

EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F.

Vladimir del Rosario Arreortúa y Maricarmen Quirasco Baruch.

L-312 Conj. E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México. Fax: (52)(55) 5622-5309. Correo electrónico: quirabma@servidor.unam.mx

Palabras clave: *Leuconostoc mesenteroides*, fuente de nitrógeno, proteólisis

Introducción. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F se caracteriza por producir una dextran-sacarasa (DS) de aplicación industrial. Recientemente se reportó la presencia de actividad proteolítica (*A. P.*) extracelular que modifica post-traduccionalmente a la DS producida (1). Tal actividad se encuentra presente también en otras cepas de *Leuconostoc mesenteroides* (2). A diferencia de otras bacterias lácticas su producción es muy baja en este microorganismo. Por lo que, el establecimiento de un método de cuantificación altamente sensible, preciso y reproducible representa un factor muy importante para su estudio.

En este trabajo, se evaluaron varios métodos para cuantificar la *A. P.* y una vez establecido el método, se caracterizó tal actividad en términos de: a) estabilidad al almacenamiento a -20°C , b) cinética de producción en cultivo por lote en matraz y en fermentador instrumentado y c) el efecto de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo en su producción.

Metodología. La *A. P.* se determinó previa concentración del sobrenadante 15X por ultrafiltración. Métodos evaluados: Hide powder azure (1), azocaseína (2) e hidrólisis de caseína calidad Hammerstein (3). La *A. P.* se calcula como unidades equivalentes con respecto a una curva patrón de tripsina. La actividad específica se reporta con respecto a la proteína total del cultivo, determinada por Lowry. Cultivo en matraz (250mL): 50 mL de medio, 200 rpm (orbital), 30°C . Cultivo en fermentador (1L): 750 mL de medio, 0.5 vvm, 400 rpm, pH controlado a 6.9, 30°C . Biomasa determinada por D. O. 600nm. El medio de cultivo base es el reportado previamente (2), cuya fuente de nitrógeno es extracto de levadura Bioxon (0.102 g N/100g medio, determinado por Kjeldahl). La N nitrógeno se ajustó al mismo valor con las otras fuentes utilizadas: extracto de levadura (E.L.) Difco, bactopectona, triptona, casaminoácidos y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, las que se analizaron por SDS-PAGE. Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento para cada medio y se cuantificó la *A. P.* en la misma fase de crecimiento para todos los casos.

Resultados y discusión. La determinación espectrofotométrica de aminoácidos aromáticos (280nm), producto de la hidrólisis de caseína, resultó ser un mejor método con respecto a la cuantificación de color resultante de la hidrólisis de los complejos proteína-colorante presentes en la azocaseína y el Hide powder azure. Su reproducibilidad fue muy buena, a comparación de los otros métodos, obteniéndose coeficientes de variación en promedio menores

a 5, lo que representa una diferencia no significativa entre repeticiones.

El tiempo de vida media de la *A. P.* al almacenar los sobrenadantes concentrados en congelación fue de aproximadamente 15 días, por lo que las muestras se analizaron inmediatamente después de concentrar.

El cultivo en matraz presentó el máximo de *A. P.* a la mitad de la fase log (0.0149 U Trip/mg proteína). En fermentador se obtiene el máximo de actividad también en la fase log, pero ésta es un orden de magnitud menor (0.0027 U Trip/mg proteína).

En la Fig. 1, se observa que la *A. P.* depende de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo. De acuerdo al análisis electroforético de las fuentes de nitrógeno se observa que existe una mayor *A. P.* en los medios que tienen proteínas de mayor tamaño y menor actividad en las que hay péptidos y aminoácidos (bactopectona y casaminoácidos). Es interesante que se obtiene 8 veces más *A. P.* en el medio con nitrógeno inorgánico.

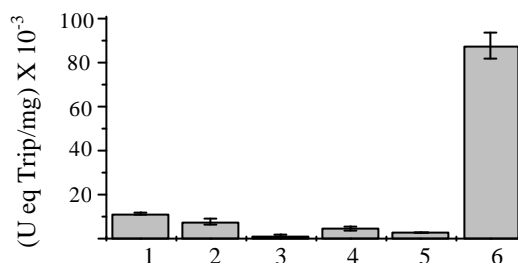


Fig. 1. *A.P.* en diversas fuentes de nitrógeno. 1. E.L. Bioxon, 2. E.L. Difco, 3. Bactopectona, 4. Triptona, 5. Casaminoácidos, 6. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Conclusiones. La *A. P.* no sólo actúa para procesar a la dextran-sacarasa, si no para la obtención de nutrientes nitrogenados. Su producción no se favorece bajo las condiciones prevalecientes en el fermentador instrumentado.

Agradecimiento. Proy. Instalación CONACyT I 35590-B.

Bibliografía.

- Sánchez, M. *et al.* (1999). Effect of proteolytic processing on the properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextran-sucrase forms. *FEMS Microbiol. Letters* 181:25-30.
- Navarro, M. Estudio de la presencia de actividad proteolítica en varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. (2000). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean Trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 30:291-301.