

013072

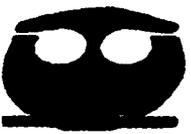


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UACPYF CCH Y FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A :
JULIA CASSANI HERNÁNDEZ



MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente
Secretario
Vocal
Suplente
Suplente

Dr. Agustín López-Munguía Canales
Dr. Rafael Vázquez Duhatl
Dr. Manuel Jiménez Estrada
Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Dr. Roberto Martínez

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Química de la UNAM y en el departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la asesoría del Dr. Manuel Jiménez Estrada y Agustín López-Munguía Canales

Esta tesis se realizó mediante el apoyo de una beca otorgada por CONACYT con no. de registro 88415 y una complementaria otorgada por DGAPA.

*La ciencia es orgullosa por lo mucho que ha aprendido;
La sabiduría es humilde por lo que sabe.*

William Cowper

*A mi madre por ser el apoyo más importante
siempre en el momento indicado.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales por brindarme un lugar en su grupo de trabajo y por sus siempre valiosas sugerencias para el desarrollo del presente.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por su infinita paciencia y apoyo en la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado por sus amables indicaciones para la mejor presentación de este manuscrito.

A los técnicos laboratoristas Fernando González Muñoz y María Elena Rodríguez por el apoyo brindado en algunas de las técnicas empleadas.

A todos aquellos que de manera directa e indirecta han sido parte importante de la realización de este proyecto cuyos nombres serían difícil de mencionar en tan breve espacio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
1. Objetivos Particulares	3
III. GENERALIDADES	4
1. Dextranas	5
2. Análisis de dextranas	9
3. Mecanismo de formación de dextranas	12
4. Dextranas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Producción de glucosiltransferasa	17
2. Fermentaciones alimentadas	18
3. Actividad enzimática	19
4. Lavado de la enzima	20
5. Síntesis de polisacáridos	20
6. Purificación de productos	20
7. Análisis de polímeros y carbohidratos	21
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
1. Producción de glucosiltransferasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523	23
2. Producción de polímeros	27
3. Evolución de la síntesis de dextrana insoluble	29
4. Estudio de los polisacáridos	33
VI CONCLUSIONES	42
VII BIBLIOGRAFÍA	44
VIII ESPECTROS	47

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro A.	Absorción en el IR de la dextrana insoluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523.	47
Espectro 1.	RMN de ^1H de la dextrana soluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512.	48
Espectro 2.	RMN de ^{13}C de la dextrana soluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512	48
Espectro 3.	Experimento de DEPT RMN de ^{13}C de la dextrana soluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512	49
Espectro 4.	Experimento de HETCOR de la dextrana soluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512	49
Espectro 5.	RMN de ^{13}C de la dextrana insoluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523 a temperatura de 34°C	50
Espectro 6.	RMN de ^{13}C de la dextrana insoluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523 a temperatura de 60 °C	50
Espectro 7.	RMN de ^{13}C de la dextrana insoluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523 a temperatura de 90 °C	51
Espectro 8.	RMN de ^1H de la dextrana insoluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523	52
Espectro 9.	RMN de ^{13}C de la dextrana insoluble de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523	52
Espectro 10.	RMN de ^1H de la dextrana y levana solubles de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523	53
Espectro 11.	RMN de ^{13}C de las dextrana y levana solubles de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-523	53
Espectro 12.	RMN de ^{13}C levana de <i>Bacillus subtilis</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Mecanismo de síntesis de un glucano de enlace $\alpha(1-6)$ para la dextranasa B-512 F	13
Fig. 2 Mecanismo para la formación de ramificaciones.	15
Fig. 3 Cinética de las fermentaciones alimentadas en la etapa inicial.	25
Fig. 4 Cinética de las fermentaciones alimentadas en la segunda etapa.	25
Fig. 5 Liberación de fructosa y consumo de sacarosa durante la reacción de síntesis de dextranas.	28
Fig. 6 Comportamiento de la viscosidad en el sobrenadante durante la reacción de síntesis de dextranas.	30
Fig. 7 Producción de DI y DS durante la reacción de síntesis	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Balance comparativo de la producción alimentada de glucosiltransferasa de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-523.	26
Tabla II.	Balance de materia de productos de la reacción de síntesis de dextranas.	29
Tabla III.	Producción de polisacáridos solubles e insolubles de la síntesis de dextranas empleando distintos porcentajes de sacarosa.	33
Tabla IV.	Cuantificación de los productos de hidrólisis de las dextranas obtenidas.	35
Tabla V.	Desplazamientos químicos (δ) de RMN de ^1H y ^{13}C para la dextrana obtenida de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512	37

RESUMEN

En años recientes se han hecho investigaciones sobre biopolímeros cada vez más complejos, una vez que se descubrió que tales biopolímeros están involucrados en un gran número de procesos bioquímicos.

Las glucosiltransferasas son enzimas que tienen la capacidad de transferir unidades de glucosa, a éste grupo enzimático pertenecen las dextran-sacarasas cuya capacidad de formar biopolímeros conocidos con el nombre de dextranas las ha hecho de interés científico. Estas cobraron importancia clínica por el efecto que poseen sobre el volumen plasmático, por mencionar solo alguno de sus usos.

En el presente trabajo se estudiaron los polisacáridos derivados de la acción de las enzimas de *Leuconstoc mesenteroides* NRRL B-523 sobre la sacarosa como sustrato.

Los resultados mostraron que ésta cepa posee al menos tres tipos de enzimas: dos dextran-sacarasas y una levansacarasa, las cuales produjeron tres tipos de polisacáridos: una dextrana soluble, una dextrana insoluble como producto principal con altas proporciones de enlaces $\alpha(1-3)$ de manera consecutiva y una levana.

I. INTRODUCCIÓN

Los procesos químicos que se llevan a cabo dentro de la célula prácticamente dependen de la acción de las enzimas. Ellas transforman en el interior celular las sustancias orgánicas e inorgánicas, mientras que en el exterior, digieren parcialmente las sustancias nutritivas para facilitar su paso al citoplasma.

Las enzimas son eficientes catalizadores bioquímicos que presentan un alto grado de especificidad. En general catalizan sólo un tipo de reacción y en ocasiones, un grupo de reacciones muy relacionadas.

El empleo de las enzimas en aplicaciones industriales puede darse con el microorganismo intacto en el caso de enzimas intracelulares, o bien de manera aislada al microorganismo productor. De ahí, que la importancia de los procesos de separación y purificación de enzimas sea fundamental para su utilización en las distintas reacciones para las cuales son requeridas en forma aislada. Por lo que, en los últimos años se ha generado en forma exponencial, tanto el conocimiento de las enzimas, como el de las reacciones que ellas catalizan, facilitando así, cada vez más, su empleo a nivel industrial.

Uno de los grupos enzimáticos más estudiados es el de las transferasas, las cuales constituyen el 25% de las enzimas conocidas (Jones *et al* 1992). Las transferasas tienen la capacidad de transferir una molécula de un donador a un aceptor específico. Dentro de este grupo se encuentran las glicosiltransferasas, importantes en los procesos metabólicos ya que transfieren unidades de azúcares, siendo de las más estudiadas las dextransacarasas (Sacarosa 1,6- α -D-glucan 6- α -D-glicosiltransferasa E.C. 2.4.1.5.)

Las dextransacarasas se producen por bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Betabacterium*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, siendo los dos últimos los más importantes (Jeanes *et al* 1954). Estas enzimas tienen la capacidad de sintetizar

una clase de polisacáridos conocidos como "dextranas", a partir de la sacarosa como sustrato (López-Munguía *et al* 1993). Si bien la mayoría de las dextranas son polímeros homólogos de glucosa con enlaces $\alpha(1-6)$ glucopiranosilos predominantemente y cuyos pesos moleculares promedio son superiores a 10^6 D (Oriol *et al* 1986), se encuentra que poseen diferencias importantes dependiendo del microorganismo y de la cepa de la cual proviene la dextranasa, así como de las condiciones del cultivo.

En el Instituto de Biotecnología y la Facultad de Química de la UNAM se ha venido trabajando con diversas glucosiltransferasas provenientes de *Leuconostoc mesenteroides*. Como ejemplo se pueden citar los trabajos de Durán (1990) en el cual se caracterizaron las glucosiltransferasas de la cepas NRRL B-1498 y B-523; Castillo *et al* (1991) en el que se produjeron dextranas y oligosacáridos con glucosiltransferasas de distintas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*; Sánchez (1996) que correspondió a un estudio cinético de reacciones de aceptor por la glucosiltransferasa de la cepa NRRL B-1299 de *Leuconostoc mesenteroides*.

El presente trabajo se ubica dentro del mismo contexto de estudios de glucosiltransferasas pero encaminado al estudio de los productos de reacción del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523, que tiene la particularidad de sintetizar, como producto principal un polímero insoluble.

II. OBJETIVOS

Estudiar los polisacáridos producidos por las enzimas del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523, empleando sacarosa como sustrato.

1. Objetivos particulares.

- 1.1. Producción y recuperación de las enzimas del sobrenadante de cultivo del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523 y determinación de la actividad enzimática.
- 1.2. Establecimiento de la condiciones de síntesis de los polisacáridos, así como el estudio parcial de la formación de la dextrana insoluble.
- 1.3. Obtención, purificación y análisis de los productos de reacción de las enzimas de *L. mesenteroides.*, empleando como sustrato sacarosa
- 1.4. Análisis de las estructuras mediante técnicas de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C de los productos de reacción, su interpretación y relación comparativa con la dextrana soluble de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y la levana de *B. subtilis*.

III. GENERALIDADES

La tecnología de los carbohidratos ha tomado mayor importancia en los últimos cinco años, marcados por el mejoramiento de la técnicas para su manejo, purificación, análisis de secuencia, síntesis y modificación de azúcares complejos. El conocimiento más profundo de las interacciones de tales carbohidratos con otras moléculas (proteínas, lípidos, etc.) así como el entendimiento de las relaciones función-estructura (composición y estereoquímica), ha resultado en la apertura de nuevos campos de investigación produciéndose con ello nuevas especialidades (por ejem. la glicobiología, glicofarmacología), generándose así la necesidad de la interacción de varias áreas del conocimiento para su estudio, dando como resultado una serie de aplicaciones en distintas ramas de la tecnología.

Uno de los campos en desarrollo ha sido el diseño racional de medicamentos para el cual existen dos opciones perfectamente definidas: el método enzimático que puede incluir inmovilización y reuso del catalizador, y el método químico. Ambos métodos tienen gran potencial, estando ya involucradas grandes empresas internacionales para tales estudios, como son: Alpha-Beta Technology (Worcester M.A.), Biomira Inc. (Edmonton, Alberta Canada), Genetics Institute (Cambridge M.A.), Oxford Glycosystems (Oxford U.K.), por mencionar algunas (Glaser V. 1994).

Los carbohidratos desempeñan un papel central en la actividad celular, ya que están involucrados en toda comunicación celular. Por ejemplo: en la superficie celular juegan el papel de comunicación célula-célula, reconocimiento e interacción; lo que hace evidente su potencial farmacológico.

Para la industria del plástico, los carbohidratos se presentan como materia prima para la creación de biopolímeros, los cuales pueden ser producidos a partir de

fuentes renovables, ser reciclables y sobre todo degradables (Levine and Fox, 1995). Tales biopolímeros encuentran sus usos como materiales de empaque, bolsas desechables, en productos de higiene personal (cosméticos), tazas de papel, etc.

Dentro de la industria alimentaria, además de la necesidad de texturizantes, existe también interés en la creación de nuevos edulcorantes bajos en calorías y no cariogénicos, algunos de los cuales pueden obtenerse por transformación de la sacarosa mediante enzimas (Jones *et al* 1992).

I. DEXTRANAS

La historia de las dextranas se inicia aproximadamente a mediados del siglo XIX, cuando su nombre fué propuesto por Schelber en 1869; él mismo encontró en 1874 que el espesamiento del jugo de caña era causado por un carbohidrato de rotación óptica positiva. Posteriormente Van Tiegen aisló en 1878 uno de los microorganismos causantes del espesamiento del jugo de caña, denominándolo *Leuconostoc mesenteroides* (Alsop 1983). Sin embargo, no fué sino hasta 1931 que se publicó el primer estudio detallado de las condiciones óptimas para la preparación de dextranas, empleando herramientas y métodos modernos de fermentación (Tarr y Hibbert 1931).

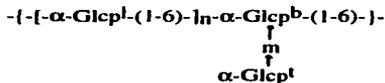
Los primeros trabajos sobre la síntesis enzimática de dextrana se llevaron a cabo por Hehre en 1946. La dextran sacarasa sintetiza la dextrana a partir de la sacarosa como sustrato y no se requiere de intermediarios fosforilados, ya que la energía necesaria se obtiene de la hidrólisis del enlace glucosídico de la sacarosa. Aunque la sacarosa es el sustrato específico para la dextran sacarasa, se ha encontrado que el fluoruro de α -D-glucopiranosil y el p -nitrofenil- α -D-glucopiranosido son también sustratos para la enzima (Robyt 1986). El desarrollo de nuevos procesos

biotecnológicos de edulcorantes bajos en calorías, no cariogénicos, y cuyo poder edulcorante es mayor al de la sacarosa, se refleja en la producción de este recurso natural. El hecho de que la dextranasa utilice como sustrato la sacarosa, la hace de valor como una de las posibles alternativas del empleo de esta fuente renovable.

Se ha estudiado un gran número de dextranas con propósitos industriales, como son ejemplo: su empleo como sustitutos del plasma sanguíneo, tamices moleculares, anticongelantes, aditivos para alimentos, gomas de alta viscosidad, etc., sin embargo muy pocos usos se han desarrollado hasta la escala industrial.

La dextrana mejor conocida y empleada industrialmente es la producida por el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512, la cual es una dextrana soluble que contiene 95% enlaces $\alpha(1-6)$ -D-glucopiranosídicos y 5% de enlaces $\alpha(1-3)$.

La mayoría de la dextranas que han sido estudiadas pueden describirse en términos generales de la unidad repetitiva:



donde:

- Glc** grupo o residuos D-glucopiranosilos
- n** número de residuos D-glucopiranosilos entre los puntos de ramificación
- m** número del átomo de carbono donde se ramifica (O-sustitución)
- t** identifica a un grupo terminal
- b** punto de ramificación
- l** residuo lineal

Uno de los estudios realizados con dextranas más interesantes, es el de Jeanes *et al* (1954). En tal estudio se revisaron las dextranas producidas por 96 bacterias de los géneros *Leuconostoc* y *Streptococcus*, las que se caracterizaron de acuerdo a su viscosidad, solubilidad, rotación específica y, mediante técnicas de oxidación con periodato, al porcentaje de enlaces que las constituyan.

Posterior a este estudio, Seymour y Knapp (1980) corroboraron mediante análisis de metilación y estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C , el porcentaje de algunos de los enlaces para las dextranas obtenidos por Jeanes *et al* (1954). Dichos autores presentan además una clasificación de las dextranas con base en sus características estructurales por sus datos de absorción en el Infrarrojo (IR) y RMN, dividiéndolas en 3 clases:

Clase I. Dextranas que contienen una cadena principal de residuos glucosídicos consecutivos unidos por enlaces $\alpha(1-6)$ y ramificaciones en 2, 3 ó 4.

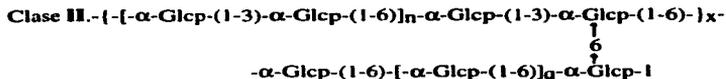
Clase II. Dextranas que presentan enlaces $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-6)$ con ramificaciones en la posición 3. El espectro de RMN de ^{13}C presenta señales a δ 83.3 ppm y 101.5 ppm.

Clase III. Dextranas que presentan enlaces consecutivos de tipo $\alpha(1-3)$ en la cadena principal con ramificaciones en $\alpha(1-6)$.

Las siguientes son las fórmulas generales propuestas para la clasificación de dextranas (Seymour y Knapp 1980).

Clase I. $-[-\alpha\text{-Glc}^{\text{a}}(1-6)]_n-\alpha\text{-Glc}^{\text{b}}(1-6)-$





Donde: **Glc**p representa un grupo o residuo α -D glucopiranosilo; **n**, el número de residuos D-glucopiranosilos entre los residuos del punto de ramificación; **m**, el número del átomo de carbono en el cual se presenta la ramificación (O-sustitución); **t**, identifica un grupo terminal; **b**, residuo de un punto de ramificación y **l**, residuo de cadena extendida lineal.

Una de las razones que ha hecho que las dextranas sean muy estudiadas en el caso de la industria de los alimentos es que presentan eficiencia hacia la exclusión, esto es que generalmente el comportamiento de sistemas de biopolímeros mezclados que no interactúan químicamente es dominado por la entalpía de las interacciones segmento-segmento. En muchos casos estas interacciones potenciales son de tipo endotérmico y no son favorecidas, dando origen a fuerzas de repulsión entre las macromoléculas, ocasionando esto la exclusión mutua de cada polímero a partir de las propiedades del otro, este fenómeno se refiere como incompatibilidad termodinámica. Los biopolímeros pueden interactuar físicamente para dar por ejemplo un sistema líquido de dos fases, un complejo insoluble y un fase insoluble agotada en ambos componentes. Estos dos sistemas han sido utilizados para generar productos texturizados. (Ledward 1993).

Los dextranas poseen también ciertas características que las hacen interesantes farmacológicamente. La primera dextrana clínica se introdujo cerca de los años 40's por su efecto sobre el volumen plasmático. Las dextranas modernas tienen básicamente tres efectos farmacológicos: (Medisan 1997)

-El primero es que la molécula de dextrana se expande y mantiene el volumen de

plasma en circulación por la absorción y retención de agua. Esta agua se obtiene de una solución inicial y por el agua de los espacios intersticiales en los conductos vasculares. Este efecto es característico de la dextranas de cualquier peso molecular, pero el efecto incrementa cuando aumenta el peso molecular.

-El segundo efecto se descubrió alrededor de los años 70's y es que previene la formación de trombosis. Esta propiedad es únicamente característica de las dextranas cuyo peso molecular es de 70000 D o menos y es todavía mejor para las dextranas de pesos moleculares más bajos, porque tienen la capacidad de disgregar los glóbulos rojos de la sangre.

-El tercer efecto se encontró en 1990 y es la capacidad de prevenir que los glóbulos blancos se unan al endotelio (tejido que cubre la cara interna de los vasos sanguíneos). Esto es relevante en situaciones donde el flujo sanguíneo temporalmente se corta y luego se reanuda; efecto conocido como isquemia-reperusión, ésta puede ser dañina porque cuando los glóbulos blancos se pegan al endotelio liberan oxígeno en forma de radicales libres.

2. ANÁLISIS DE DEXTRANAS

Dentro de los métodos más generalizados para el estudio de polisacáridos se encuentran:

2.1. Métodos físicos, como son la solubilidad, viscosidad, rotación específica (Jeanes *et al* 1954); los cuales nos permiten clasificar empíricamente a las dextranas. Un ejemplo de esta clasificación es en base a la solubilidad, para los polímeros de las cepas NRRL B-1299, B-1355 y B-742 de *L. mesenteroides*, de acuerdo al porcentaje de alcohol al cual precipitan, se consideran fracción más solubles (S) y menos solubles (L), denominándose como B1299S y B-1299L, para

posteriormente encontrar las diferencias químicas entre las estructuras de cada fracción (Seymour *et al* 1979).

2.2. Estudios químicos como son las reacciones de metilación, oxidación con periodato, acetólisis, hidrólisis; todos ellos encaminados al estudio de la estructura de las dextranas: el tipo de enlace en que se encuentran unidos los azúcares, la proporción de tales enlaces y de ser posible, la secuencia de esos enlaces.

2.3. El empleo de equipos que permiten aprovechar características fisicoquímicas de los compuestos a analizar. Tal es el caso de las técnicas de análisis espectroscópico, las cuales nos permiten distinguir entre varios tipos de enlaces y hacer una aproximación del porcentaje de esos enlaces.

Una de la primeras técnicas espectroscópicas usadas para diferenciar dextranas fué la absorción en IR. Se determinaron dos bandas de absorción importantes en correlación con el tipo de enlace involucrado en las dextranas; esas bandas se presentaron a 793 cm^{-1} en grupos que contienen enlaces del tipo (1-3) α -D-glucopiranosídicos y a 822 cm^{-1} que se presenta en las dextranas insolubles como una banda adicional a la de 793 cm^{-1} . Sin embargo se ha encontrado que la banda de 822 cm^{-1} se presenta únicamente cuando hay residuos de enlaces tipo (1-3) α -D-glucopiranosídicos de forma consecutiva, cuyas dextranas pertenecen a una clase III (Seymour y Knapp 1980). Esta conclusión se ha basado en los espectros de IR correspondientes a pseudonigeranas compuestas por residuos continuos de 3-mono-O-sustituídos α -D-glucopiranosilos y la ausencia de esta banda en D-glucanos que no contienen enlaces (1-3) α -D-glucopiranosilos en forma consecutiva.

Además de los estudios de IR, se ha prestado especial atención a la espectroscopía

de RMN de ^1H y ^{13}C . De los estudios de RMN de ^1H de grupos de dextranas que contienen varios tipos de ramificaciones y de hexoglicanos, se han establecido dos regiones espectroscópicas de importancia, las agrupadas en la zona de 3-4 ppm. y las señales de los hidrógenos anoméricos en la región de 4-6 ppm.

Para el análisis de RMN de ^{13}C se puede asumir como una primera aproximación, que las posiciones de los residuos como efectos de los grupos vecinos no necesitan considerarse. También, que la intensidad relativa de cualquier conjunto de resonancias asociado con un residuo específico es proporcional al porcentaje del residuo en el polímero. La validez de estas afirmaciones ha sido confirmada por comparación de la información obtenida del análisis de espectros de RMN de ^{13}C con la información estructural derivada de otras fuentes para aproximadamente 30 diferentes dextranas.

Los análisis de RMN de ^{13}C se basaron en las siguientes premisas: el total de los espectros de los polímeros son la suma de las contribuciones individuales de los diferentes tipos de residuos presentes y en que el número total de residuos ramificados esencialmente iguala al número total de residuos en grupos terminales (Seymour y Knapp 1980).

2.4. Finalmente, el empleo de técnicas tan sofisticadas como la difracción de rayos X, siendo ésta la técnica que mayor información proporciona. Se puede incluso obtener la estructura tridimensional del carbohidrato. Sin embargo, a pesar de ser una técnica de alta resolución no se ha empleado ampliamente en el análisis de carbohidratos dado lo difícil que ha resultado formar cristales de ellos, habiéndose logrado hasta 1995 la elucidación de solo 10 estructuras (Jeffrey 1994, Protein Data Bank 1995).

3. MECANISMO DE FORMACIÓN DE DEXTRANAS

Se han propuesto diversos mecanismos de reacción para explicar la síntesis de dextranas, así como de las ramificaciones que ellas poseen.

Entre los primeros estudios que propusieron un mecanismo está el de Robyt *et al* (1974) en el cual se propuso un mecanismo de inserción de dos sitios activos para explicar los datos en la síntesis de dextranas.

El mecanismo propuesto por Robyt y Eklund (1982), para la síntesis de una secuencia de residuos de glucosa unidos en $\alpha(1-6)$ (Fig. 1), para la dextrana de la cepa B-512 F de *Leuconostoc mesenteroides* involucra dos nucleófilos unidos al sitio activo, en el cual se ataca la sacarosa liberando la fructosa para dar dos intermediarios β -glucosilos (Fig. 1), el grupo C₆-OH de uno de los residuos glucosilos ataca al C₁ del otro para formar un enlace $\alpha(1-6)$, así uno de los residuos de glucosa se transfiere al otro, formando una unidad isomaltosil. A esto le sucede un nuevo ataque nucleofílico a otra molécula de sacarosa formando un nuevo intermediario enzima-glucosa. El C₆-OH de este nuevo intermediario ataca al C₁ de la unidad isomaltosil (cadena de dextrana en crecimiento), el cual es un efecto de transferencia del residuo de glucosa. Las unidades de glucosilos y dextranosilos se transfieren alternadamente entre los dos sitios nucleofílicos, conforme se va dando la elongación de la cadena de dextrana. La elongación de la cadena se termina y la cadena se libera por reacciones de aceptor, una de las cuales puede ser por una cadena de dextrana exógena para dar una unión de ramificación.

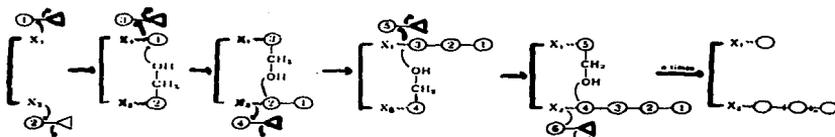


Fig. 1 Mecanismo para la síntesis de un glucano de enlace $\alpha(1-6)$ por la dextranasa B-512 F; X1 y X2 representan nucleófilos unidos al sitio activo. \circ sacarosa, \bigcirc glucosa, \triangle fructosa y dos residuos de glucosa unidos $\alpha(1-6)$. Robyt et al (1974)

Posteriormente Funane *et al* (1993), establecieron la validez de tal mecanismo mediante el estudio del número de sitios de unión de sacarosa unidos al sitio activo, el cual se determinó por el uso de diálisis de equilibrio con 6-deoxisacarosa, el cual es un fuerte inhibidor competitivo para la dextranasa. Para probar este mecanismo los autores inactivaron parcialmente la dextranasa haciéndola reaccionar con dietilpirocarbonato (DEP), el cual químicamente modifica las histidinas de los sitios activos esenciales. Las enzimas parcialmente inactivadas se probaron para la síntesis de dextranas y para la síntesis de productos de aceptor de maltosa. Ellos graficaron el logaritmo del porcentaje relativo de dextrana sintetizada y productos de la reacción de aceptor contra varios grados de inactivación enzimática (gráfica no mostrada en dicho artículo), de tal gráfica ellos observaron que la síntesis de dextrana disminuye en mayor grado que la síntesis de los productos de aceptor.

El mecanismo propuesto requiere dos sitios de sacarosa para la síntesis de la dextrana y solo un sitio de sacarosa para las reacciones de aceptor. Cuando un sitio está modificado la síntesis de la dextrana se detiene pero no así la síntesis de productos de aceptor, la cual continúa en el otro sitio. Por lo tanto la mayor

pérdida de la síntesis de dextrana en comparación con la menor pérdida de la síntesis de aceptores por enzimas modificadas en varios grados, proporcionó evidencia para el mecanismo de dos sitios para la síntesis de dextrana.

Para la formación de dextranas insolubles, Zahnley y Smith (1995) estudiaron la cepa B-1355 de *Leuconostoc mesenteroides*. Se conoce que este microorganismo produce al menos tres tipos de glucosiltransferasas (GTFs). Se identificó a la GTF-2 como una alternansacarasa y a la GTF-3 fracción L, como una dextransacarasa. Dichos autores encontraron que la GTF-1 fue el componente principal y la GTF-2 fué el componente minoritario de las fracciones del sobrenadante del cultivo. Sin embargo, el sobrenadante sintetizó glucano insoluble en agua. Tanto las fracciones del sobrenadante, como la GTF-1, produjeron patrones inusuales por HPLC que no se obtuvieron con las mezclas de GTF-2 y GTF-3. Las enzimas GTF-2, GTF-3 y la mezcla de ellas no tuvieron la capacidad de sintetizar glucanos insolubles, por lo que la GTF-1 es la enzima asociada a la producción del glucano insoluble. Este estudio se llevó a cabo a nivel enzimático, pero no se propuso un mecanismo de síntesis.

También Robyt y Taniguchi (1976) propusieron un mecanismo para la biosíntesis de ramificaciones con la dextransacarasa obtenida de *Leuconostoc mesenteroides* B-512. Ellos propusieron un mecanismo en el cual un aceptor de dextrana C₃-OH actúa como un nucleófilo sobre el C-1 del final reductor del complejo dextranosil-dextransacarasa (Fig 2), de tal modo la dextrana se libera de la dextransacarasa y forma una ramificación, por lo tanto no se requiere de una enzima ramificante, se pueden llevar a cabo por reacciones de aceptor de la dextrana con el complejo dextranosil-dextransacarasa

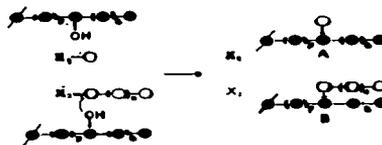


Fig. 2 Mecanismo para la formación de ramificaciones. Una cadena de dextrana externa se une a la unidad glucosil, formando un enlace $\alpha(1-3)$ glucosil-dextrana (A) o se une a la unidad dextranosil formando un enlace $\alpha(1-3)$ dextranosil-dextrana (Robyt y Taniguchi (1976)

Por otra parte, Robyt y Martín (1983) propusieron la formación de glucanos para el microorganismo *Streptococcus mutans* 6715, y encontraron que existe una enzima glucosiltransferasa que sintetiza solo glucanos solubles, mientras que existen dos isoenzimas glucosiltransferasas responsables de la síntesis de glucanos insolubles. Ellos estudiaron el mecanismo de síntesis de glucano por técnicas de pulso y búsqueda con ^{14}C -sacarosa, encontrando que la síntesis ocurre por transferencia de un grupo glucosilo a la terminal reductora de la cadena glucanosil, el cual se mantiene covalentemente unido al sitio activo.

4. DEXTRANAS DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523

De los primeros estudios realizados a la cepa B-523 de NRRL, se encuentra el de Jeanes *et al* (1954). En este, se clasifica a la cepa como formadora de dextrana insoluble, determinando mediante análisis de oxidación que el contenido de enlaces $\alpha(1-3)$ glucopiranosilos es del 24%. También mostraron que la dextrana insoluble que produce esta cepa se solubiliza en solución de hidróxido de potasio

1N. Posteriormente Durán (1990) estableció las condiciones de cultivo del microorganismo, así como sus parámetros cinéticos, encontrando siempre que la producción principal de la enzima glucosiltransferasa de esta cepa fué una dextrana insoluble. Finalmente, en el informe de Castillo *et al* (1992), quedan confirmadas la condiciones de cultivo para la ésta cepa, además de que se informó que el producto principal fué una dextrana insoluble con una producción del 90% con respecto a la sacarosa.

La dextrana B-523 fué clasificada por Seymour y Knapp (1980), dentro de una clase III de dextranas. A este grupo pertenecen una serie de dextranas consideradas como inusuales (B-1149 de *L.mesenteroides*), Zahnley y Smith (1995), sugiren que este tipo de dextranas inusuales podrían ser una fuente de valor para aditivos alimenticios, edulcorantes artificiales, etc. Estas dextranas ofrecen propiedades de interés para aplicaciones en alimentos, ya que presentan poder edulcorante atenuado, no se hidrolizan por enzimas digestivas de mamíferos y son un nuevo tipo de agente espesante con enfoque a la salud debido a que fermentan en el colon (promotor de bifidus).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PRODUCCIÓN DE GLUCOSILTRANSFERASA

1.1. Microorganismo.

El microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523 se obtuvo de la colección de Northern Regional Research Center, Peoria Illinois. Se partió de células liofilizadas, que una vez reactivadas se conservaron a 4 °C en una solución de glicerol a una concentración del 25% v/v. Las soluciones así preparadas se emplearon como iniciadores de inóculos para fermentaciones a nivel matraz. A partir de estos gliceroles se prepararon nuevos iniciadores al término de un año.

1.2. Medio de Cultivo.

La composición del medio de cultivo fué la siguiente:

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	20.0
Extracto de Levadura	20.0
K ₂ HPO ₄	20.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

En el caso de las fermentaciones alimentadas se empleó además:

Componente	Concentración
Maltosa	10 g/l
Tween 80 (Antiespumante)	1 ml

1.3. Preparación de Inóculos.

La activación del microorganismo se llevó a cabo en 50 ml de medio estéril. El microorganismo se creció a 30 °C y agitación orbital de 200 rpm por 12 hrs o hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 4, medida por turbidez a 650 nm de una muestra diluída 1:10, en un espectrofotómetro Spectronic 601. Con este medio posteriormente se inocularon en 0.5 ó 1 L de medio estéril, constituyendo el 10% del volumen total y manteniéndose en las mismas condiciones que el anterior.

2. FERMENTACIONES ALIMENTADAS.

2.1. Se realizaron fermentaciones alimentadas con el fin de disponer de suficiente enzima para los estudios, a nivel planta piloto en un fermentador Microfer Fermentor New Brunswick Scientific Co., equipado con una jarra de 14 L con volumen de trabajo de 10 L. El pH se reguló a 6.9 con la adición de una solución de sacarosa alcalina (sacarosa a una concentración de 400 g/l en hidróxido de sodio 2N), la agitación se mantuvo a 400 rpm, aireación de 0.5 v/v y temperatura de 29 °C. El inóculo fué del 10% del volumen total de trabajo.

2.2. De igual forma se efectuaron fermentaciones alimentadas a nivel laboratorio en un fermentador SGI (Sentric Genic Industriel) Mod. 72, con jarra de 2 L y volumen de trabajo de 1 L (sin antiespumante). El pH se reguló a 6.9 con la adición de una solución de sacarosa alcalina (sacarosa a una concentración de 400 g/l en hidróxido de sodio 2N), la agitación se mantuvo a 103 rpm, aireación de 0.5 v/v y temperatura de 29 °C. El inóculo fue del 10% del volumen total de trabajo.

Durante la fermentación se tomaron muestras cada hora y el crecimiento celular se determinó por turbidez a 650 nm (muestra diluida 1:10) en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer. A cada muestra se les ajustó el pH a 5.2 con ácido ortofosfórico, se centrifugó y se determinó la actividad de glucosiltransferasa en el sobrenadante.

2.3. Al final de fermentación se ajustó el pH a 5.2 con ácido ortofosfórico. La glucosiltransferasa del sobrenadante se separó por centrifugación de la masa celular, al sobrenadante se le agregó sacarosa a una concentración de 20 g/l para inducir la formación de polímero, adicionándose después una solución de PEG 1500 al 50% (v/v). Después de la separación de fases, la enzima se recupera por centrifugación, seguida de liofilización.

3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523 se cuantificó siguiendo la liberación inicial de azúcares reductores libres durante la reacción enzimática en presencia de 10% (w/v) de sacarosa a 30 °C en amortiguador de acetatos 50 mM y pH 5.2. Los azúcares reductores se determinaron por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Sumner 1935). Una unidad de actividad (UI) se define como la cantidad de enzima que libera un

micromol de fructosa por minuto a pH 5.2 y 30 °C.

4. LAVADO DE LA ENZIMA.

Parte de el componente enzimático liofilizado recuperado del sobrenadante de la fermentación, se lavó 3 veces con solución amortiguadora de acetatos con el fin de eliminar la actividad de polímeros solubles; se les midió actividad tanto a los 3 sobrenadantes obtenidos, como a la fracción insoluble recuperada.

5. SÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS.

La obtención de polisacáridos se realizó bajo las siguientes condiciones:

- Volumen de 300 ml de solución amortiguadora de acetatos 50 mM
- pH 5.2
- Temperatura 30 °C
- Concentración de sacarosa 10% (w/v)
- Actividad de enzima glucosiltransferasa (1 UI/ml).

6. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS.

Los polímeros insolubles se separaron por centrifugación. El precipitado (dextrana insoluble), fue lavado con agua destilada para eliminar carbohidratos y posteriormente liofilizarlo. El sobrenadante se dializó en membranas de diálisis Spectra/Por MWCO 3,500 contra agua destilada y posteriormente se liofilizó.

7. ANÁLISIS DE POLÍMEROS Y CARBOHIDRATOS.

7.1. Cromatografía en capa fina (CCF).

El seguimiento de los productos de reacción se llevo a cabo por CCF en placas cromatográficas de sílica gel HP-K de 10X10 cm de Whatman. Las placas fueron impregnadas con una mezcla de dietanolamina 0.1M y 10 mM de ácido acético en acetonitrilo y activadas a temperatura ambiente por una hora. La fase móvil fué acetonitrilo-agua 80:20 (v/v). El revelado de las placas se realizó rociándolas con una solución 4% de α -naftol en etanol, ácido sulfúrico y agua 80: 10: 10 (v/v), colocándolas en una plancha de calentamiento a 100 °C.

7.2. Hidrólisis de polímeros

Hidrólisis ácida. Para llevar a cabo la hidrólisis ácida se emplearon 50 mg de polímero en HCl con una concentración final de 6 N, a temperaturas de 30 °C y 80 °C, con tiempos de hidrólisis de 12 y 3 hrs. respectivamente..

Hidrólisis enzimática. Se empleó la enzima dextranasa (EC. 3.2.1.11) de *Penicillium* sp. obtenida de SIGMA. Se utilizaron 50 mg de polímero en 10 ml de solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 5.2, a 30 °C con 0.5 UI/ml de enzima dextranasa.

7.3. Análisis de carbohidratos

Análisis por Kit enzimático. Se midió fructosa y glucosa liberados durante las reacciones de síntesis de dextranas por medio de Bioanálisis enzimático (D-Glucosa/D-Fructosa, método de UV (Boehringer Mannheim).

La concentración de sacarosa se determinó por medio de un analizador bioquímico YSI 2700 Select (E.U), que tiene invertasa y glucosa oxidasa inmovilizadas en una membrana

7.4. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Se realizaron análisis de RMN en un equipo Varian Unity de 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C .

Dextrana Soluble de *L. mesenteroides*. NRRL 512: RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) δ ppm: 4.88 (d, H-1 $J=3.3$ Hz), 3.79 (m, H-5), 3.78 (dd, H-2, 9.6, 3.3 Hz), 3.72 (m, H-6A), 3.56 (m, H-6B), 3.53 (t, H-3, $J=9.3$ Hz), 3.33 (t, H-4, $J=9.6$ Hz).
RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ ppm: 97.3(C-1), 73.09(C-2), 71.1(C-3), 69.8(C-4), 69.2(C-5), 65.3(C-6).

Dextrana Insoluble de *L. mesenteroides*. NRRL 523: RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) δ ppm: 5.35 (d, H-1 α 1-3), 4.97 (d, H-1' α 1-6)
 ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O) δ ppm: 100.42(C-1), 98.367(C-1'), 82.7(C-3), 75.1 (C-5) 74.2(C-2'), 72.9(C-2), 72(C-3'), 71.2(C-4), 70.7(C-4'), 70.2(C-5'), 66(C-6'), 61(C-6).

Dextrana Soluble de *L. mesenteroides*. NRRL 523: RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) δ ppm: 4.8 (d, H-1)
RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ ppm: para la dextrana 98.4 (C-1), 74.1(C-2), 72.1(C-3), 70.9 (C-4), 69.9(C-5), 66.3(C-6) y para la levana 104.9 (C-2), 81 (C-5), 77.2(C-3), 76.2(C-4), 64.1 (C-6), 61.1(C-1).

Levana de *Bacillus subtilis* RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ ppm: 105 (C-2), 81.1 (C-5), 77.2(C-3), 76 (C-4), 64.2 (C-6), 60.8(C-1).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PRODUCCIÓN DE GLUCOSILTRANSFERASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523.

Para la obtención de la enzima glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523, en cantidad suficiente de forma que se pudieran llevar a cabo los estudios de reacciones de síntesis de polímeros, se realizó una fermentación alimentada de 10 L, empleando la metodología propuesta por López y Monsan (1980) y con la adición de maltosa al medio de fermentación para evitar el crecimiento de grandes cadenas poliméricas, así como Tween 80 que favorece la excreción de proteínas (Durán 1990).

La recuperación de la enzima se realizó empleando el fenómeno de separación por incompatibilidad de polímeros (Kula 1979), que se presenta al adicionar una solución de PEG hasta llegar a la concentración a la que existe separación de fases. En una de éstas, la enzima se particiona asociada a polímero, recuperándose así un porcentaje elevado y separado del resto de las proteínas del sobrenadante de la fermentación.

1.1. Estabilidad de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523.

Con la finalidad de establecer resultados reproducibles se llevaron a cabo fermentaciones, tanto en lote en matraz como fermentaciones alimentadas, verificando la producción de polímeros así como la estabilidad de la enzima en términos de actividad. En las figuras 3 y 4 se presenta la cinética de fermentación para fermentaciones alimentadas en dos etapas durante el desarrollo de este trabajo. La figura 3 corresponde a la cinética de crecimiento del microorganismo durante las primeras etapas del proyecto, preparado el inóculo a partir de un

liofilizado y la figura 4 a la cinética de crecimiento del microorganismo después de un período de meses de almacenamiento del microorganismo en glicerol.

Como puede observarse, en ambos casos la producción de enzima con mayor actividad se presenta entre la fase logarítmica y la fase estacionaria de crecimiento, en ambas etapas a partir de la quinta hora. La principal diferencia entre las dos curvas son los niveles de crecimiento y de actividad, siendo siempre muy bajos los correspondientes a la segunda etapa, los cuales se parecen más a los resultados de una cinética para fermentación por lotes (Durán 1990), y no a los resultados de una fermentación alimentada. Esto es posiblemente debido al tiempo en que los microorganismos se conservaron en medio con glicerol hasta realizar la resiembra (1 año). En ambos casos la actividad se midió solo en el sobrenadante, con el antecedente de que la enzima es extracelular.

Los rendimientos de las fermentaciones realizadas con el microorganismo *L. mesenteroides*, se presentan en la tabla I. Se muestran los valores de actividad recuperada y actividad al final de las fermentaciones, para distintas etapas de producción de enzimas. Los resultados de la primera etapa corresponden a la producción de enzima cuando el microorganismo se activó del liofilizado, en tanto, la segunda etapa se trata del mismo lote de liofilizado conservado en glicerol y sembrado al año. No se realizaron fermentaciones en lote cuando el microorganismo se encontraba activado del liofilizado.

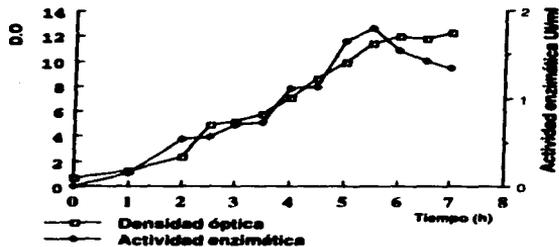


Fig. 3. Ejemplo de las cinéticas de fermentaciones alimentadas de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523, en la etapa inicial del proyecto (10 l).

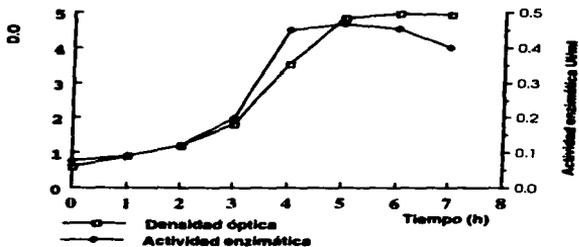


Fig. 4. Ejemplo de las cinéticas de fermentación alimentada para la segunda etapa del proyecto, de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523 (1 l).

La diferencia entre los valores correspondientes a la segunda etapa para fermentaciones alimentadas y en lotes, muestran la conveniencia de utilizar la fermentación alimentada en la producción de la enzima glucosiltransferasa.

Tabla I. Balance comparativo de diferentes fermentaciones para la obtención de glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523

	1a. Etapa	2a Etapa	2a. Etapa
Tipo de fermentación	alimentada	alimentada	Lotes
Volumen de fermentación	10L	1L	1L
Actividad recuperada*	427 UI/g	93 UI/g	19 UI/g
Actividad al final de la fermentación	1.3 UI/ml	0.45 UI/ml	0.20 UI/ml

* Después de la separación de fases con PEG y liofilizar.

De estos datos, se observa que al resembrar los microorganismos la cepa perdió estabilidad en cuanto a la producción de enzima glucosiltransferasa. En la tabla I, esto corresponde a los valores comparativos entre la primera y segunda etapa. Las causas por las cuales la actividad se ve drásticamente disminuida pueden ser diversas, para demostrar esto se requeriría de un estudio metódico en el que se resiembrase el microorganismo mientras se evalúa la producción enzimática, por lo que la estabilidad de la cepa sería objeto de un estudio diferente a los objetivos propuestos en este trabajo.

El comportamiento de la cepa fué reproducible en las fermentaciones posteriores, ya que al año se volvieron a preparar medios con glicerol para preservar al microorganismo. Sin embargo, nunca se recuperaron ni los niveles de actividad ni

el comportamiento de la enzima activada del microorganismo liofilizado, pero debido al avance logrado con la primera cepa y sus características se hará referencia principalmente al polímero obtenido por esta primera enzima.

2. PRODUCCIÓN DE POLÍMEROS.

Para poder estudiar el mecanismo de insolubilización de la dextrana sintetizada por la dextranasa de *L. mesenteroides* NRRL B-523, se establecieron las condiciones de síntesis de dextranas, que permanecieron fijas para todos los experimentos de síntesis de polisacáridos.

Con el fin de determinar el tiempo óptimo de síntesis de polisacáridos, se llevaron a cabo reacciones en las que se midieron los azúcares reductores y el consumo de sacarosa. Como se muestra en la figura 5, para una reacción de ocho horas (Durán 1990), la sacarosa que ha reaccionado corresponde al 90% del total, por lo que fue necesario alargar aún más el tiempo de reacción. Posteriormente se realizaron reacciones de síntesis, las cuales se siguieron por CCF durante diez horas. Mediante la CCF se pudo apreciar la desaparición total de sacarosa, así como el incremento de fructosa y glucosa a lo largo de cada reacción. Por lo tanto se consideró que diez horas de reacción eran el tiempo adecuado para que se consumiera toda la sacarosa adicionada como sustrato al inicio, bajo las condiciones previamente establecidas.

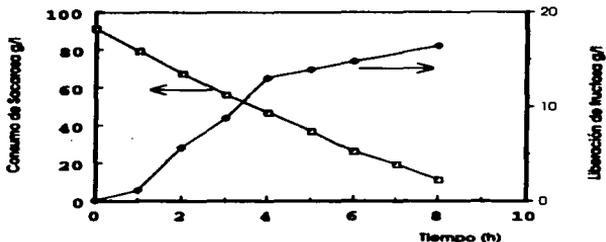


Fig. 5. Liberación de fructosa y consumo de sacarosa durante la reacción de síntesis de dextranas por dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523.

La purificación parcial del polímero insoluble se realizó centrifugándolo para separarlo de los otros productos de reacción solubles, lavándolo y finalmente eliminando el agua residual por liofilización. Por otro lado, no fue posible obtener el polímero soluble por precipitación alcohólica como se ha reportado comúnmente (Jeanes *et al* 1954), ya que la concentración de polímero fue muy baja, dificultando la recuperación. Por esta razón fue necesario purificarlo de los otros productos de reacción mediante diálisis del sobrenadante, para retener los polímeros de peso molecular mayor a 3,500 D y finalmente se liofilizaron.

En la tabla II se presenta el balance de materia de la reacción de síntesis de dextranas. Puede observarse que en este caso, la proporción de polímeros insolubles no es tan alta como la que se ha descrito en la literatura (Durán 1990, Castillo *et al* 1992). Sin embargo, al observar la cantidad de glucosa y fructosa liberados al medio, es evidente que existe un comportamiento enzimático diferente al informado con anterioridad para la dextransacarasa de este

microorganismo (Jeanes *et al* 1954, López *et al* 1992). Se observa una cierta cantidad de glucosa libre, no esperada en una reacción exclusivamente con dextran-sacarasa. Tal comportamiento puede deberse a la presencia de invertasas ó levansacarasas producidas al mismo tiempo que la dextran-sacarasa. Esta situación ha sido descrita para *L. mesenteroides* y *S. mutans*, habiéndose encontrado la presencia de levanas además de las dextranas que comúnmente se producen (Seymour y Knapp 1980).

Tabla II. Balance de materia de productos de la reacción de síntesis de dextranas: Base 30 g de sacarosa (aprox. 15 g de fructosa y 15 g de glucosa)

En términos de Glucosa	En términos de Fructosa
$Glu_T = Glu_L + Glu_{DI} + Glu_{DS} = 15 \text{ g}$	$Fruc_T = Fruc_L + Fruc_{Sol} = 15 \text{ g}$
$Glu_L = 4.02 \text{ g}$	$Fruc_L = 13.7 \text{ g}$
$Glu_{DI} = 8.70 \text{ g}$	$Fruc_{Sol} = \text{---}$
$Glu_{Sol} = 1.90 \text{ g}$	$Fruc_T \text{ Exp} = 13.7 \text{ g}$
$Glu_T \text{ Exp} = 14.62 \text{ grs}$	

Glu= glucosa; Fru=fructosa; Subíndices: T= total; L=libre; DI=Dextrana insoluble; Sol=solubles; T Exp= total experimental

3. EVOLUCIÓN DE LA SÍNTESIS DE DEXTRANA INSOLUBLE.

Dentro de las hipótesis iniciales de este trabajo, se planteó que durante la síntesis de dextrana insoluble se requería de un paso inicial de dextrana soluble, la cual sería insolubilizada posteriormente, esto de acuerdo a informes anteriores en los cuales se describía la producción de dextrana insoluble como producto principal

(98%), además de que durante la reacción de síntesis se observaba que a la quinta hora de reacción la dextrana se veía incrementada bruscamente (Castillo *et al* 1992, Durán 1990).

En este estudio se trataron de encontrar las evidencias experimentales que confirmaran esta hipótesis. La primera de ellas realizando determinaciones de viscosidad del medio durante la síntesis de las dextranas. Al encontrarse en fase soluble, la dextrana proporciona una cierta viscosidad al medio, la cual en el momento de insolubilizarse debería verse modificada.

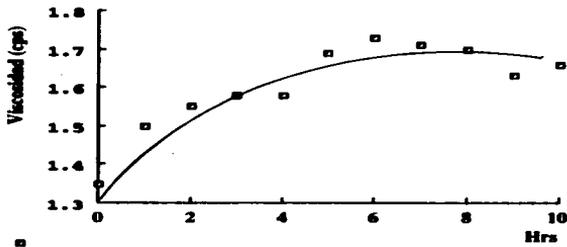


Fig.6. Comportamiento de la viscosidad en el sobrenadante durante la reacción de síntesis de dextranas

En la figura 6 se presenta el comportamiento de la viscosidad del medio en relación al tiempo de reacción. Como puede observarse no fué evidente un cambio en la viscosidad, es decir, no hay una disminución que mostrara la insolubilización del polímero provocando una caída en los valores de la viscosidad. Por el contrario, la viscosidad se incrementa ligeramente durante toda la reacción, lo cual sin duda corresponde a un incremento de la producción de

dextrana soluble durante toda la reacción.

Por lo anterior, se cuantificó la producción de dextranas durante la reacción. Como se muestra en la figura 7 en términos de peso seco la dextrana insoluble se presenta desde el inicio de reacción incrementándose hasta el final, mientras que la dextrana soluble muestra cierta producción durante las primeras 3 horas de reacción con una aparente estabilización a partir de ese tiempo y hasta que concluye la reacción. Como se observó en la tabla II, la cantidad de dextrana soluble es muy pequeña, lo cual no permitió recuperarla de los otros productos en el medio. Además, que para no afectar la reacción las muestras tomadas por hora fueron de 5 ml, por lo tanto, los resultados graficados incluyen sacarosa, glucosa y fructosa.

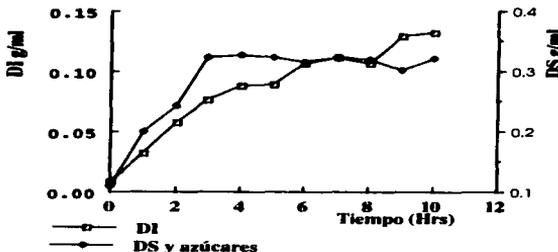


Fig. 7 Producción de dextrana insoluble y soluble durante la reacción de síntesis

Con el fin de corroborar la misma hipótesis se hicieron pruebas directas de la dependencia de la dextrana insoluble con respecto a la dextrana soluble. Se llevaron a cabo reacciones en las cuales se colocó dextrana soluble con la enzima. Al consumo total de sacarosa se cuantificaron los productos de reacción. Se

recuperó la dextrana soluble en la misma cantidad que la adicionada al inicio de reacción y además dextrana soluble que correspondería a la formada a partir de la sacarosa, así como dextrana insoluble también proveniente de sacarosa. Con este experimento se esperaba que la enzima por si sola llegara a utilizar la dextrana soluble por medio de reacciones de desproporción para formar la dextrana insoluble.

Por otra parte, se llevaron a cabo reacciones de síntesis de polisacáridos para las cuales se realizaron lavados con solución amortiguadora a la enzima (materiales y métodos). Al determinar la actividad de sobrenadantes e insolubles de tales lavados, se observó que los sobrenadantes tienen la capacidad de sintetizar dextrana insoluble y dicha capacidad disminuye de acuerdo al número de lavados, mientras que el insoluble se emplea para realizar una serie de reacciones de síntesis de polisacáridos como se describió en la metodología. En la tabla III se muestra la producción de polisacáridos empleando diferentes porcentajes de de sacarosa. Se observa que la fracción insoluble de la enzima presentó mayor producción de polímero soluble que de insoluble, esto significa que no toda la enzima que sintetiza polímero insoluble se encuentra asociada a éste y que parte de la enzima formadora de dextrana insoluble de ésta cepa, puede solubilizarse del liofilizado enzimático.

Por último, se hicieron reacciones disminuyendo la concentración de enzima y por ende la velocidad inicial de reacción con el propósito de alargar en tiempo los primeros eventos de la reacción. Sin embargo, aún a una concentración de enzima de 0.25 UI/ml de reacción, se encontró presencia de dextrana insoluble durante la primera hora de reacción. Al parecer la formación de dextrana soluble es paralela a la formación de dextrana insoluble.

Tabla III. Producción de polisacáridos solubles e insolubles de síntesis de dextranas empleando distintos porcentajes de sacarosa

% de sacarosa adicionada	% de conversión de sacarosa	Polisacáridos insolubles g/ 100 ml	Polisacáridos solubles g/100 ml
2	80	0.4622	0.194
4	67.5	0.532	0.615
6	73.3	0.6627	1.026
8	72.5	0.7559	1.0308

Con esta serie de experimentos observamos que la dextrana insoluble al parecer no requiere de una fase soluble para formarse, lo cual nos sugiere la posibilidad de dos tipos de enzimas glucosiltransferasas, una con capacidad de formar polímeros insolubles y otra de formar solubles, dichos resultados se asemejan a la cepa NRRL-1355 de *L. mesenteroides* en cuanto a la producción de glucosiltransferasas, ya que esta cepa presenta tres enzimas con capacidades distintas de formación de polímeros solubles e insolubles (Zahnley y Smith 1995). Los experimentos realizados no son concluyentes en cuanto a la detección de una fase soluble que preceda a la insoluble. Si necesita pasar por tal fase, ocurre de manera muy rápida en los primeros eventos de reacción y se puede ir dando rápidamente a lo largo de toda la reacción, pero como se verá más adelante, la diferencia de la dextrana soluble y la insoluble no solo es física, sino estructural.

4. ESTUDIO DE LOS POLISACÁRIDOS

Paralelamente a los estudios de síntesis de polímero insoluble, y con el fin de conocer más acerca de la composición y estructura de los polisacáridos

producidos por las enzimas del sobrenadante de cultivo de esta cepa de *L. mesenteroides*, se llevaron a cabo varios experimentos con los siguientes resultados.

4.1. Hidrólisis

Como primeros experimentos para obtener la composición de los polisacáridos (soluble e insoluble), se llevaron a cabo hidrólisis tanto ácidas como enzimáticas sobre los polímeros finales ya purificados.

Las hidrólisis ácidas se realizaron de manera exhaustiva, encontrando que el polímero insoluble esta compuesto únicamente por glucosa, mientras que en los análisis del polímero soluble se encontró glucosa y fructosa, ambas detectadas por CCF.

La hidrólisis enzimática no se consiguió de manera exhaustiva para la dextrana insoluble ya que sólo la hidroliza parcialmente, debido a que la dextranasa utilizada es específica para enlaces del tipo (1-6) α -D-glucopiranosilos. Los productos de reacción fueron isomaltosa, maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa, maltohexosa, además de residuos de polímero insoluble sin hidrolizar, mientras que para la dextrana soluble se detectaron isomaltosa, como último residuo de hidrólisis y maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa y maltohexosa, como residuos sin terminar de hidrolizarse. En ningún caso se encontró como producto la nigerosa (enlaces α 1-3). De estos resultados, se deduce que el polisacárido insoluble tiene una estructura más compleja que el soluble, ya que la dextranasa no lo hidrolizó totalmente a diferencia del soluble.

También se cuantificaron los productos de hidrólisis en términos de glucosa y fructosa mediante un kit enzimático. Los resultados se muestran en la tabla IV, donde se observa que para la dextrana soluble de la cepa B-512 (usada como referencia) e insoluble de la cepa B-523, están constituidas de glucosa 100%,

mientras que los resultados para el polisacárido soluble mostró que además de contener glucosa (por hidrólisis enzimática), contiene fructosa, (por hidrólisis ácida): ello nos presenta evidencia de que el polímero soluble está constituido por dos tipos de polímeros diferentes, que corresponden a una dextrana soluble y a una levana también soluble. Esto se comprobaría más adelante mediante los estudios espectroscópicos.

Tabla IV. Cuantificación de los productos de hidrólisis de las dextranas obtenidas.

Dextrana	Hidrólisis	Glucosa g/l	Fructosa g/l
Blanco (agua)	Ácida o enzim.	-	-
DS B-512	ácida*	1.2128	-
DI B-523	ácida	0.2691	-
DS B-523	ácida	0.3785	0.2361
DS B-512	enzimática**	0.2275	-
DI B-523	enzimática	0.1231	0.017
DS B-523	enzimática	0.1816	-

DS=dextrana soluble, DI=dextrana insoluble

*50 mg del polímero en 10 ml (6N HCl) y a 80°C

** 50 mg del polímero en 10 ml de solución amortiguadora de acetatos 50mM, pH 5.2, 30°C y 0.5 UI/ml de dextranasa.

4.2. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La dextrana insoluble de *L. mesenteroides* NRRL B-523 se ha considerado dentro de una clase III de dextranas (Seymour y Knapp 1980), indicando que una característica de esta clase de dextranas es que presentan una banda de absorción en infrarrojo (IR) a 822 cm^{-1} , por lo tanto inicialmente se llevaron a cabo estudios de IR. La dextrana insoluble, es un polímero amorfo pero al hidratarse y dejarlo

secar a temperatura ambiente sobre un vidrio forma una película transparente, por lo que se pudo realizar análisis de absorción en el IR mediante las técnicas de película y de pastilla (empleando la dextrana seca).

En ambos casos (IR de pastilla ó película), no se observó ninguna banda a 822 cm^{-1} , mientras que, las bandas correspondientes a los grupos hidroxilos fueron tan grandes y anchas que no fué posible detectar cualquier banda pequeña como lo indicada dicho autor. Se hicieron por tanto, ampliaciones de la zona entre 540 y 880 cm^{-1} (Espectro A). Con esta ampliación se pudo detectar la banda de absorción de 821.6 cm^{-1} correspondientes a enlaces del tipo (1-3) α -D-glucopiranosilos de forma consecutiva, no así la banda de 793 cm^{-1} . Este resultado concuerda con los resultados de análisis previos de metilación y oxidación con periodato, que la dextrana insoluble de esta cepa contiene una alta proporción de enlaces (1-3) α -D-glucopiranosilos.

Para los estudios de RMN se tomó como estándar a la dextrana soluble de *L. mesenteroides* B-512 con un peso molecular promedio de 500,000 D, la cual contiene una proporción de 95% de enlaces $\alpha(1-6)$ y 5% de enlaces $\alpha(1-3)$ (Van Cleve *et al* 1956). Espectros 1-4.

El espectro no. 1 corresponde a la RMN ^1H en la cual se aprecia claramente el H del carbono anomérico (δ 4.88 ppm, d ; $J=3.3$ Hz) el cual ocupa la posición ecuatorial (β) por lo que el carbono se encuentra en la posición axial y por consiguiente la unión C-O-C es de tipo α . La asignación de los demás hidrógenos se hizo apoyándonos tanto en la RMN ^{13}C , como en el experimento HETCOR (espectro no. 4).

La asignación de cada carbono (espectro no. 2 de ^{13}C) se llevó a cabo de acuerdo al desplazamiento de la glucosa. Es evidente el deslizamiento a campo más bajo de los C-1 y C-6 los cuales estan involucrados en el enlace (1-6) α -D-glucopiranosilos. El espectro no.3 (DEPT) nos muestra los carbonos que

corresponden a metinos (C-1 al C-5), δ entre 68 y 74 ppm. y el correspondiente al metileno del C-6 con δ 65.3 ppm.

Por último el espectro no. 4 corresponde a un experimento HETCOR en el cual se correlacionó cada carbono con su respectivo hidrógeno. La tabla IV presenta la asignación de carbonos e hidrógenos para la dextrana NRRL B-512. Con base en estas asignaciones, hacemos las referencias correspondientes y las diferenciaciones necesarias para el estudio de los espectros obtenidos para nuestras dextranas.

Por otro lado es importante considerar que la dextrana NRRL B-512 es una dextrana soluble de un peso molecular promedio a 500,000 D, por lo tanto se trata de un polímero poco disperso, habiéndose obtenido señales bastante definidas y con poco ruido espectral.

Tabla V. Desplazamientos químicos (δ) de RMN de ^1H y ^{13}C para la dextrana obtenida de *L. mesenteroides* NRRL B-512 en D_2O

No. de H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	No. de C	δ (ppm)
H-1	4.88	<i>d</i>	3.3	C-1	97.3
H-2	3.78	<i>dd</i>	9.6;3.3	C-2	69.3
H-3	3.53	<i>t</i>	9.3	C-3	73.1
H-4	3.33	<i>t</i>	9.6	C-4	71.1
H-5	3.79	<i>m</i>		C-5	69.8
H-6A	3.72	<i>m</i>		C-6	65.3
H-6B	3.56	<i>m</i>			

También cabe aclarar que los espectros obtenidos para las dextranas sintetizadas por las enzimas obtenidas en las diferentes etapas de fermentación de este

proyecto, tuvieron las mismas características y presentaron espectros similares, por lo que se presenta sólo una serie de espectros y no los correspondientes a cada polímero de las distintas síntesis.

Uno de los principales problemas que se presentó en la realización de los experimentos de RMN, para el análisis de la dextrana insoluble, fué el de dispersar al polímero en un disolvente adecuado. El polímero es insoluble en la mayoría de los disolventes de uso común en resonancia (DMSO, agua y piridina); por lo tanto, hubo que solubilizarlo bajo condiciones de basicidad (D₂O y sosa), obteniendo un pH cercano al 14. Aún así la solución se presentó muy viscosa y opalescente, por lo que no se pudieron realizar los experimentos de HETCOR y COSY

A la dextrana insoluble se le hicieron espectros de RMN de ¹³C a diferentes temperaturas dado que se encontró un informe previo (Seymour y Knapp 1980), el cual considera una temperatura de 90° como más apropiada ya que disminuye la viscosidad de la muestra y resuelve mejor las señales; en nuestro caso se encontró que a temperatura de aproximadamente 60° las señales son más claras, por lo que en lo sucesivo se llevaron a cabo a tal temperatura sin hacer ya referencia de ello. Los espectros 5 al 7 muestran ésta diferencia, el no. 5 corresponde a 34°, el no. 6 a 60° y el no. 7 a 90°.

El espectro no. 8 corresponde a la RMN de ¹H para la dextrana insoluble, las señales para los hidrógenos 2 al 6 no son claras debido a la poca solubilidad y alta viscosidad de la muestra, por lo que no se pudo calcular la constante de acoplamiento para el H-1 anomérico, sin embargo el la dextrana presenta enlaces de tipo α. El espectro para este polímero difiere ampliamente en cuanto a resolución se refiere con el espectro no. 1 de la B-512, puesto que se trata de una dextrana nativa dispersa.

La mayor información se obtuvo de la RMN de ¹³C (espectro no.9), el cual

muestra claramente 2 carbonos de tipo anomérico (C-1) con δ 100.4 y 98.3 ppm los que corresponden a C1 de los enlaces $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-3)$. La siguiente señal con 882 ppm es característica de C-3 para 3 mono-O- sustituidos. Los carbonos 2,4,5,6 y 2',3',4',5' que no están participando en los enlaces glucosídicos, se encuentran en la zona de 66-178 ppm, mientras que el C-6 correspondiente al enlace $\alpha(1-6)$ se encuentra a 66 ppm. Comparando este espectro con el no. 2 de la B-512, podemos diferenciar claramente que la dextrana insoluble está constituida por más de un tipo de enlace, puesto que las señales se encuentran multiplicadas y tenemos la presencia de dos tipos de carbonos anoméricos. Las señales que corresponden con las del espectro no. 2 (dextrana lineal) están marcadas del 1' al 6'

Por lo tanto, del espectro no. 9 se dedujo que la dextrana insoluble está constituida por enlaces $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-3)$ D-glucopiranosídicos, lo cual está acorde con los análisis de metilación realizados previamente a este polímero, los que indicaron estaba constituido del 66% de $\alpha(1-6)$, 24% $\alpha(1-3)$ y 10 % $\alpha(1-4)$ (Jeanes 1954). Ahora bien, los enlaces de tipo $\alpha(1-4)$ D-glucopiranosídicos, no se detectaron por las técnicas de RMN, este hecho ha sido informado con anterioridad por Seymour *et al* (1979): mediante el análisis de un amplio número de dextranas en el que encontraron que aquellas que presentaron porcentajes de enlaces de menos del 10% de abundancia no eran detectados por las técnicas de RMN.

Los espectros de la dextrana soluble muestran la evidencia concreta de la existencia de dos tipos de polisacáridos: una dextrana y una levana.

El espectro de RMN de ^1H (espectro 10), muestra una señal a δ 4.8 ppm correspondiente al H-1 anomérico de la dextrana y en la zona de 3.3-4.6 ppm se encuentran las señales que corresponden a los hidrógenos de la dextrana y levana, los cuales son difíciles de asignar debido a la amplia multiplicidad y poca

definición del espectro.

En el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 11), las señales correspondientes a cada carbono son más claras con respecto al hidrógeno. Los desplazamientos químicos siguientes: δ 98.4 (C-1), 74.1(C-2), 72.1(C-3), 70.9 (C-4), 69.9(C-5) y 66.3(C-6) (ppm), corresponden a la dextrana. Estas señales son las de mayor intensidad y son características de una dextrana lineal unida por enlaces $\alpha(1-6)$ D-glucopiranosídicos como puede observarse si se compara con las señales del espectro no. 2 de la B-512. Tanto el C-1 como el C-6 se encuentran desplazados a campo más bajo de la posición normal de la glucosa libre, por estar involucrados en el enlace glucosídico.

Con intensidades relativamente menores a la dextrana lineal, se encuentran las señales para la levana que presentó (ppm): 8104.9 (C-2), 81(C-5), 77.2(C-3), 76.2(C-4), 64.1 (C-6), 61.1(C-1). La asignación de cada carbono se llevó a cabo por homología con los análisis de compuestos β -D-fructofuranosilos de Seymour *et al* (1979), y con el espectro de una levana obtenida de *B. subtilis* (espectro no. 12). La levana se encuentra unida mediante enlaces $\beta(2-6)$ D-fructofuranosilos, ya que los carbonos involucrados en el enlace fructosa-fructosa se encuentran desplazados a campo más bajo de la posición normal de la fructosa libre. El C-2 aproximadamente se desplaza 6 ppm y el C-6, 3 ppm.

Finalmente, en relación a este espectro no se observan señales que indiquen la presencia de unión glucosa-fructosa de manera libre como sacarosa.

Con base a las asignaciones de los polímeros soluble e insoluble, encontramos que la diferencia entre ambas dextranas es en relación a la proporción y orden de enlaces que las constituyen: la dextrana soluble es un polímero lineal con enlaces $\alpha(1-6)$ D-glucopiranosídicos, y la dextrana insoluble esta ramificada y presenta uniones $\alpha(1-6)$ D-glucopiranosídicos, y $\alpha(1-3)$ D-glucopiranosídicos, éste último de forma consecutiva.

Así, la insolubilidad de dicha dextrana se basa en la distribución y alto porcentaje de los enlaces $\alpha(1-3)$ D-glucopiranosídicos, esto sucede con otras dextranas insolubles, por ejemplo la B-1355 de *L. mesenteroides*, que también está constituida por una alta proporción de enlaces $\alpha(1-3)$ D-glucopiranosídicos (Seymour *et al* 1979).

Si consideramos que la relación de enlaces $\alpha(1-6)$ a $\alpha(1-3)$, es de 3:1 determinado por análisis de metilación y oxidación con periodato (Jeanes *et al* 1954), y que los enlaces $\alpha(1-3)$ se encuentran de manera consecutiva, además de la alta posibilidad de que los enlaces $\alpha(1-3)$, se encuentren en la cadena principal (por analogías con otras dextranas de *L. mesenteroides*). Se piensa que sería remoto que la enzima formara primero largas cadenas de dextrana soluble que constara de enlaces $\alpha(1-6)$ consecutivos, y que después esta cadena se insolubilizara mediante la incorporación de enlaces $\alpha(1-3)$. Con base en estas reflexiones, y a que no encontramos alguna evidencia experimental que soportara la hipótesis planteada al inicio de este proyecto, se propone que la formación de las dextranas soluble e insoluble se llevan a cabo por dos enzimas glucosiltransferasas distintas, y que una no necesita de la otra para sintetizar la dextrana correspondiente. Para comprobar tal aseveración, habría que llevar a cabo la purificación de las enzimas del sobrenante de cultivo de la cepa B-523, definir los parámetros cinéticos para cada enzima, y posteriormente realizar los estudios de la síntesis de dextranas.

Por último, la necesidad del conocimiento profundo de los carbohidratos estructuralmente hablando, nos hace reflexionar en el establecimiento de técnicas de secuenciamento de azúcares, esto con el fin de poder sintetizarlos (enzimática ó químicamente) y de poder obtener compuestos miméticos basándose en el conocimiento de la secuencia y las interacciones de los carbohidratos con otras moléculas.

VI. CONCLUSIONES

Al analizar la estructura de los polisacáridos producidos por las enzimas presentes en el sobrenadante del medio de cultivo, se encontró que además de la producción de glucosiltransferasas, existe una levansacarasa responsable de la formación de un polímero de fructosa. De acuerdo con los estudios de RMN este polímero de fructosa es una levana que consta de enlace $\beta(2-6)$ muy similar a las levanas que se obtienen por *B. subtilis*.

La enzima glucosiltransferasa no tiene la capacidad de insolubilizar a la dextrana soluble, si se adiciona sin sacarosa. Además, la dextrana soluble no actuó como inhibidor de la síntesis de dextrana insoluble cuando se le adicionó la sacarosa como sustrato.

Mediante los estudios realizados durante la formación de dextrana insoluble, no se detectó que existiera una fase inicial de producción de dextrana soluble. Al parecer, pasando los primeros minutos de reacción ambos se sintetizan de manera paralela por lo cual se presentan desde los primeros eventos de reacción.

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-523 produce por lo menos tres diferentes enzimas: dos dextransacarasas y una levansacarasa

La principal diferencia estructural entre las dextranas insoluble y soluble está referida al tipo de enlaces. La DS es un dextrana lineal constituida por enlaces $\alpha(1-6)$ D-glucopiranosídicos, mientras que la DI se encuentra ramificada y posee además un 30% de enlaces $\alpha(1-3)$ D-glucopiranosídicos de forma consecutiva.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alsop R. (1983). Industrial production of dextrans. In *Process Industrial Microbiology* vol. 18. Ed. Buschel, M.E. Elsevier Scientific Publishing. Co. Amsterdam. 1-43.

Castillo E., Iturbide, F., López-Munguía, A. Palenc, V., Paul F & Monsan, P. (1992) Dextran and oligosaccharide production with glucoyltransferases from different strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 613:425-430.

Durán, P.E. (1990). Producción y caracterización de glucosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis: Maestría en ciencias. Alimentos. UNAM., México.

Funane, K., Shiraiwi, M., Hashimoto, K., Ichishima & Kobayashi, M.(1993) An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochem.* 32:13696-13702.

Glasser V.(1994) Carbohydrate biotechnology enter the domain of rational drug design. *Gen. Eng. News.* 12:6-7.

Hehre, E.J. (1946) Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. *J. Biol. Chem.* 163:221-233.

Jeanes, A. Haynes, W.C. Wilhan, C.A. Rankin, J.C. Melvin, E.H. Austin, J. M. Cluskey, J.E., Fisher, B.E. Tsuchiya, H.M. and Rist, C.E. (1954). Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 76:5041-5052

Jones, D.J., Hacking, J.A. and Cheetham S.J.P.(1992) Biological method for protection of 6 position of sucrose and its use in synthesis of disaccharide high-intensity sweetener. *Biotechn. and Bioeng.* 39: 203-210.

Jeffrey G.A. (1994) *Crystallography: A science for all seasons.*, IUCr *Newsletter*, 2, no. 1:7-8.

Kula, M.R. (1979) Extraction and purification of enzymes using aqueous two-phase systems. *Appl. Biochem. Bioeng.* 2: 71-95.

Ledward, D.A.(1993) Texture creation from a mixture of biopolymers systems. *Trends in Food Sci. & Technol.* 4:402-405.

Levine M.J., Fox J.S.(1995) Biopolymers Appear to offer many natural solutions to complex problems. *Gen. Eng. News.* 1:12-13.

López-Munguía A., Pelec, V., Remaud, M., Biton, J., Michel, J.M.,Lang, C., Paul, F., Monsan, P. (1993) Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans. *Enzyme Microb. Technol.*, 15:77-85

López, A. and Monsan, P. (1980). Dextran synthesis by immobilized dextran sucrose. *Biochimie.* 62:323-329.

Medisan (1997). <http://www.medisan.se/>

Oriol E., Auriol., Monsan P., Paul F. (1986) Acceptor reaction of a highly purified dextran sucrose with maltose and oligosaccharides application to the synthesis of controlled molecular weight dextrans. *Carbohydr. Res.* 144: 433-441.

Price, C.N., Stevens, L. (1989) *Fundamentals of Enzymology* Oxford University Press New York, 10-11

Protein Data Bank Quarterly(1995) *Newsletter* No. 73.

Robyt, J.F., Martin, P.J. (1983) Mechanism of synthesis of D-glucans by D-glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* 6715. *Carbohydr. Res.* 113:301-305.

Robyt, J.F., Eklund, S.H. (1982) *Bioorg. Chem.* 11:115.

Robyt, J.F., Taniguchi, H.(1976) The mechanism of dextransucrase action. *Arch. Biochem. Biophys.* 174:179

Robyt, J.F. (1986) Dextran. In: Encyclopedia of Polymer Sci. and Eng. Vol. 4. 2nd. ed. Mark, F.H., M.N. Bikales Ch. G. Overberger and G. Menyes (Eds) John Wiley & Sons, Inc. New York, USA pp.152

Sánchez, G.(1996) Estudio cinético de las reacciones de aceptor catalizadas por la glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. UNAM.

Seymour, R.F., Knapp, D.R. (1980). Structural analysis of dextrans, from strains of *Leuconostoc* and related genera, that continue 3-O- α -D-glucosylated α -D-glucopyranosyl residues at the branch points, or in consecutive, linear positions. *Carbohydr. Res.*, 81: 105-129.

Seymour, R.F., Knapp, D.R., Bishop, H.J.(1979) Correlation of the structure of dextrans to their ^1H NMR spectra. *Carbohydr. Res.* 74:77-92

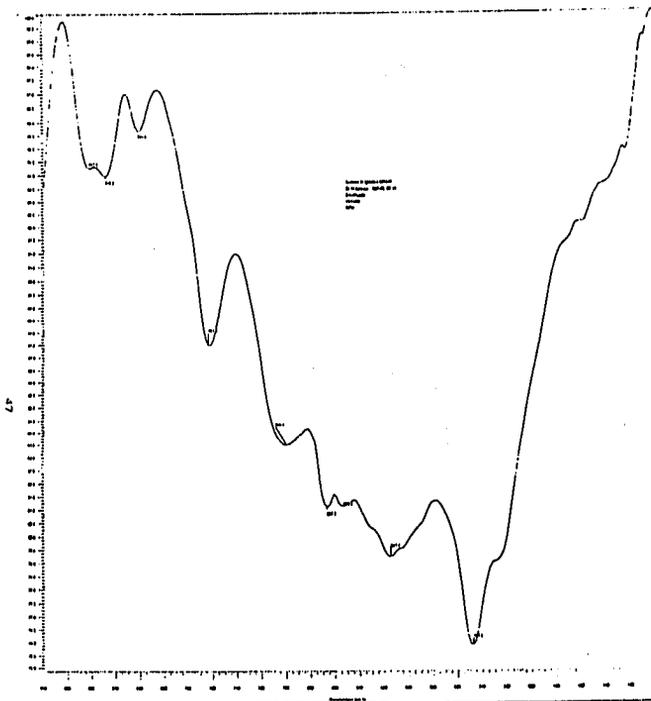
Sumner, J. Howell, S.(1935) A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108:51-54.

Tarr, H.L.A and Hibbert, H. (1931). Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. *Can. J. Research.* 5:414-427

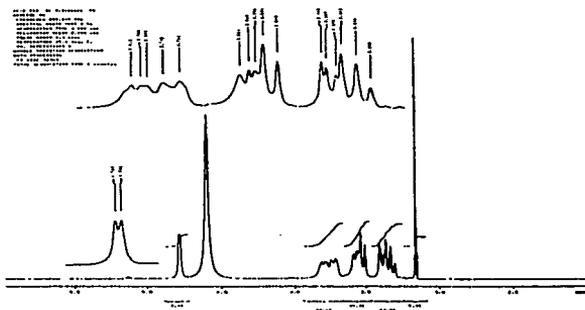
Van Cleve, J.W., Shafer, W.C. and Riut, C.E. (1956). The structure of NRRL B-512 dextran. Methylation studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 78:4435

Zahnley, J.C., Smith, M.R. (1995) Insoluble glucan formation by *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(3):1120-1123

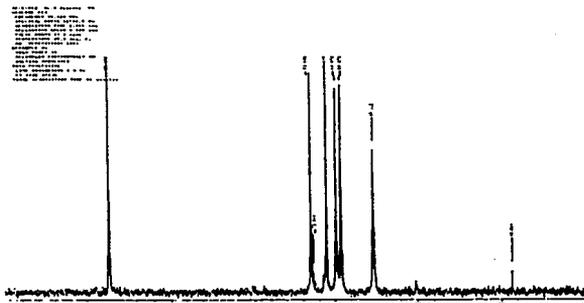
VIII. ESPECTROS



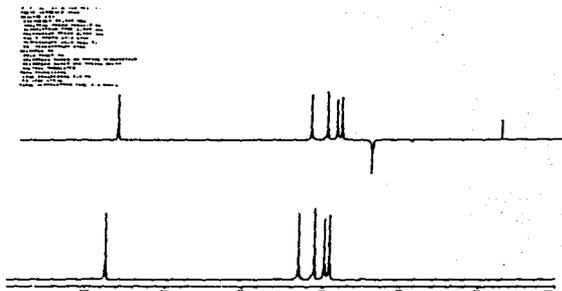
Espectro A. Absorción en el IR de la dextrana insoluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523.



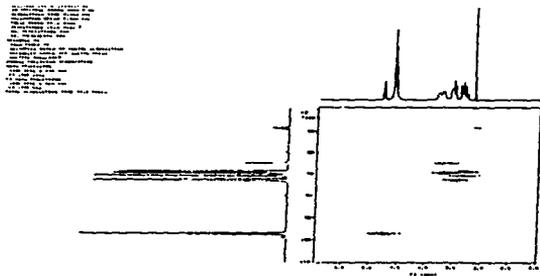
Espectro 1. ^1H RMN de la dextrana soluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512.



Espectro 2 ^{13}C RMN de la dextrana soluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512



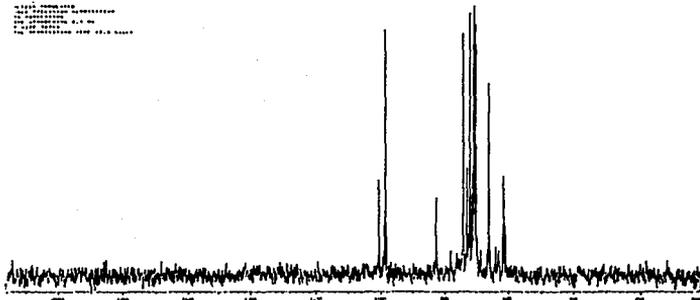
Espectro 3 Experimento de DEPT ^{13}C RMN de la dextrana soluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512



Espectro 4. Experimento de HETCOR ^{13}C RMN de la dextrana soluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512

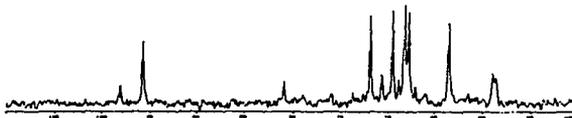
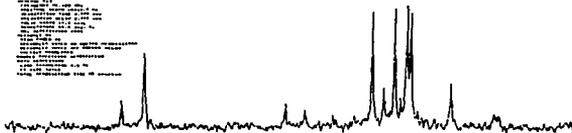
**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

13C RMN
 125 MHz
 100% DMSO-d6
 34°C
 100% DMSO-d6

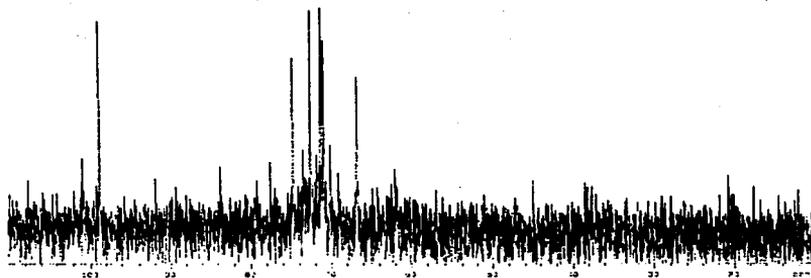


Espectro 5. ^{13}C RMN de la dextrana insoluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523 a temperatura de 34°C

13C RMN
 125 MHz
 100% DMSO-d6
 60°C
 100% DMSO-d6



Espectro 6. ^{13}C RMN de la dextrana insoluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523 a temperatura de 60°C



Espcros 7. ^{13}C RMN de la dextrana insoluble de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523 a temperatura de 90 °C

