

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F AL SUBCULTIVAR

Maricarmen Quirasco Baruch y Mariana Chacón Romero.

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

Leuconostoc mesenteroides, dextran-sacarasa, fermentación en continuo

Introducción. *L. mesenteroides* NRRL B-512 F produce una dextran-sacarasa (DS) extracelular (E.C. 2.4.1.5), que en presencia de sacarosa sintetiza dextrana, homopolisacárido exocelular soluble de alto peso molecular, que contiene enlaces α (1 \rightarrow 6) consecutivos y un bajo porcentaje de ramificaciones en α (1 \rightarrow 3). La DS de esta cepa y su polímero han sido ampliamente estudiados y utilizados industrialmente en los campos alimentario, químico y farmacéutico. Se ha observado una variabilidad en la producción de la DS al subcultivar y, a pesar de su importancia industrial, no existen reportes que la describan. En el presente trabajo se estudia la variabilidad en la producción de DS de la cepa B-512F de *L. mesenteroides* en resiembra sucesivas en cultivo por lote y durante varias generaciones en cultivo continuo.

Metodología. Se analizaron diez resiembas sucesivas de cultivos por lote en términos de actividad DS, patrón de azúcares fermentables por las células (Api 50 CHL, bioMérieux) y patrón electroforético del sobrenadante de cultivo (SDS-PAGE y actividad *in situ*) (1). Adicionalmente se realizó un cultivo continuo durante siete generaciones. Los sobrenadantes de cultivo de diferentes tiempos de fermentación fueron analizados por HPLC. La actividad DS se cuantificó por producción de azúcares reductores determinados con DNS (2). Una unidad de actividad DS (U) se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de fructosa por minuto (pH 5.4, 30°C) en condiciones estándar (1). La Actividad Específica se reporta como U por miligramo de proteína total de cultivo. La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry modificado (3). Los resultados se analizaron estadísticamente (SPSS v.8).

Resultados y discusión. El cultivo por lote se detuvo al final de la fase exponencial de crecimiento (D.O. $_{600\text{ nm}}$ 11-13), donde se observa el máximo de actividad DS. La actividad DS específica presentó un máximo en la 5ª resiembra, mientras que la tercera se distinguió por presentar la menor actividad (Fig. 1 A). Las diferencias entre resiembas fueron estadísticamente significativas. El patrón electroforético de proteínas y el análisis de consumo de carbohidratos no mostraron diferencias aparentes con respecto al número de resiembas. Tampoco se observó la aparición de DS de diferentes masas moleculares, corroborado por el ensayo de actividad *in situ*, por lo que no es evidente un procesamiento proteolítico al contrario de lo que se hubiera esperado (4).

El cultivo continuo se estableció al final de la fase log con una tasa de dilución de 0.35 h⁻¹. En este cultivo se observó un máximo de actividad en la 5ª generación y un mínimo en la 6ª y 7ª (Fig. 1 B). El análisis de sobrenadantes de diferentes tiempos de fermentación en continuo reveló la producción de manitol. Este hecho es interesante ya que la producción de este metabolito no se había reportado previamente en cultivos por lote.

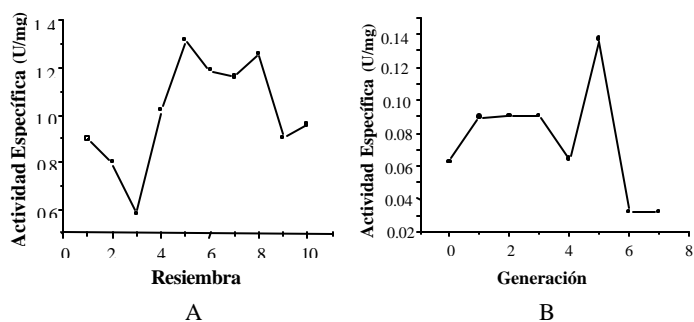


Fig. 1. Actividad DS específica por lote (A) y en continuo (B).

Conclusiones. Los resultados obtenidos demuestran que sí existe variabilidad en la actividad DS al subcultivar en lote y también en la obtención de nuevas generaciones en el sistema en continuo. Probablemente existe la producción de algún metabolito que modifique la actividad enzimática, lo que se refleja en una disminución de actividad. Por otra parte, *L. mesenteroides*, a diferencia de otras bacterias lácticas, no tiene una variabilidad importante en la capacidad de consumo de carbohidratos al subcultivar.

Agradecimiento. Financiamiento Proyecto de Instalación CONACyT I 35590-B.

Bibliografía.

- Quirasco M. *et al.* (1999). Induction and transcription studies of the dextran-sacarase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12):5504-5509.
- Sumner, J.B. y S.F. Howell. (1935). A method of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108: 51-54.
- Lowry, O. H. *et al.* 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Sánchez, M. *et al.* (1999). Effect of proteolytic processing on the properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextran-sacarase forms. *FEMS Microbiol. Letters* 181:25-30.