobreexpresar el gen que codifica para la levansacarasa.

IV.1.2 Medio de Almacenamiento

Para el almacenamiento se transfiere al microorganismo a un tubo con 3 ml de medio Luria (Bactopeptona de Bioxon 10 g/l, NaCl de Baker 10 g/l y Extracto de levadura de Prolabo 5 g/l) y se incuba por 2 h o hasta llegar a una densidad óptica (D.O.) de entre 0.5 y 1.0 a 600 nm (Spectronic 601, Milton Roy). Este cultivo se emplea para inocular un matraz de 500 ml con 50 ml de Luria, que se incuba con agitación hasta una D.O. de entre 1 y 1.5 y en seguida se adicionan 15 ml de glicerol al 50%. Se toman alícuotas de 1 ml y se transfieren a tubos criogénicos de 2 ml (Corning), que se almacenan a -70°C en un ultracongelador Revco. Estos tubos sirven para la preparación del inóculo de las fermentaciones realizadas.

IV.1.3 Medios de Cultivo

El medio utilizado para la producción del inóculo, es el propuesto por Dedonder (1966), para la producción de levansacarasa de *B. subtilis* y cuya composición se muestra en la Tabla VI. Todos las sales utilizadas eran de la marca J.T. Baker.

Para la producción de la enzima se llevan a cabo fermentaciones en las que se utiliza el medio propuesto por Barroso (1995) y cuya composición se presenta en la Tabla VII, específicamente optimizado para la producción de la levansacarasa de *B. circulans* (Pérez, 1995).

Tabla VI. Medio de cultivo propuesto para producción de levansacarasa de *B. subtilis* (Dedonder, 1966).

| COMPONENTE | CONCENTRACION (mg/l) |
|---|----------------------|
| KNO ₃ | 100 |
| K ₂ HPO ₄ | 70 |
| KH ₂ PO ₄ | 30 |
| MgSO ₄ | 5 |
| MnSO ₄ | 0.01 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | 0.05 |
| ZnSO ₄ | 0.05 |
| CaCl ₂ | 1 |
| Sacarosa | 175 |

Tabla VII. Medio de cultivo propuesto para el crecimiento de *B. circulans* (Pérez, 1995).

| COMPONENTE | g/l |
|---------------------------------------|---------|
| Sacarosa | 30 |
| Extracto de levadura | 20 |
| K ₂ HPO ₄ | 20 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0.06621 |
| MgSO ₄ · H ₂ O | 0.02298 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.0183 |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 0.01119 |
| NaCl | 0.01 |

IV.1.4 Fermentación

Las fermentaciones para la obtención de la levansacarasa se llevan a cabo de la siguiente manera: después de activar la cepa almacenada en 5 ml de luria incubando por 4-6 h a 30°C, se transfiere a un matraz de 250 ml con 50 ml de medio para *B. subtilis*, se incuba con agitación por 14-15 h a 30°C o hasta una D.O. de entre 4 y 5 a 600 nm. A este cultivo se le denomina inóculo y se emplea para inocular un matraz Fernbach de 2 l, con 450 ml de medio con extracto de levadura (Tabla VII). Este cultivo se incuba por 5-6 h en las mismas condiciones, y posteriormente, se centrifuga a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C (Beckman, J2-21), se desechan las células y el sobrenadante se conserva para la purificación de la enzima.

IV.1.5 Curva de crecimiento y actividad

Para llevar a cabo el seguimiento de la fermentación se toma una muestra cada hora durante 12 h. Se monitorea el crecimiento del microorganismo midiendo la densidad óptica a 600 nm en alícuotas de medio diluidas diez veces. Posteriormente 3 ml de medio se centrifugan por 3 min a 15,000 rpm en una microcentrifuga Beckman. El sobrenadante se conserva para la determinación de actividad levansacarasa total, mediante la cuantificación de azúcares reductores.

IV.1.6 Precipitación con polietilenglicol (PEG)

La levansacarasa se recupera del sobrenadante libre de células y se purifica mediante la adición de un volumen igual de PEG (PM, 1500) al 50%, agitando moderadamente durante 1h a 4°C, después de lo cual se centrifuga a 12,000 rpm durante 25 min. La pastilla se recupera resuspendiéndola en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6. Alícuotas del extracto así obtenido, se almacenan en congelador (-20°C) y son utilizados para los experimentos posteriores.

IV.2 Medición de Actividad

Las determinaciones de actividad se llevaron a cabo del siguiente modo: 5 ml de mezcla de reacción con una concentración final de sacarosa igual a 60 g/l, en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6, se incubó a 37°C por 15 min. Cada 5 min, alícuotas de 1 ml se inactivan a ebullición por 15 min.

IV.2.1 Azúcares reductores

Los productos de reacción se cuantificaron por el método del ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) para la determinación de azúcares reductores (Summer, 1935), empleando α -D-glucosa (Sigma) para la curva patrón (0-2g/l).

Una unidad de actividad levansacarasa total se define como: 1 μ mol de azúcar reductor liberado por minuto.

IV.2.2 Proporciones de hidrólisis y transferencia:

Para cuantificar y diferenciar las dos actividades que lleva a cabo la LVS se utilizó un bioensayo enzimático para la determinación de D-glucosa y D-fructosa (Boehringer-Mannheim), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Dado que la enzima puede catalizar diversas reacciones en presencia de aceptor, la actividad se caracterizó de la siguiente forma: la fructosa de la sacarosa puede encontrarse libre después de la reacción (hidrólisis) o haber sido transferida. En este segundo caso se debe diferenciar entre fructosa transferida al aceptor (midiendo el fructósido producido o el aceptor consumido) y la fructosa transferida al polímero. La relación entre la fructosa transferida al aceptor y la glucosa liberada (producto de todas las reacciones) se considera como el porcentaje de la reacción total que corresponde a la transferencia al aceptor. Finalmente la fructosa transferida al polímero se obtiene por diferencia.

Según lo antes expuesto:



ACTIVIDAD TOTAL = GLUCOSA LIBRE

$$\% \text{ HIDROLISIS} = \frac{\text{FRUCTOSA LIBRE}}{\text{ACTIVIDAD TOTAL}}$$

% TRANSFERENCIA TOTAL = 100 - % DE HIDROLISIS

$$\% \text{ TRANSFERENCIA AL ACEPTOR} = \frac{\text{FRUCTOSIDO}}{\text{ACTIVIDAD TOTAL}}$$

$$\% \text{ TRANSFERENCIA AL POLIMERO} = \% \text{ TRF TOTAL} - \% \text{ DE TRF AL ACEPTOR}$$

Una unidad de actividad total queda definida como: 1 μ mol de glucosa liberada por min.

IV.2.3 Gel de actividad

La actividad de síntesis de levana puede ser detectada directamente en un gel SDS-PAGE, según lo reportado por Chambert y col. (1992). Este método tiene ciertas particularidades: las muestras no son tratadas con el agente reductor β -mercaptoetanol; además, después del corrimiento se lava el gel durante una hora con una solución de Triton X-100 al 1% (w/v). Posteriormente se incuba con una solución de sacarosa al 8% en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, durante el tiempo necesario para la aparición de la turbidez característica de la levana (bandas color blanco sobre un fondo negro).

Paralelamente al gel de actividad, se preparó una mezcla para la detección cualitativa de glucosa (modificación del método reportado en The Worthington Manual) con: glucosa oxidasa 0.1 U, 3.6 mg de peroxidasa, 100 μ l de sacarosa al 60% y 8 μ l de o-dianizidina al 1% , en un volumen total de 1ml en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6 . Un papel filtro

se impregna con esta mezcla y se coloca sobre el gel hasta notar la aparición de la coloración roja que caracteriza la presencia de glucosa. Los reactivos utilizados en esta parte son de la marca Sigma.

IV.3 Identificación de la enzima

IV.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Todos los reactivos utilizados en la electroforesis son de la marca Bio-Rad. Para la identificación de la LVS de *B. subtilis*, se llevaron a cabo electroforesis en geles al 15% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), mediante el método de Laemmli (1970). Los marcadores de peso molecular (kilodaltones, KD), son: conalbúmina 80, albúmina sérica bovina 67, ovoalbúmina 43, anhidrasa carbónica 30 y lisozima 15.

IV.3.2 Cromatografía de permeación en gel

La enzima se caracterizó mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), utilizando un cromatógrafo Waters-Millipore, un detector de luz ultravioleta (UV) Waters 486, bajo las siguientes condiciones:

Columnas: BioSep-S4000 para separación de proteínas en un rango de peso molecular de 15 a 2 mil KD, **detector UV:** $\lambda=280$ nm., **fase móvil:** amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, **flujo:** 1ml/min, **tiempo de corrida:** 15 min, **volumen de inyección** = 100 μ l de extracto enzimático y **recuperación de fracciones:** cada 2 min.

Las fracciones recuperadas se concentraron mediante conos de membrana (centrifugador^{MR}, CF25, amicon) para la retención de moléculas mayores de 25,000 daltones. 20 ml de fracción se llevan hasta un volumen de 2 ml, siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.3.3 Análisis de fracciones

a) **Productos de reacción:** 200 μ l de cada fracción concentrada se incubaron a 37°C con una concentración final de sacarosa al 6% en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6 y en un volumen final de 1ml. Después de 1 hora se cuantificaron los productos de reacción por la técnica del DNS (sección IV.2.1).

b) **Carbohidratos totales:** Para determinar la presencia de carbohidratos en las fracciones recuperadas se empleó la técnica de antrona; utilizando levana para elaborar la curva patrón (0-100 μ g/ml). La técnica consiste en agregar 2ml de reactivo de antrona (Sigma) al 2% en ácido sulfúrico concentrado, a 1ml de muestra sumergida en hielo. Posteriormente, se introduce en un baño a 80°C por 15 min, se enfria en hielo 5min y finalmente se mide la absorbancia a 630 nm (Beckman DU-650).

c) **Electroforesis:** Para constatar la presencia de la levansacarasa en las fracciones recuperadas se introdujeron a geles de poliacrilamida bajo las condiciones mencionadas anteriormente utilizando el extracto obtenido como control.

IV.4 Caracterización de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*

IV.4.1 Obtención de Levana

Se preparó levana a partir de sacarosa, empleando 50 ml de extracto de LVS que se ponen a reaccionar a 37°C con sacarosa a una concentración final de 6%, en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6 y en un volumen total de 500 ml. Después de 1 hora, se agrega etanol hasta alcanzar una concentración final de 75% (v/v), según lo reportado por Tanaka y col., (1979). Se centrifuga a 8,000 rpm por 40 min se decanta el etanol y se resuspende el precipitado en 100 ml de agua destilada. Este paso se repite 3 veces o hasta notar que el sobrenadante decantado esté transcluido. El último precipitado, una vez que es resuspendido se liofiliza (Han y col., 1990). El producto obtenido se analizó por NMR. En el ANEXO 1, se presentan los espectros obtenidos tanto para la levana de *B. subtilis* como para la de *B. circulans*.

IV.4.2 Influencia de la levana en el medio de reacción

Para estos ensayos se adiciona levana al medio de reacción en un rango de concentraciones finales entre 0-60 g/l. A mezclas de reacción con 0.42 U/ml, se les determina la actividad total (en las condiciones mencionadas anteriormente) medida y diferenciada con el ensayo enzimático de Boehringer.

IV.4.3 Influencia de la concentración de sacarosa

Para estos ensayos se efectúan mediciones de actividad en medios de reacción variando la concentración de sacarosa entre 0-50%. A partir de los datos de velocidad inicial obtenidos se determinaron las constantes cinéticas.

IV.5 Reacciones con aceptores

En esta etapa se llevó a cabo un estudio comparativo de la enzima con la LVS de *B. circulans*. El extracto enzimático de dicha cepa fue proporcionado por la M.B. Ma. de los Angeles Pérez. (Pérez, 1995)

Todos los azúcares utilizados son de la marca Sigma, a excepción de la maltosa que fue Merck. Las reacciones de aceptor se realizaron empleando 0.7 U/ml y 175 mM tanto de sacarosa como de aceptor, en un volumen total de reacción de 10 ml disueltos en amortiguador de fosfatos 50 mM. Se utilizaron las condiciones óptimas de temperatura y pH de cada una de las enzimas: para *B. subtilis* 37°C, pH 6, y para *B. circulans*, 30°C, pH 7.

Los productos de reacción se analizaron en HPLC con una columna de sílica aminada para análisis de carbohidratos NOVA-PACK C₁₈, Waters-Millipore (4.2 X 250 mm, 4µm) bajo las siguientes condiciones: fase móvil: Acetonitrilo: Agua (75:25), flujo: 1.4 ml/min, detector: índice de refracción, (IR, 410) y tiempo de corrida: 10 min

Para la reacción con glicerol como aceptor, se llevaron a cabo reacciones en las condiciones óptimas propuestas por Pérez, (1995). Los productos de reacción se analizaron y se cuantificaron en HPLC y paralelamente la medición de fructosa por el ensayo bioquímico.

Por otro lado, como parte del estudio comparativo se realizaron reacciones similares para analizar el efecto de la concentración de reactivos utilizada en el medio de reacción utilizando maltosa como aceptor. Se llevaron a cabo reacciones con dos concentraciones diferentes (60 y 120 g/l) de sacarosa y maltosa en relación molar de 1, analizando y cuantificando los productos de la misma manera.

Se estudió el efecto de la concentración de reactivos en mezclas de reacción con 1.13 U/ml y concentraciones de maltosa y sacarosa entre 60 y 300 g/l, en un volumen total de 10 ml en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6; a 37°C. Se midió la velocidad inicial (por medio del ensayo enzimático). Posteriormente, la reacción se llevó hasta una conversión de sacarosa de entre 40 y 50%, analizando y cuantificando los productos de reacción por medio de HPLC.

De igual forma, para estudiar el efecto de la relación de sacarosa/maltosa se tomó un rango entre 20 y 600 g/l de maltosa, a una concentración fija de 60 g/l de sacarosa; 0.42 U/ml de enzima, en un volumen final de 2.5 ml en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6 a 37°C, llevando a cabo las mediciones de actividad mediante el ensayo de Boehringer.

Finalmente, para seguir la cinética de producción y degradación del fructósido, se llevó a cabo una reacción de 10 ml de reacción con 10 U/ml de enzima, 240 g/l de sacarosa y maltosa, en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, dejándose reaccionar hasta una conversión de entre el 90 y 100%, inactivando alícuotas de 200 µl cada hora.

IV.6 Purificación y caracterización del fructósido

La reacción para la producción del fructósido se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 1.13 U/ml de LVS, 240 g/l de sacarosa y maltosa durante 2 h.

Con el fin de purificar el producto de la reacción de aceptor con maltosa fue necesario escalar las condiciones de elución a nivel preparativo. Primeramente se determinaron los tiempos de retención en una columna analítica (3.9 X 300mm, 10µm) y una fase móvil de acetonitrilo:agua (80:20) a 1 ml/m, durante 15 minutos. Una vez determinado

el tiempo de elución, se ajustaron las condiciones a la columna preparativa: alícuotas de 100 μ l de la mezcla de reacción inactivada se introdujeron a una columna de sílica aminada μ Bondapack-NH₂, (19 X 150 mm, 10 μ m) a un flujo de 8 ml/min, utilizando como fase móvil una solución de acetonitrilo:agua (75:25) y detector IR, recuperando el volumen eluido entre los 16 y 18 minutos.

Al volumen recuperado de la columna se le evaporan los solventes a 250 rpm y 60°C en un rotavapor BÜCHI 461, hasta un volumen de 2 ml, se completa con agua a 10 ml resuspendiendo el remanente de las paredes del recipiente y se liofiliza. El polvo obtenido se utilizó para diversos análisis, tales como poder reductor y resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, con el liofilizado obtenido se preparó una solución de 10 mg/ml y paralelamente se elaboró una curva estándar de maltosa con el fin de estimar la pureza del producto, utilizando la columna analítica NOVA-PACK C₁₈ en las condiciones mencionadas en el estudio de reacciones de aceptor.

Para demostrar que la enzima es capaz de utilizar como sustrato el fructósido obtenido se llevó a cabo una reacción con 8 U/ml de LVS, 13 mg/ml de fructósido durante 4 h y se analizaron los productos de reacción en la columna analítica mencionada anteriormente, bajo las mismas condiciones.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Purificación de la enzima

Como se ha mencionado, *B. subtilis* produce extracelularmente la levansacarasa durante la fase exponencial de crecimiento (Dedonder, 1966). La cepa utilizada en este trabajo además de hiperproducir a la LVS tiene afectado el proceso de esporulación, es decir, éste empieza 2 horas antes que en la cepa silvestre (comunicación personal, Olmos, IBT). Al inicio de este proceso se liberan enzimas proteolíticas que pueden afectar a la actividad de interés (Kunst y col., 1974).

Con el objeto de estudiar el comportamiento de esta cepa en las condiciones establecidas y poder determinar el momento en el cual detener el crecimiento del microorganismo para extraer la LVS del medio de cultivo, se llevó a cabo una fermentación en las condiciones mencionadas en materiales y métodos. En la Figura 6 se muestra la curva de crecimiento y actividad que se obtuvo a partir de los datos de 4 experimentos independientes, con sus respectivos errores estándar. El perfil de crecimiento del microorganismo se representa mediante la turbidez por absorbancia a 600 nm. La actividad presente en el sobrenadante aumenta hasta un punto máximo después del cual decae, lo que puede deberse al inicio del proceso de esporulación. Con base en estos resultados se determinó que el mejor momento para detener la fermentación y extraer la enzima del sobrenadante libre de células, es entre las 5 y las 6 h, cuando el cultivo ha alcanzado una densidad óptica de entre 6 y 7, lo que evita que el proceso de esporulación empiece a afectar a la enzima.

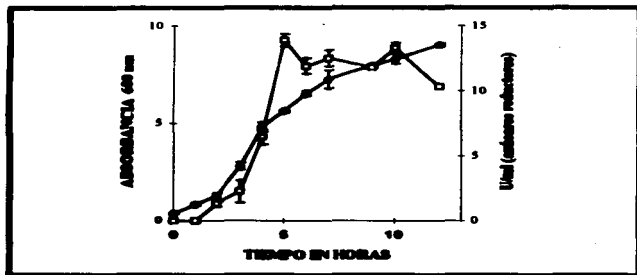


Figura 6 Curva de crecimiento (◆) y actividad (□), durante la fermentación para la producción de LVS de *B. subtilis* (30°C y pH 7).

V.1.1 Precipitación con polietilenglicol (PEG)

El método de purificación con PEG es el más utilizado para la purificación de las dextranazas y se basa en el hecho de que la enzima sintetiza el polímero al que está unida aparentemente de manera covalente (Paul y col., 1984). De la misma manera, el mecanismo de síntesis de levana por las levanzas probablemente involucra la unión del polímero a la enzima, por lo que en el laboratorio se ha utilizado de una manera eficiente la precipitación con PEG para obtener extractos de levanzas de *B. circulans* (Pérez y col., 1996).

En este trabajo, esta técnica se empleó dentro de la estrategia para la obtención de la LVS de *B. subtilis*, para lo cual al sobrenadante libre de células se le agregó PEG lo que permitió su extracción de una manera sencilla y lo suficientemente específica para los objetivos planteados en el presente trabajo. Es conveniente señalar que previo a la adición de PEG se agregó sacarosa a una concentración final de 3% con el fin de incrementar la concentración del polímero.

El método de purificación más empleado para la levansacarasa de *B. subtilis* consta de varios pasos, iniciándose con una precipitación con etanol, seguida de un fraccionamiento con sulfato de amonio y por último una separación por cromatografía en una columna de hidroxilapatita (Dedonder, 1996). Sin embargo, este proceso es complicado y de bajo rendimiento, por lo que resulta interesante hacer notar que para las levansacarosas de *B. subtilis*, la estrategia planteada resulta sumamente atractiva.

En la Tabla VIII se muestran los resultados de la precipitación-extracción, en la cual se logró obtener cerca de 3 veces más de purificación respecto al sobrenadante de fermentación. El porcentaje de recuperación obtenido, mayor al 100%, se atribuye al exceso de polímero presente (incrementado por la adición de sacarosa). Esto es congruente con los datos de algunos investigadores que han reportado un efecto activador de la levana en el medio de reacción (Chambert y col., 1974 y Tanaka y col., 1978). De acuerdo con el análisis del proceso, el 56% de la proteína del sobrenadante quedó en el extracto incluyendo la actividad levansacarasa.

Tabla VIII. Purificación de la levansucarasa de *R. solisii*

| | VOLUMEN | PROTEÍNA | | ACTIVIDAD TOTAL ^a | | ACTIVIDAD ESPECÍFICA | VECES DE PURIFICACIÓN | % DE RECUPERACIÓN |
|----------------------------------|---------|----------|------------|------------------------------|-----------|----------------------|-----------------------|-------------------|
| | | mg/ml | mg TOTALES | U/ml | U TOTALES | | | |
| SOBRENADANTE DE PERMENTACIÓN | 200 | 0.21 | 42 | 0.5 | 1700 | 40.47 | 1 | 100 |
| PRECIPITACIÓN-EXTRACCIÓN CON PEG | 50 | 0.47 | 23.5 | 53.51 | 2675 | 115.05 | 2.84 | 157.35 |

^a Azúcares reductivos

V.2 Identificación de la levansacarasa

V.2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Gonzy-Tréboul y col. (1975) determinaron el peso molecular de la levansacarasa de *B. subtilis* (BS5) por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes, encontrando un valor promedio de 53 ± 2 KD. Con el objeto de confirmar la presencia de LVS, tanto en el extracto obtenido, como en el sobrenadante de la fermentación, se realizó un experimento de este tipo. En la Figura 7 se muestra la fotografía del gel obtenido.

En el gel se muestra que tanto el extracto como el sobrenadante de fermentación presentan una banda a nivel de 50 KD, sugiriéndonos que se trata de levansacarasa. Es interesante notar que a pesar de que en la purificación se determinó que el 56% de la proteína total presente en el sobrenadante se precipitó con el extracto, el poder de resolución de la tinción de Coomassie no nos permite observar otras proteínas en dicha muestra. Sin embargo, considerando la naturaleza hiperproductora del microorganismo utilizado, además de las diversas supresiones en la expresión de proteínas, no consideramos necesario analizar esto más a fondo debido a que la proteína de nuestro interés fue detectada.

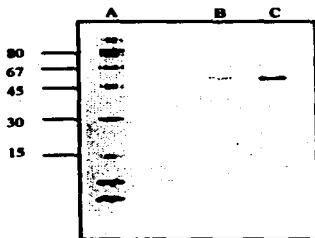


Figura 7. Electroforesis de proteínas obtenidas en el cultivo de *B. subtilis*. B) Sobrenadante de fermentación, C) Extracto obtenido con PEG. A) Marcadores de peso molecular (KD). Gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes.

De cualquier manera, los experimentos anteriores no son lo suficientemente contundentes para determinar que la proteína detectada es la responsable de toda la actividad encontrada, por lo cual se sometió el extracto a una cromatografía de permeación en gel en una columna de sílica, BioSep-S4000, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos. El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 8 en el que pueden observarse 2 picos que absorben a 280 nm (7 y 12 min aproximadamente), el primero de mucha menor intensidad que el segundo. Para determinar el punto de elución de la actividad; se colectaron las fracciones y después de haber sido concentradas, se sometieron a varios análisis.

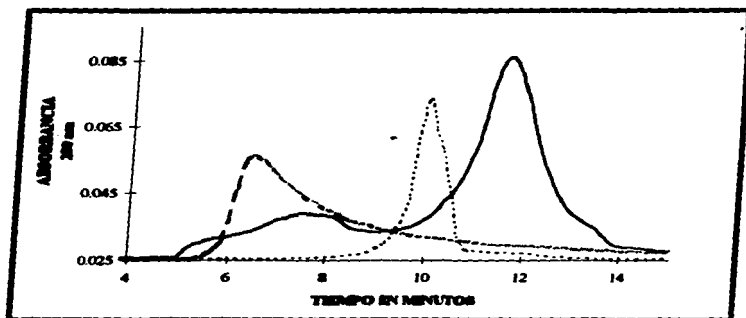


Figura 8. Cromatografía de permeación en gel en HPLC de la enzima levansacarasa de *B. subtilis* obtenida mediante la precipitación con polietilenglicol (—). Se empleó una columna para separación de proteínas (BioSep-SEC-S4000), en las condiciones mencionadas en materiales y métodos. AZUL DE DEXTRANA (---) Y OVALBÚMINA (45 KD) (.....), FUERON USADOS COMO CONTROL.

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos en dichas pruebas. Como puede observarse, la actividad (representada mediante los productos de reacción), se detecta en lo que corresponde al primer pico del cromatograma de la Figura 8. Al mismo tiempo, en esta fracción se pudo encontrar la presencia de las dos actividades, la de hidrólisis y la de transferencia, en porcentajes similares a los obtenidos con el extracto original (66.34 y 68.41% de hidrólisis, respectivamente).

Por otro lado, con el objeto de identificar la naturaleza de la segunda parte del cromatograma, se realizó una determinación de carbohidratos totales, encontrándose una gran cantidad de ellos en lo que corresponde al segundo pico, mientras que en la primera parte existen sólo en pequeña proporción, como puede constatarse en la Figura 9.

Este comportamiento, es decir, un perfil de elución que muestra 2 picos que absorben a 280 nm, es similar al reportado por Perlot (1980), en el cual presenta una cromatografía de permeación en gel de la levansacarasa de *B. subtilis* C4 purificada por otro método pero, donde también la actividad eluye en la primera parte del cromatograma, aunque en dicho estudio no se detienen a analizar la composición de este pico mayor.

Lo anterior nos condujo a deducir que la levansacarasa de *B. subtilis* utilizada en el presente trabajo eluye en el volumen que corresponde al primer pico, ya que dicha fracción posee las dos actividades características de la enzima. Los carbohidratos presentes en el extracto al ser más pequeños son retenidos en la columna y por tanto eluyen sin la proteína un poco después, dando lugar al segundo pico con respuesta en el detector de absorbancia a 280 nm alrededor de los 12 min.

Para poner en evidencia que la proteína de 50 KD encontrada mediante electroforesis es la que presenta la actividad, primeramente se sometió a las fracciones recuperadas a una electroforesis en las mismas condiciones que las reportadas para las muestras de la Figura 7.

La Figura 10 es la fotografía del gel que se obtuvo, encontrándose que sólo en la fracción que presenta la mayor actividad (fracción 8), se detecta una banda que es idéntica a la del extracto original, mientras que en el resto de fracciones no se observan bandas de proteínas.

Debido a la gran dilución efectuada en las fracciones, no se pudo detectar proteína por el método de Bradford. Se preparó un gel con diferentes concentraciones de albúmina y

y se elaboró una curva patrón mediante la medición densitométrica de las bandas obtenidas. (Zeineh, soft-laser scanning densitometer, SLR-2D/1D). Utilizando esta curva, en el gel que se presenta en la Figura 10 se pudo estimar la cantidad aproximada de proteínas recuperada en la fracción 8 siendo ésta de 3.45 $\mu\text{g/ml}$.

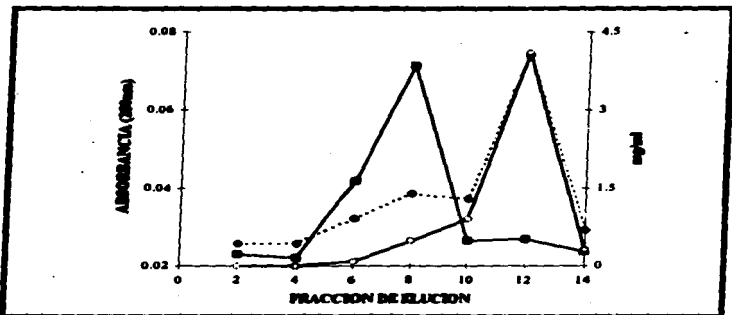


Figura 9. Representación de los análisis realizados a las fracciones recuperadas de la cromatografía de permeación en gel, comparando la absorbancia (—◆—), la actividad (azúcares reductores, ●) y los carbohidratos totales (e⁻¹, ○) en cada fracción. Las fracciones se numeraron de acuerdo al tiempo de elución.

La segunda evidencia de que la proteína encontrada es la única responsable de la actividad de LVS se obtuvo al recuperar la actividad de síntesis de levana en un gel de poliacrilamida en condiciones más suaves (ver materiales y métodos), en el cual se introdujeron el extracto obtenido y la fracción 8. La Figura 11 muestra la fotografía de el gel en el que se detectó la actividad LVS mediante la turbidez sobre un fondo oscuro a nivel de la banda de 50 KD en ambas muestras. Paralelamente a esto, con el fin de descartar la posibilidad de la presencia de una actividad hidrolítica contaminante, se realizó una

detección cualitativa de glucosa, mediante un papel filtro impregnado con una mezcla de glucosa oxidasa, peroxidasa y o-dianisidina, con lo cual se podría detectar la hidrólisis de sacarosa en algún punto diferente a la banda de levansacarasa. El papel filtro sólo presentó la coloración roja característica a nivel de la banda mencionada.

Como conclusión, podemos afirmar que todos los experimentos anteriores nos permiten deducir que la proteína detectada es la responsable de las 2 actividades presentes en extracto.

V.3. Caracterización de la levansacarasa de *B. subtilis*

Diversas investigaciones han demostrado que la presencia de levana en el medio de reacción favorece la reacción de síntesis de levana a partir de sacarosa (Chambert y col., 1974). Con el fin corroborar si este tipo de comportamiento se presenta en el extracto enzimático de *B. subtilis* se llevaron a cabo reacciones con 0.42 U/ml, 175 mM de sacarosa y diferentes concentraciones de levana en un rango de 0-60 mg/ml. En la Figura 12 se muestra como las proporciones de hidrólisis y transferencia varían conforme la concentración de levana adicionada va aumentando. En un inicio, la enzima realiza 23 % de transferencia sin la adición de levana, llegando a alcanzar paulatinamente un 65% en la concentración más alta probada. Sin embargo, es notorio que la reacción de hidrólisis no se puede eliminar completamente. Este comportamiento es un poco diferente al observado para otras levansacarasa, como la de *B. circulans* (Pérez, 1995) en la que el aumento en la transferencia es muy marcado al adicionar pequeñas cantidades de levana, aunque también llegando a un máximo de 75%, sin lograr abatir completamente la hidrólisis.

De acuerdo a diferentes reportes bibliográficos, se ha encontrado que para lograr una transferencia de fructosa cercana al 100% es necesario adicionar una concentración mínima molar de levana. En dos trabajos independientes reportan que dicha cantidad se encuentra entre 2 y 3×10^4 moles de levana por mol de enzima. (Chambert y col., 1974; Perlot, 1980). Sin embargo, el extracto de *B. subtilis* posee una actividad hidrolítica importante, que requiere de condiciones especiales para ser eliminada.

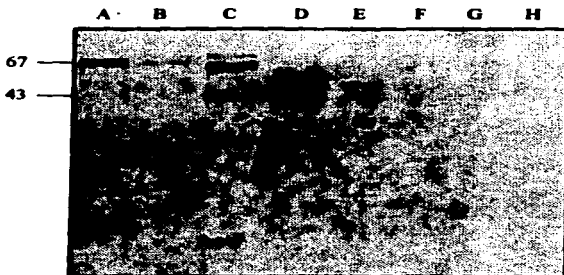


Figura 10. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en el que se presentan: Albúmina bovina 1.25 μ g, 0.3125 μ g. (A, B) y Marcadores de peso molecular (C) como controles y las proteínas de *E. subtilis* purificadas mediante precipitación con PEG (D) y las diferentes fracciones obtenidas mediante cromatografía de permeación en gel (E) fracción 2, (F, G y H) fracciones 10, 12 y 14. (Condiciones de electroforesis igual que en Figura 7).

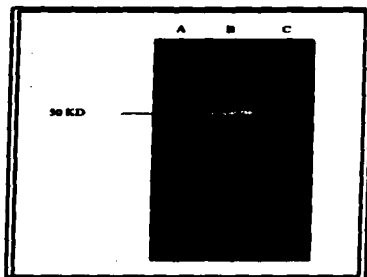


Figura 11. Gel de poliacrilamida de las proteínas purificadas de *E. subtilis*, después de recuperar la actividad de síntesis de levana (turbidez sobre un fondo oscuro). (Chambert y col., 1992). A y B) Extracto-PEG. C) fracción 2.

Empleando un medio de reacción con 0.42 U/ml y variando la concentración de sacarosa entre 0-50% se analizó el efecto del sustrato en la velocidad de reacción. Los resultados obtenidos permiten deducir que la levansacarasa de *B. subtilis* no se inhibe por exceso de sustrato, lo que concuerda con lo reportado por Periot (1980). Por otro lado, contrariamente a lo obtenido por este mismo autor, la reacción de transferencia no se favoreció aún en las concentraciones más altas probadas. Es decir, la hidrólisis sólo disminuyó en un 6% respecto a la concentración más baja (datos no mostrados). Sin embargo, a partir de los datos de actividad total obtenidos se calculó la constante de Michaelis-Menten para sacarosa, con el objeto de compararla con los reportes bibliográficos. En la Tabla IX se muestra que el valor obtenido se encuentra en el rango de lo reportado.

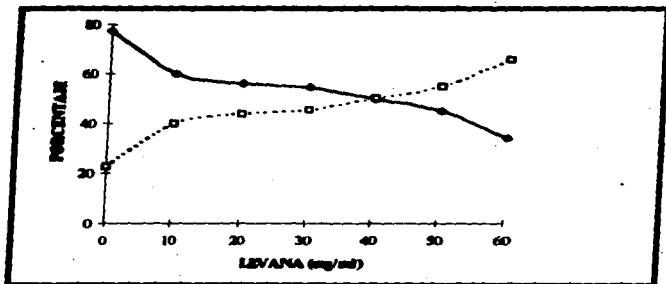


Figura 12. Influencia de la adición de levana en las dos reacciones que lleva a cabo la levansacarasa de *B. subtilis* (hidrólisis \circ y transferencia \square). La reacción se llevó a cabo con 0.42 U/ml y 175 mM de sacarosa a 37°C.

Tabla IX. Constantes de Michaelis-Menten de levansacarazas de diferentes cepas de *B. subtilis*.

| Km (mM) | Referencia |
|-------------|--------------------------------|
| 20 | Dedonder, 1966 |
| 18 | Chambert & Petit-Glatron, 1993 |
| 15.82 ± 2.7 | Este trabajo |

V.4 Reacciones con aceptores

Como se mencionó, la especificidad hacia aceptores por parte de algunas levansacarazas es muy diversa, ya que pueden transferir fructosa desde la sacarosa hacia moléculas que contengan por ejemplo grupos alcoholícos, como el metanol o el glicerol, o bien monosacáridos y oligosacáridos como trehalosa y kestosas (Dedonder, 1966). Nuestro interés en analizar este tipo de reacciones se debe al gran impacto que tienen actualmente los fructooligosacáridos en diversas áreas de la industria. Además, son pocos los reportes de estudios detallados sobre la capacidad de LVS para realizar reacciones de aceptor.

Como se mencionó con anterioridad, con el fin de continuar con trabajos precedentes en los que se utilizó una LVS de *B. circulans* (Pérez y col., 1996) se decidió llevar a cabo un estudio comparativo en cuanto a las reacciones de aceptor, ya que en el laboratorio se contaba con las dos levansacarazas, la procedente de *B. circulans* y la producida en este trabajo de *B. subtilis*. Se ha reportado que enzimas provenientes de distintos organismos presentan diferentes especificidades, lo cual podría estar relacionado con procesos de adaptación e interacciones *in vivo* de los microorganismos (Hernández y col., 1995). Por lo tanto resultó interesante poder compararlas a este respecto.

Para llevar a cabo este estudio fue necesario realizar reacciones de aceptor en las condiciones óptimas de operación de cada una de ellas: *B. subtilis*, 37°C y pH 6 y *B. circulans* 30°C y pH 7. Utilizando una relación molar de sacarosa:aceptor igual a 1 y las condiciones mencionadas anteriormente. Se probó la capacidad de ambas enzimas de transferir fructosa a galactosa, lactosa, maltosa, glicerol y sorbitol. Los productos de reacción se analizaron por HPLC. En la Figura 13 se muestra un ejemplo de la reacción con lactosa, en la que se detecta un producto nuevo después de 2 horas de reacción, lo que

sugiere que es el producto de la transferencia de fructosa a dicho aceptor. De esta manera se encontró que ambas enzimas son capaces de transferir fructosa a todos los aceptores antes mencionados.

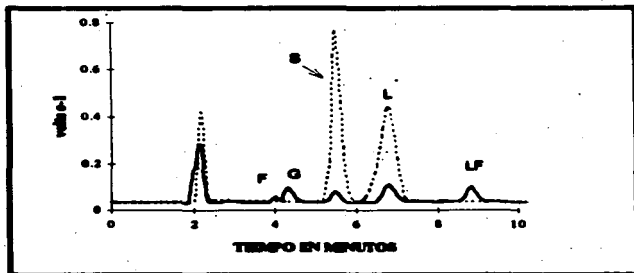


Figura 13. Cromatograma de HPLC de los productos de reacción en presencia de 175 mM de lactosa y sacarosa, 0.7U/ml de levanasacarasa de *B. subtilis*, durante 2 horas a 37°C. (Condiciones de análisis en materiales y métodos). F fructosa, G glucosa, S sacarosa, L lactosa y LF fructosido. Tiempo cero (—) y 2h (---).

Con el fin de llevar a cabo un estudio más detallado, se efectuó un análisis cuantitativo de las reacciones de aceptor con lactosa, maltosa y glicerol. Se analizó, la influencia del tipo de aceptor sobre la reacción total de transferencia, así como la transferencia hacia el aceptor.

La presencia de aceptores como maltosa y lactosa tienen un efecto activador sobre el nivel de transferencia en la reacción, ya que como se muestra en la Figura 14, los porcentajes de transferencia aumentan considerablemente con respecto al control. En promedio este aumento es del 30 % en ambas enzimas. En el caso del glicerol, el aumento en la transferencia para la LVS de *B. subtilis* es cercano al 30%, mientras que, la levanasacarasa de *B. circulans* no presenta diferencia. Esto indica a su vez que el nivel relativo de hidrólisis ha disminuido.

Ohtsuka y col. (1992), reportan que la levansacarasa de *Rahnella aquatilis* es capaz de transferir fructosa a diversos compuestos, obteniendo diferentes niveles de transferencia a los aceptores que probaron. Estos investigadores consideran que si este valor es mayor del 50%, el azúcar aceptor es fuerte. En el presente trabajo, el efecto sobre el nivel de transferencia al aceptor puede apreciarse en la Figura 15 donde es notorio que, tanto lactosa como maltosa, son aceptores fuertes, ya que presentan valores de transferencia mayores al 50%. Lo anterior indica que para la LVS de *B. circulans*, en promedio el 74% de fructosa es transferida al aceptor y el resto al polímero, mientras que la LVS de *B. subtilis* transfiere un 83 % al aceptor. En cuanto a las proporciones de transferencia al aceptor, el análisis estadístico de los datos de la Figura 15 (mediante un prueba de t), muestra que el comportamiento de ambas enzimas frente a lactosa y maltosa es muy similar, ya que no existe diferencia significativa en los niveles de transferencia a dichos aceptores (considerando un error estándar de $\pm 7\%$).

Por otro lado, aparentemente la levansacarasa de *B. subtilis* presenta un porcentaje mayor de transferencia hacia el glicerol. Debido a esto se decidió someter a ambas enzimas a las condiciones optimizadas por Pérez, (1993) para transferencia a este aceptor, con el fin de encontrar alguna diferencia entre ellas.

V.4.1 Reacción optimizada con glicerol

Se realizaron experimentos con 0.7 U/ml, 50% de glicerol y 28% de sacarosa durante 42 h y los productos se analizaron por HPLC. Para una mayor precisión, la fructosa y la glucosa se midieron con el ensayo bioquímico ya que, por medio de HPLC, los fructósidos producidos no pudieron ser separados completamente de la fructosa. La transferencia al glicerol se calculó por diferencia.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos, donde podemos apreciar que estas condiciones permiten favorecer considerablemente la transferencia al glicerol, ya que la hidrólisis se abate hasta un 15% y la transferencia al polímero es casi nula. Sin embargo, como puede apreciarse, bajo estas condiciones no existen diferencias entre ambas enzimas ya que los porcentajes de transferencia total y al aceptor son prácticamente los mismos.

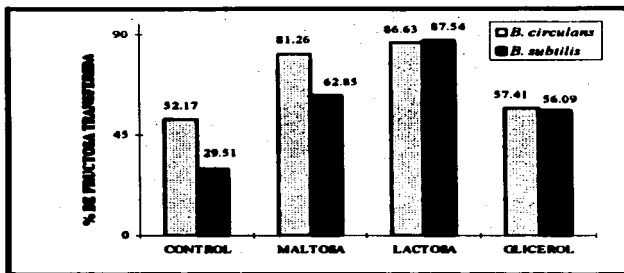


Figura 14. Transferencia total de fructosa (al polímero y al aceptor) empleando 0.7 U/ml de levansacarinas de *B. circulans* y *B. subtilis*. Las reacciones se llevaron a cabo durante 2 h en presencia de 0.175 mM de sacarosa y aceptor. Control = reacción sólo con sacarosa.

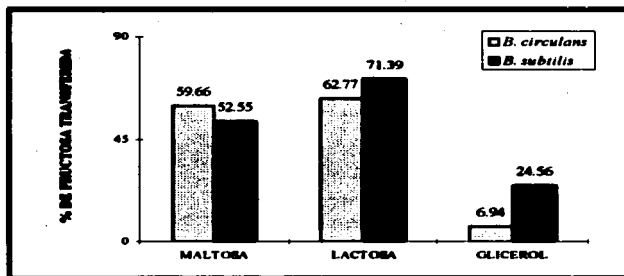


Figura 15. Transferencia de fructosa al aceptor en reacciones con relación sacarosa:aceptor = 1. Condiciones igual que en Figura 14.

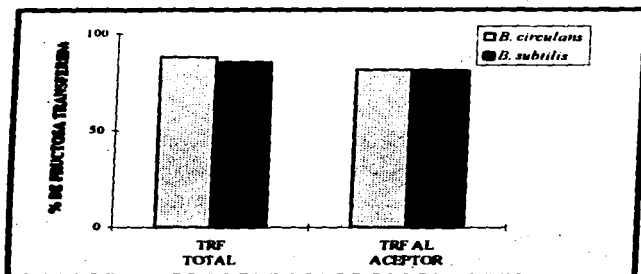


Figura 16. Comparación entre las levansacarasa de *B. subtilis* y *B. circulans* en las condiciones de óptimas para la transferencia de fructosa al glicerol propuestas por Pérez y col. (1996).

V.4.2 Reacciones utilizando maltosa como aceptor

Como se mencionó anteriormente, se encontró que la lactosa y maltosa son buenos aceptores. De hecho existen reportes e inclusive una patente a nivel industrial para la producción de lactosilfructósido por medio de una levansacarasa de *B. megaterium*. Con base en estos antecedentes se decidió efectuar un estudio más profundo de el uso de maltosa como aceptor con la levansacarasa.

Nuevamente con el objeto de compararlas se sometió a ambas enzimas a 2 concentraciones (60 y 120 g/l) de sacarosa y maltosa conservando la relación sacarosa:maltosa (s/m)=1. En la concentración mayor (120 g/l), las proporciones de transferencia total en la velocidad inicial de reacción (los primeros 15 minutos) alcanzaron hasta un $80 \pm 5\%$, en ambas enzimas (Figura 17). De la misma manera, las proporciones de transferencia a maltosa aumentaron conforme a la concentración total de reactivos presentes, como se muestra en la Figura 18, pasando de 50-60% hasta 75-80%. Por otro lado, el mismo experimento muestra que no existe diferencia significativa entre las dos enzimas considerando un error de $\pm 5\%$.

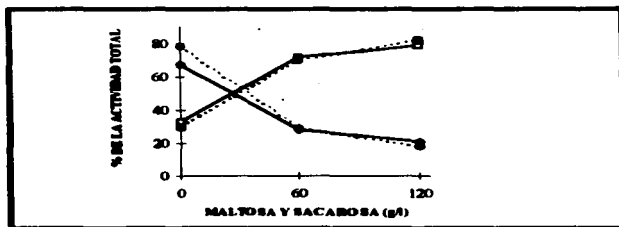


Figura 17. Proporciones de hidrólisis y transferencia en la velocidad inicial de reacción al exponer a las levaduras de *B. subtilis* y *B. circulans* a diferentes concentraciones de sacarosa y aceptor (a/m=1). Con 0.7 U/ml, las concentraciones de sacarosa y maltosa indicadas, en las condiciones óptimas de operación de cada una de las enzimas. *B. circulans* (hidrólisis ◇), (transferencia □), *B. subtilis*, (hidrólisis ---◆---), (transferencia ---□---).

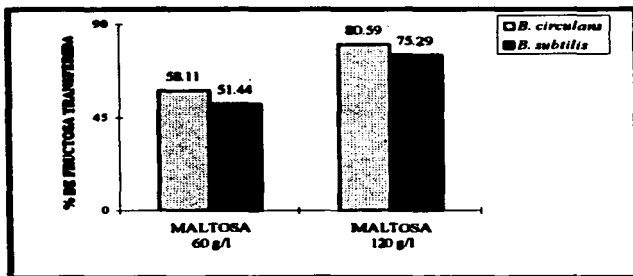


Figura 18. Comparación de la proporción de transferencia de la LVS a la maltosa en reacciones con diferentes concentraciones de sacarosa y maltosa (a/m=1). (Los productos de reacción se cuantificaron después de 2 horas de reacción).

En vista de que en todas las pruebas realizadas en estudios comparativos con ambas enzimas no se encontró alguna diferencia importante y de que se tiene mayor capacidad para producir la LVS de *B. subtilis* se decidió trabajar sólo con esta última en el estudio de la maltosa como aceptor.

Con el fin de proponer condiciones de reacción para favorecer la producción del fructósido utilizando maltosa como aceptor se realizaron varios experimentos en los que se buscó minimizar las reacciones de hidrólisis y de transferencia al polímero.

Para ello se consideró que el principal factor manipulable resultaba ser las relaciones sacarosa/maltosa (s/m). Por esta razón se estudiaron diversos niveles de relación siguiendo la reacción hasta un consumo de sacarosa importante. Los productos se analizaron y se cuantificaron como se reportó con anterioridad (HPLC).

Utilizando un rango entre 60 y 300 g/l de sacarosa y maltosa en medios de reacción que contenían 1.13 U/ml y manteniendo una relación s/m de 1, se siguió su evolución durante el tiempo necesario para llegar a una conversión considerable. Los resultados se sumarian en la Tabla X. Es interesante hacer notar que en todos los puntos, la transferencia a la maltosa fue mayor o igual al 94% de la transferencia total; por tanto, en este caso la transferencia al polímero es inhibida casi por completo, a excepción de la concentración de 300 g/l. En la Figura 19 se muestra gráficamente este comportamiento.

Tabla X. Influencia de la concentración de sacarosa y maltosa en relación s/m=1, sobre las reacciones que lleva a cabo la levansacarasa de *B. subtilis*.

| g/l ^a | % conversión | % hidrólisis | % trf total | % trf a maltosa ^b | % trf al polímero ^c |
|------------------|--------------|--------------|-------------|------------------------------|--------------------------------|
| 0 ^a | 43.98 | 78 | 22 | - | 22 |
| 60 | 46.89 | 39.61 | 60.38 | 57.22 | 3.16 |
| 120 | 41.92 | 31.94 | 68.05 | 67.27 | 0.78 |
| 240 | 38.77 | 21.22 | 78.77 | 78.47 | 0.3 |
| 300 | 37.84 | 19.12 | 80.87 | 80.87 | 0 |

Condiciones: 1.13 U/ml, a 37°C. La reacción se dejó transcurrir durante aproximadamente 2h antes de realizar la cuantificación

a= de sacarosa y maltosa

b= control, reacción sólo con 60 g/l de sacarosa

c: los valores de porcentaje están referidos a la conversión.

trf= transferencia

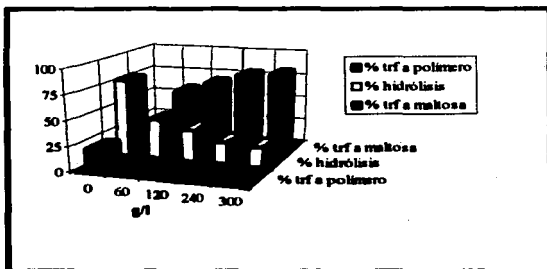


Figura 19. Efecto de concentraciones crecientes de reactivos, en las proporciones de transferencia. Utilizando maltosa como aceptor en relación $s/m=1$. Condiciones: 1.13 U/ml, a 37°C. La reacción se dejó transcurrir durante aproximadamente 2h antes de realizar la cuantificación.

En algunos estudios de reacciones de aceptor realizados con dextransacarasa se ha encontrado que al disminuir la relación s/m se obtiene un rendimiento del 100% en la síntesis de productos, ya que por un lado la disponibilidad de aceptor aumenta, pero adicionalmente la síntesis de polímero se ve inhibida completamente (Dongling y Robyt, 1993; Sánchez, 1996).

Con base en estos antecedentes se decidió estudiar el efecto de la utilización de diferentes relaciones s/m , en las reacciones que lleva a cabo la levansacarasa de *B. subtilis*. Utilizando 0.42 U/ml, una concentración constante de sacarosa igual a 60 g/l y maltosa entre 20 y 600 g/l a 37 °C, se siguieron las reacciones de la misma manera que para aquellas con las relaciones $s/m=1$ y se evaluaron los productos. Se encontró que el porcentaje de transferencia a maltosa aumentó al disminuir dicha relación (Tabla XI). Sin embargo, la síntesis de polímero no se pudo inhibir completamente. Por otro lado la hidrólisis aunque ha

sido disminuída en gran proporción, sigue llevándose a cabo. En la Tabla XI se muestran los datos obtenidos.

Tabla XI. Efecto de diferentes relaciones s/m sobre las reacciones de la levansacarasa de *R. subtilis*

| s/m | % conversión | % hidrólisis | % trf total | % trf a maltosa | % trf al polímero |
|------|--------------|--------------|-------------|-----------------|-------------------|
| 1.5 | 37.18 | 41.36 | 58.64 | 53.01 | 5.63 |
| 1 | 46.89 | 39.61 | 60.38 | 57.22 | 3.16 |
| 0.75 | 38.99 | 30.40 | 69.6 | 68.26 | 1.34 |
| 0.4 | 43.26 | 25.59 | 74.41 | 70.00 | 4.41 |
| 0.2 | 44.71 | 19.35 | 80.65 | 73.22 | 7.43 |
| 0.1 | 46.49 | 9.22 | 90.78 | 89.07 | 1.71 |

Condiciones: 0.42U/ml, sacarosa 60g/l y maltosa entre 20 y 600 g/l a 37°C.
trf= transferencia.

Para poder proponer un medio de reacción adecuado para la producción del fructósido se consideraron diversos aspectos a partir de los datos obtenidos en los estudios precedentes. Como se mencionó anteriormente el objetivo principal consistió en abatir la transferencia al polímero. Según los datos mostrados en las tablas X y XI, dicho parámetro resultó ser menor al 1% de la transferencia total, cuando se utilizó la condición s/m=1 (desde la concentración de 120 g/l). En el caso de relaciones s/m diferentes de uno, este parámetro resultó ser un poco mayor, además de que las condiciones propias del experimento, esto es, las concentraciones de maltosa utilizadas eran muy altas, lo cual implicaba un bajo rendimiento y por lo mismo un uso ineficiente de este azúcar.

Con base en lo anterior se decidió continuar el estudio empleado una relación s/m=1.

Otro parámetro importante de considerar fue la producción del fructósido y su hidrólisis por acción de la propia enzima. Por lo tanto, se decidió monitorear la producción del mismo en este tipo de reacciones. La Figura 20 muestra la evolución de producción del fructósido con respecto al tiempo utilizando diferentes concentraciones de reactivos.

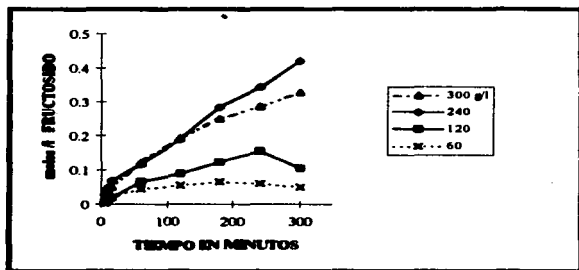


Figura 20. Perfil de producción de fructósido durante la reacción con levansacarasa de *A. subtilis* utilizando maltosa como aceptor. Las reacciones se llevaron a cabo con concentraciones crecientes de reactivos conservando la relación molar s/m igual a 1. Los medios de reacción contenían 1.13 U/ml, sacarosa y maltosa en un rango entre 60 y 300 g/l de cada una de ellas, a 37°C.

Cabe aclarar en este punto que a etapas avanzadas de la reacción, es decir, cuando se ha alcanzado una conversión de sacarosa mayor o igual al 50%, la enzima empieza a usar al producto como sustrato, de tal manera que lo hidroliza, liberando maltosa y fructosa al medio de reacción. Esto último se ve claro en la Figura 20 para la concentración de 120 g/l. En este punto (300 minutos) se ha alcanzado una conversión de aproximadamente un 60%. Por otro lado en la misma figura se puede apreciar que al utilizar la concentración de 300 g/l, la enzima presentó una ligera inhibición ya que el rendimiento en la producción de fructósido es menor que en la concentración de 240 g/l.

En vista de que la mayor productividad se obtuvo al utilizar 240 g/l de cada uno de los reactivos; se seleccionó esta condición para llevar a cabo la producción de fructósido. En estas condiciones se tiene una reacción que transfiere $74 \pm 5\%$ de los cuales entre 98-100% es hacia la maltosa. Sin embargo, considerando su posible degradación se llevó a cabo una

reacción monitoreando detalladamente la producción y degradación del producto, con el fin de proponer un momento en el cual detener la reacción y recuperar el fructósido deseado.

Para el seguimiento de la producción y degradación del fructósido de maltosa, se preparó un medio de reacción con 10 U/ml de enzima, 240 g/l de sacarosa y maltosa en amortiguador de fosfatos pH 6, a 37 °C y se siguió su evolución durante 12 horas. Los resultados se muestran en la Figura 21 en la que se presenta por un lado el avance de la reacción reportando la conversión de la sacarosa y por otro los moles de fructósido presentes en los diferentes puntos. Como puede constatarse, bajo estas condiciones el punto más alto de producción de fructósido es a las 2 horas de reacción (≈ 0.3 moles/l, cuando la conversión de sacarosa es aproximadamente del 50%) lo cual indica que éste sería el tiempo adecuado para terminar la reacción.

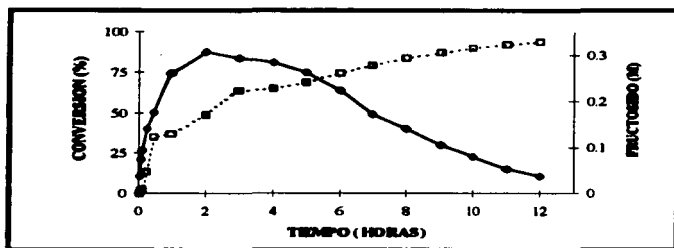


Figura 21. Evolución de la reacción de la levansacarasa de *B. subtilis* en presencia de maltosa como aceptor en la que se muestra el perfil de producción de fructósido (◆) y el consumo de sacarosa (□). Condiciones: 10 U/ml de enzima, 240 g/l de sacarosa y maltosa a 37°C.

V.5 Purificación y caracterización del fructósido

La purificación del fructósido se llevó a cabo con el fin de caracterizarlo químicamente, así como su influencia en el comportamiento cinético de la enzima.

Se preparó una reacción que contenía 0.7 U/ml y 240 g/l de sacarosa y maltosa que se dejó reaccionar durante 2 h. Posteriormente se inactivó y se analizó por medio de HPLC en columnas de sílica aminada.

Primeramente, utilizando una columna analítica (3.9 X 300mm, 10 μ M) de las mismas características que la columna preparativa se analizó la muestra para determinar el tiempo de elución del producto de interés. Una vez conocido éste se procedió a escalar las condiciones para la columna preparativa (19 X 150 mm, 10 μ M). Empleando los cálculos teóricos propuestos por el fabricante y después de experimentos preliminares, se establecieron las condiciones de operación mencionadas en materiales y métodos, bajo las cuales se recuperó el volumen donde eluye el producto. El volumen recuperado se concentró y se liofilizó obteniéndose 74.8 mg de producto seco que fue enviado para su análisis por RMN, con el fin de determinar su estructura y tipo de enlace.

En el ANEXO 2, se muestra el espectro de resonancia obtenido, así como, la estructura propuesta para el fructósido recuperado. Como era de esperarse, se trata de un trisacárido compuesto por 2 glucosas y una fructosa cuyo nombre químico sería: glucopiranosil α (1-4) glucopiranosil α (1-2), β fructofuranósido.

El cromatograma que se muestra en la Figura 22 es una comparación cualitativa del producto obtenido contra la muestra original, donde puede constatar su pureza. Sin embargo, aunque en la figura no es notorio, se detectó la presencia de una pequeña proporción de maltosa en el liofilizado. La presencia de maltosa en el liofilizado se cuantificó mediante una curva estándar elaborada con una solución de 10 mg/ml de fructósido, y paralelamente una curva estándar de maltosa, y se encontró de 3.6% atribuible a una sobrecarga de carbohidratos retenidos en la columna después de un cierto número de inyecciones.

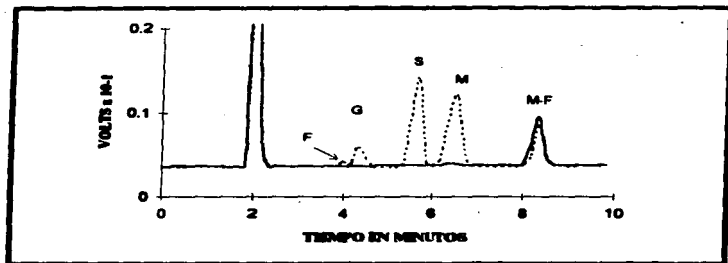


Figura 22. Cromatograma de HPLC en una columna NOVA PACK C₁₈, para análisis de carbohidratos, en el que se muestran los productos de reacción para la obtención del fructósido antes (control —) y después del proceso de purificación (···). F=fructosa, G=glucosa, S=sacarosa, M=maltosa, M-F=maltofructósido. Condiciones (ver materiales y métodos).

Para poder determinar si el fructósido obtenido es reductor o no, considerando la presencia de maltosa, se elaboró una curva estándar con maltosa y se sometió a la muestra a una cuantificación por el método de DNS. Se hizo un cálculo teórico de la maltosa presente en el purificado y los resultados nos muestran que el azúcar obtenido es no reductor, ya que un escaso poder reductor obtenido corresponde a la cantidad teórica de maltosa estimada.

En vista de que en reacciones para la producción del fructósido, la enzima reconoce al producto como sustrato hidrolizándolo, se probó si la enzima era capaz de hidrolizarlo aún en ausencia de sacarosa. Para ello se incubó una solución que contenía: 13 mg/ml de fructósido y 8 U/ml de enzima, durante 4h a 37°C, después de este tiempo se inactivó la muestra y se analizó por medio de HPLC. En el cromatograma de la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos, de los que se deduce que, la enzima es capaz de hidrolizar el fructósido liberando maltosa y fructosa, en relación molar = 1, lo que indica que la enzima en estas condiciones, no es capaz de transferir fructosa al polímero a partir este sustrato.

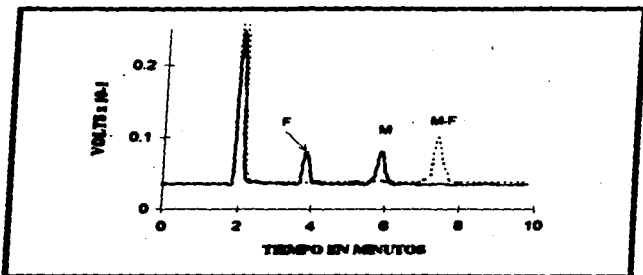


Figura 23. Cromatograma de HPLC, en el que se muestran los productos de reacción de la LVS de *E. coli* con el maltosa-fructosa como sustrato después de 4 h de incubación a 37 °C (—). Condiciones de reacción: 8U/ml y 13 mg/ml fructosa. Condiciones de corrida igual que Figura 21. (----) tiempo cero

VI. CONCLUSIONES

Se produjo LVS mediante fermentaciones con la cepa de *Bacillus subtilis* (Δapr , Δapr , Cm^R , $degU32$ (Hy)), cosechando la enzima previo al inicio del proceso de esporulación, ya que éste tiene un efecto desactivador debido a las proteasas liberadas.

La LVS puede ser purificada parcialmente mediante una técnica de precipitación con polietilenglicol, lográndose posteriormente identificar mediante electroforesis una banda equivalente a los 50 KD.

La recuperación de la actividad de levansacarasa en un gel de poliacrilamida permitió comprobar que la banda de 50KD, presente tanto en el extracto como en las fracciones recuperadas de la cromatografía de permeación en gel, son LVS. Por tanto se obtuvo un extracto que posee una sola proteína, que realiza las dos actividades, la de hidrólisis y tranferencia.

La actividad transferasa puede beneficiarse sobre la actividad hidrolasa mediante la adición de polímero al medio de reacción.

Las LVS de *B. subtilis* y *B. circulans*, son capaces de transferir fructosa a todos los aceptores probados. Desde el punto de vista cuantitativo en este tipo de reacciones prácticamente no se presentan diferencias significativas.

La presencia de maltosa en el medio de reacción tiene un ligero efecto activador en la velocidad inicial de reacción.

La enzima LVS puede ser usada para la síntesis de glucopiranosil α (1-4) glucopiranosil α (1-2), β fructofuranósido a partir de maltosa con un rendimiento del $74 \pm 5\%$.

La purificación del fructósido permitió obtener un producto con un 96% de pureza. Análisis preliminares del fructósido revelan que es un azúcar no reductor y presenta un sabor ligeramente dulce.

Al incubar el fructósido con LVS se obtienen cantidades equimolares de fructosa y maltosa, lo que sugiere que la enzima no es capaz de transferir fructosa al polímero a partir de él.

VII. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la caracterización de la reacción con maltosa como aceptor sugieren la necesidad de un mayor conocimiento tanto de la reacción como de la obtención del producto purificado. Aunque se alcanzaron niveles de transferencia de fructosa comparables a los reportados en la bibliografía, sería interesante lograr eliminar por completo la reacción de hidrólisis. Una alternativa sería proponer un método de inmovilización de la enzima en el cual la producción sea más eficiente, se pueda recuperar con facilidad el producto deseado y con ello mejorar la productividad; todo esto con el fin de llevar a cabo estudios sobre factibilidad técnica, de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del maltosilfructósido que podría permitir a mediano o largo plazo su aplicación comercial.

VIII ANEXOS

Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) que se presentan a continuación fueron realizados en el Instituto de Química de la UNAM, en el laboratorio del Dr. Manuel Jiménez Estrada.

1) Con el objeto de encontrar diferencias entre los polímeros de ambas enzimas se decidió analizar las estructuras: en seguida se presentan los espectros obtenidos por ^{13}C -NMR de las levanas producidas por las levansacarasas de *B. subtilis* (a) y (b) *B. circulans* donde el análisis de ambas mostró señales muy claras de levana lineal con enlaces $\beta(2-6)$ que contiene pequeñas proporciones de otro tipo de enlace o ramificación.

2) El producto purificado que se obtuvo de la reacción con maltosa (sección V.5) se analizó también mediante ^{13}C -NMR y experimentos HETCOR (Correlación heteronuclear C-H). A continuación se presentan el espectro obtenido (a) y la estructura propuesta para el trisacárido (b).

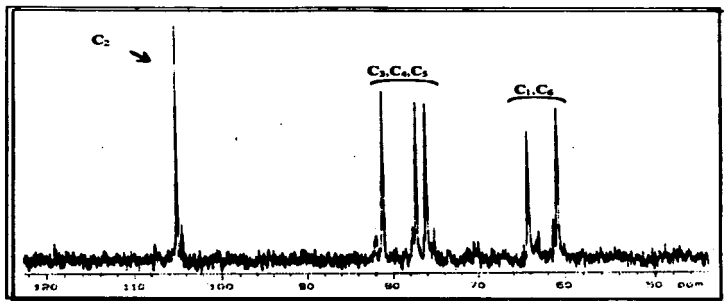


Figura A.1a) espectro ^{13}C -NMR de levadura de *E. nidulans*. Las asignaciones de los carbonos se indican en su respectiva señal como C_2 , C_3 , etc..)

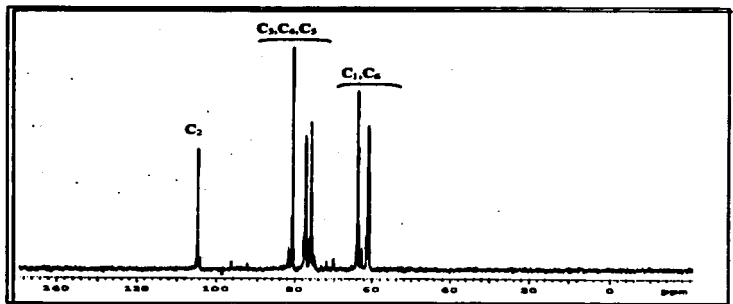


Figura A.1 b) espectro ^{13}C -NMR de levadura de *E. circulans*. Las asignaciones de los carbonos son las mismas que en el espectro a.

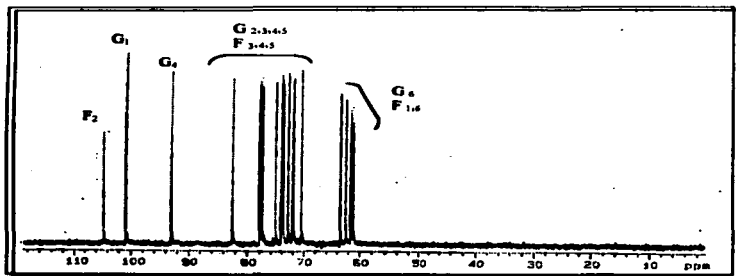


Figura A.2 a) Espectro ^{13}C -NMR de el fructósido purificado. Los desplazamientos (δ , ppm) se encuentran en : F_2 (104.6), G_1 (100.853), G_2 (93.017), carbonos que no forman enlace glucosídico para $\text{F}_{2,3,4,5}$ y $\text{G}_{2,3,4,5}$ (70.4-82.4), G_4 (63.4,62.4) y $\text{F}_{1,4}$ (61.2, 61.5). F_2 -Carbono 2 de la fructosa, G_1 = carbono 1 de glucosa, etc..

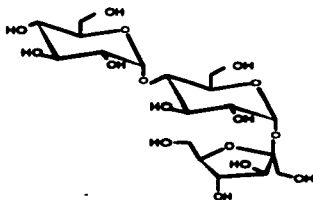


Figura A.2 b) Estructura química propuesta para el fructósido obtenido con la LVS de *Bacillus subtilis*, utilizando maltosa como aceptor. Triacérido constituido por maltosa y fructosa: (glucopiranosil α (1-4) glucopiranosil α (1-2), β fructofuranósido)

IX. BIBLIOGRAFIA

- AsahiChem. (1994) Producing theanderose with high purity on an industrial scale. Patente japonesa. JP05339282; 21.12.93.
- Balken van, J.A.M., Th. J.G.M. van Doorea, W.J.J van den Tweel, J. Kamphuis, & E.M. Meijer (1991) Production of l-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1'-fructosyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:216-221.
- Barroo, R.O. (1995) Optimización de un medio de cultivo para la producción de una fructosiltransferasa de *Bacillus circulans*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM.
- Bhatia, I.S. & K.S. Nandira. (1979) Studies on Fructosyl Transferase from *Agave americana*. *Phytochemistry*. Vol.18, pp.923-927.
- Bibbins M.D., (1990) Caracterización de enzimas extracelulares de microorganismos aislados de la caña de azúcar. Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM
- Bison, J., J-M Michel, D. Le Beller, V. Pelenc, F. Paul, P. Moussa & G. Cellif. (1995) Enzymatic synthesis of low-calorie sugar substitutes. *Ann. NY Acad. Sci.* 750:321-324.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem* 72:248.
- Chambert R., G. Tréfouel, & Dedonder R. (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 41, 285-300.
- Chambert, R., G. Tréfouel, & Dedonder R. (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes. *Eur. J. Biochem.* 62, 53-64.
- Chambert, R., G. Tréfouel, & Dedonder R. (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Characterization of a stabilized fructosyl-enzyme complex and identification of an aspartyl residue as the binding site of the fructosyl group. *Eur. J. Biochem.* 71, 493-508.
- Chambert, R. & M-F. Petit-Glatron. (1984) Hyperproduction of Exocellular levansucrase by *Bacillus subtilis*: Examination of the phenotype of *SacU^h* strain. *J. of Gen. Microbiol.* 130, 3143-3152.
- Chambert, R. & M-F. Petit-Glatron. (1989) Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carboh. Res.* 191: 117-123.
- Chambert, R. & M-F. Petit-Glatron. (1991) Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 279, 35-41.
- Chambert, R., M-C. Rain-Guion & M-F Petit-Glatron. (1992) Readthrough of the *Bacillus subtilis* levansucrase stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1132: 145-153.
- Chambert, R. & M-F. Petit-Glatron. (1993) Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carboh. Res.* 244: 129-136.
- Chambert, R., E.A. Haddouzi & M-F. Petit-Glatron. (1995) *Bacillus subtilis* levansucrase: the efficiency of the second stage of secretion is modulated by external effectors assisting folding. *Microbiol.* 141,997-1005.

- Checham, P.S.J., A. J. Hacking, and Marc Vitos. (1989) Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 11, April.
- Débarbouillé, M., I. Martin-Berstræte, M. Arnaud, A. Klier and G. Rapoport. (1991) Positive and negative regulation controlling expression of the *sac* genes in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* 142, 757-764.
- Dedonder, R., (1961) Glycosidases and transglycosidation. *Ann. Review. Biochem.* 30:347-382.
- Dedonder, R., (1966) Levansucrase from *Bacillus subtilis*. In *Methods in Enzymology*, ed. Neufeld E.F., Ginsburg G., Acad. Press, New York, Vol. 8, pp. 500-505.
- Dedonder, R., (1972) Role and mechanisms of transglycosylation reactions. *Biochemistry of the glycosidic linkages*. P.A.A.B.S. Symposium, 2, 21-76, Acad. Press, Inc. New York.
- Doi, R.H., M. McLaughlin (1992) *Biology of Bacilli (Applications to industry)*, for Biotechnology series. *Baierworth-Heinemann*. pp. 311-337.
- Doungling, S. & J. Robyt (1993) Control of the synthesis of dextran and acceptor products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase. *Carbohydr. Res.* 248:339-348.
- Fujita, K., K.Hara, H. Hashimoto & S. Kitahara. (1990) Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 54 No. 10:2655-2661.
- Fujita, Y., H. Tsubouchi, Y. Inagi, K. Tomita, A. Ozaki & K. Nakasishi. (1990) Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 70, No. 3, 150-154.
- Franz, G., A. Hessel & J. Kraus. (1988) Structure-activity relationship of immune modulating polysaccharides with an antitumor effect. In *Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides*. Gordon and Breach Science Publishers. pp. 241-249.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Szeimetz, E. Ferrari & J.A. Hoch (1983) Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* Vol. 153 no. 3:1424-1431.
- Gonzy-Triboulet G., R. Chambert, & Dedonder R., (1975) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: reexamination of some physical and chemical properties. *Biochimie*, 57,17-28.
- Gross, M., G. Geier, K. Rudolph & K. Geider.(1992) Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 40:371-381
- Han, Y.W. & M.Clark. (1990) Production and Characterization of Microbial Levan. *J. Agric. Food Chem.* 38, 393-396.
- Han, Y.W. (1989) Levan production by *Bacillus polymyxa*. *J. of Industrial Microbiol.* 4:447-452.
- Hayashibara-Biochem.; Biofermin-Pharm. (1991) Production of lactosucrose containing powder. Patente Japonica. J03290197; 19.12.91.
- Hayashibara-Biochem.; Enauko-Sugar-Refining. (1991) Powder with a high lactosucrose content. Patente Europea. EP-447125; 18.08.91.

- Hayashi, S., J. Kinoshita, M. Nonoguchi, Y. Takasaki & K. Imada. (1991) Continuous production of 1-kestose by β -fructofuranosidase immobilized on *Shirasu* porous glass. *Biotechnology Lett.* Vol 13 No. 6: 395-398.
- He, S-X., Y-T. Shyu, S. Nathoo, S-L. Wong, and R. H. Doi. (1991) Construction and use of a *Bacillus subtilis* mutant deficient in multiple protease genes for the expression of eukaryotic genes. *In Ann. NY Acad. Sci.*
- Hernández, L., J. Arrieta, C. Menéndez, R. Vázquez, A. Crego, V. Suárez, G. Selman, M-F. Petit-Glatron & R. Chambers. (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Aerobacter diaerophagicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309:113-118.
- Hestwer, U., M. Gross & K. Rudolph. (1995) Purification and Characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. of Bacteriol.* Vol. 177, No. 10:2834-2839.
- Hidaka, H., M. Hirayama & K. Yamada. (1991) Fructooligosaccharides. Enzymatic preparation and biofunctions. *J. Carboh. Chem.*, 10(4), 509-522.
- Hoon, K., J.Won, K. Rae, J. Yun & J. Hwang. (1989) Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 11, August: 491-494.
- Kunst, F., M. Pascal, J. Lepoint-Kejzarova, J.A. Lepoint, A. Billault, and D. Dedonder. (1974) Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochim.* 56:1481-1489.
- Kunst, F., T. Meadek, J. Bigson y G. Rapoport (1995) The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. *In Bacterial sensor kinases/response Regulator Systems (12th Forum in Microbiology)* p. 393-402.
- Kunst, F & F. Rapoport. (1995) Salt stress is and environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. of Bacteriol.* Vol. 177, No. 9, p.2403-2407.
- Kyono, K., H. Yanase, K.Toumura, H. Kawasaki & T. Sakai (1995) Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (3), 289-293.
- Laemmli, U.K.,(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* 227, 680-685.
- Lepoint, J.A., F. Kunst, J. Lepoint-Kejzarova, and R. Dedonder. (1972) Chromosomal location of mutations affecting sucrose metabolism in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 118:135-160.
- Lepoint, J.A., F. Kunst, M. Pascal, J. Lepoint-Kejzarova, M. Steimetz, and R. Dedonder (1976) Specific and pleiotropic regulatory mechanisms in the sucrose system of *Bacillus subtilis* 168. *In D. Schlessinger (ed.), Microbiology.* American Society for Microbiology. Washington. D:C: p.58-69.
- Liepa, V., G. Zakenfelds, E. Volpe, Z. Koronova, R. Lapsa, M. Laivenieks, M. Bekers & I. Pospisil. (1993) Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiated mice, and enhances the antitumor activity of leukocytes. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences B.* No. 5 (500) pp. 59-64.
- Lifely R. (1988) Polysaccharide antigens as vaccines against bacterial pathogens *In Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides.* Gordon and Breach Science Publishers. pp. 133-143.

- Lyness, E.W. & H.W. Doelle (1983) Levanosucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* Vol. 5. No. 5:345-350.
- Monsan, P. & F. Paul. (1995) Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews.* 16:187-192.
- Muramatsu, M. & T. Nakakuki. (1995) Enzymatic synthesis of novel Fructosyl and oligofructosyl trichaloses by *Aspergillus sydowi* β -fructofuranosidase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(2), 208-212.
- Nisshin-Sugar-Mfg. (1992) New oligosaccharide sweetener and its production. Patente japonesa. J04103593;06.04.92.
- Nisshin-Sugar-Mfg. (1993) Lactosylfructoside production using β -D-fructofuranosidase or levanosucrase from *Bacillus megaterium*. Patente japonesa. JP5130885.
- Nisshin-Sugar-Mfg. (1994) Sugar solution preparation with high xylosylfructoside content. Patente japonesa. JP05276970;26.10.93.
- Ohtaka, K., S. Hino, T. Fukushima, O. Ozawa, T. Kanematsu & T. Uchida. (1992) Characterization of levanosucrase from *Rhodospirillum rubrum* JCM-1683. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (9), 1373-1377
- Olmos, J. (1995) Instituto de Biotecnología UNAM, laboratorio de regulación de la expresión genética. Comunicación personal.
- Park, Y.K. & M.M. Almeida. (1991) Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. *W. J. of Microbiol. and Biotech.* Vol. 7, 331-334.
- Paul, F., E Oriol, D Auriol, R.M Willemot & P Monsan. (1984) Effect of maltose in the reaction of highly purified *Leuconostoc mesenteroides* B-512F debranching enzyme: Kinetic study and product characterization. In *Third European congress on biotech.* Vol. 383-388.
- Pseud-Loesel C., R. Dedonder (1957) The levanosucrase of *Bacillus subtilis*: II. Preparation of purified enzyme extract. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39, 499-520.
- Pérez, M.A. (1995) Producción y caracterización de una fructosiltransferasa de *Bacillus circulans*. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología UNAM.
- Pérez, M.A., L. Góeraca & A. López-Munguía. (1996) Acceptor reactions of levanosucrase from *Bacillus circulans*. *Ann. NY Acad. Sci.* Vol 799. 743-747.
- Pérez, M.A., L. Góeraca & A. López-Munguía. (1996) Properties of levanosucrase from *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:465-471.
- Perlot, P (1980) Production, Purification et application de la levane-saccharase de *Bacillus subtilis*. Thèse Doc. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Perlot, P. & P. Monsan. (1984) Production, Purification, and Immobilization of *Bacillus subtilis* levanosucrase. *Ann. NY Acad. Sci.* 434: 468-71.
- Petit-Glatron, M-F., R. Chambert & M. Steinmetz. (1980) Levanosucrase of *Bacillus subtilis*. characterization of a form isolated from phenol-treated cells and activated by Triton X-100. *J. Biochem.* 103:189-195.
- Pollock, C.J. (1986) Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytol.* 104:1-24.

- Rapoport G., et R. Dodonder (1963) La lévane-sucrase de *Bacillus subtilis*. III.- Réactions D'hydrolyse, de transfert et D'échange avec des analogues du saccharose. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 45: 515-535.
- Rapoport G., (1966) Propriétés générales et activités enzymatiques de la lévane sucrose purifiés de *Bacillus subtilis*. Thèse Doc. és Dvi. Univ. Paris.
- Robyt, J.F., B.K. Kimble & T. Walseth. (1974) The mechanism of Dextran sucrose Action. (direction of Dextran Biosynthesis). *Arch. of Biochem. and biophys.* 165,634-640.
- Robyt, J. (1986) Dextran. En: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Vol. 4 2nd. ed., pp. 752-767. Eds Mark F., M. Bikales, G. Overberger & G. Messey. John Wiley & Sons, Inc. N. York. E.U.A.
- Sánchez, M., (1996) Estudio cinético de las reacciones de aceptor catalizadas por la glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Sato, M., T. Matsuo, N. Orita & Y. Yagi. (1991) Synthesis of novel sugars, oligoglucosyl-isositols, and their growth stimulating effect for *Bifidobacterium*. *Biotech. Lett.* Vol. 13 No. 2: 69-74.
- Solvay-Enzymes. (1994) New thermostable acid levansucrase. Patente francesa. FR2691161; 19.11.93.
- Somshahin, A.L., J.A. Hoch and R. Leach. (1993) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology & Molecular genetics. *American society for microbiology, Washington, D.C.* pp. 463, 715-720.
- Spiegel, J. E., R. Ross, P. Karshell, V.H. Frankos & D.F. Schmitt. (1994) Safety and benefits of Fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.* January:85-89.
- Summer J.B. & S.F. Howell., (1935) A method for determination of invertase activity. *J.Biol.Chem.*, 108,51-54.
- Steinmetz, M., D. Le Cog, S.Amyerich, G. Gonzy -Tréboul & P. Gay. (1985) The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* 200:220-228.
- Tanaka, T., Oi S., & T Yamamoto. (1979) Synthesis of Levan by Levansucrase. *J. Biochem.* 85, N° 1, 287-293.
- Tanaka, T., S. Yamamoto, S. Oi & T. Yamamoto. (1981) Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J. Biochem.* 90:521-526.
- Whitfield, C. (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 34:415-420.
- Woo, J. (1996) Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation and application. *Enzyme and Microbial Technol.* 19:107-117.
- Yemm E.W. & Willis A. J. (1934) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57, 508-514.
- Yoshida, Y., R. Suzuki & Y. Yagi. (1990) Production of levan by a *Zymomonas sp.* *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 70, No. 4, 269-271.