

# CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE ENZIMAS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR *RAOULTELLA TERRIGENA* Y *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

por

Ángela María Wilches Flórez\*

## Resumen

**Wilches Flórez, A.M.:** Caracterización preliminar de enzimas relacionadas con la síntesis de exopolisacáridos producidos por *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **28** (109): 577-583, 2004. ISSN: 0370-3908.

Se realizó el aislamiento y caracterización de dos cepas bacterianas nativas productoras de exopolisacáridos (EPS). Con estas cepas se llevó a cabo la producción y análisis de la enzima implicada en la síntesis de EPS con el objeto de determinar la actividad enzimática. Las cepas fueron identificadas como *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens*. *R. terrigena* produce la enzima intracelularmente y por mecanismo de inducción; la enzima sintetizada por *P. fluorescens* es extracelular y de expresión constitutiva.

**Palabras clave:** exopolisacárido, polímero, enzima, sustrato, inductor.

## Abstract

The isolation and characterization of two native bacterium strains that produce exopolysaccharides (EPS) was done. With these strains we produced and analyzed the enzyme implicated in the synthesis of (EPS) with the objective of determining the enzymatic activity. These strains were identified as *Raoultella terrigena* and *Pseudomonas fluorescens*. *R. terrigena* produce the enzyme intracellularly and through an the induction mechanism. The enzyme synthesized by *P. fluorescens* is extracellular and of constitutive expression.

**Key words:** exopolysaccharides, enzyme, substrate, inducer, polymer.

\* Profesora Asociada, Departamento de Microbiología Universidad de Pamplona- Colombia. Instituto Jacques Monod-París-Francia. angelamaw@unipamplona.edu.co

## Introducción

El crecimiento bacteriano frecuentemente esta acompañado por la producción de polisacáridos los cuales se localizan fuera de la pared celular. Estos exopolisacáridos (EPS) se encuentran como cápsulas unidas a la bacteria o esta los libera al medio como limo. Un polisacárido puede tener importancia para una bacteria ya sea en procesos de adhesión, infección (Hettwer *et al.*, 1995) y protección (Gamar *et al.*, 1997, von Wrigth *et al.*, 1987) pero también pueden tener valor comercial. Muchos polisacáridos son conocidos por sus propiedades gelificantes, otros tienen propiedades emulsificantes y otros pueden servir como fuente importante de monosacáridos. Un polisacárido tiene valor comercial dependiendo de su composición característica, la cantidad producida por cultivo y la facilidad de recolectar y procesar el polisacárido. Aunque la composición y cantidad del EPS microbiano producido esta determinada genéticamente es posible influenciar las dos por alteraciones de las condiciones del cultivo (Mozzi *et al.*, 1996). La formación de EPS generalmente se ve favorecida por la presencia de nutrientes carbohidratados en exceso y las bajas temperaturas; tanto el rendimiento como la composición del EPS puede ser influenciado por nutrientes limitantes en N, C, P y Sulfuro (Bryan *et al.*, 1986). Se ha encontrado que el  $MnSO_4$  ejerce efecto estimulador en la producción de polisacárido por cepas de *Lactococcus casei*; el pH del cultivo también es un factor crítico, los valores cercanos a la neutralidad son los mejores para la producción del polímero (Kojic *et al.*, 1992).

Los polímeros y oligosacáridos microbianos son producidos por la acción de enzimas, principalmente las transferasas. Estas tienen la capacidad de transferir residuos glicosídicos a una gran variedad de aceptores como alcoholes primarios, azúcares simples o cadenas glicosídicas, dando origen a una variedad de polisacáridos y oligosacáridos de interés comercial, entre estos polisacáridos se pueden citar las xantanas, dextranas, pululanas, alginatos, levanas, entre otras (Pérez *et al.*, 1995). Con la realización de este trabajo se quiere hacer el estudio preliminar de la enzima involucrada en la síntesis de EPS producidos por dos cepas bacterianas nativas colombianas capaces de sintetizar polisacáridos extracelulares, adicionalmente el proyecto hace una contribución a la caracterización de la biodiversidad bacteriana presente en diferentes ambientes para explorar su uso potencial en el área de la biotecnología.

## Materiales y métodos

**Microorganismos:** las dos cepas bacterianas objeto de estudio fueron aisladas en el laboratorio de Microbio-

logía de la Universidad de Pamplona- Colombia. Los aislamientos se realizaron a partir de muestras de guarapo, bebida típica colombiana obtenida como producto de la fermentación de diversas frutas y panela (producto elaborado con caña de azúcar). Los aislamientos fueron incubados a temperatura de 25°C durante 48 horas, el criterio de selección de las cepas fue la obtención de bacterias capaces de crecer en agar sacarosa, produciendo colonias de aspecto mucoso.

**Caracterización de las cepas:** las bacterias fueron caracterizadas en el Centro de Identificación Molecular de Bacterias del Instituto Pasteur, utilizando el sistema de identificación bioquímica Biotype-100 (BioMérieux) y el programa Recognizer (Instituto Pasteur Toxolab) en Macintosh (Apple Computers); y caracterización molecular por medio de la técnica de ARN r 16S.

**Producción de la enzima:** el cultivo para la producción de la enzima se llevó a cabo en volumen de 25 ml de medio. Se realizaron cultivos de las bacterias en ausencia y presencia de sacarosa (3%). Las condiciones utilizadas para los cultivos fueron 37°C, 220 r.p.m para el aislamiento uno y 25°C, 220 r.p.m para el aislamiento dos. Durante el crecimiento bacteriano se tomaron muestras dobles de 2 ml en puntos específicos de la curva de crecimiento, una serie de muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m por 10 minutos, la otra serie fue sometida a ultrasonido durante cinco ciclos de 45 segundos a intervalos de 30 segundos. Todas las muestras obtenidas fueron dializadas a 4°C contra buffer fosfato de sodio 0.05 M pH 7.

## Evaluación de actividad enzimática

**Actividad hidrolítica:** 100 µl de las muestras obtenidas como producto de la diálisis fueron mezcladas con 1 ml de buffer fosfato de sodio 0.1M pH 6.3 sacarosa 0.2M y azida de sodio al 0.02%. La reacción se llevó a cabo a temperatura de 37°C para el aislamiento uno y a 4, 25 y 37°C para el aislamiento dos, por un tiempo de 2 y 4 horas. Alicuotas de 100 µl fueron evaluadas con la prueba del ácido dinitrosalicílico (DNS). El control negativo se realizó con buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 6.3 sacarosa 0.2M, como control positivo se utilizó la enzima levansacarasa de *B. subtilis*.

**Actividad polimerasa:** para el aislamiento uno 37,5 µl de las muestras sonicadas obtenidas como producto de la diálisis fueron mezcladas con 12,5 µl de buffer fosfato de sodio 0.1M pH 6.3 sacarosa 0.5M, 10 µl de sacarosa  $^{14}C$  (5  $10^5$  cpm  $\mu l^{-1}$ ) y azida de sodio al 0.02%; las muestras se incubaron en baño maría a temperatura de 37°C. La reacción para las muestras obtenidas a partir del aisla-

miento dos se realizó tanto para los sobrenadantes como para las muestras sometidas a ultrasonido, la mezcla de reacción fue la siguiente: 25 µl de la muestra respectiva, 25 µl de buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 6.3 sacarosa 0.5 M, 10 µl de sacarosa  $^{14}\text{C}$  ( $5 \cdot 10^5$  cpm µl $^{-1}$ ) y azida de sodio al 0.02%; las muestras se incubaron a temperatura de 4, 25 y 37°C. De todas las reacciones se tomaron muestras de 10 µl a diferentes intervalos de tiempo y se sometieron a una corrida cromatográfica en papel usando como solvente una mezcla butanol: ácido acético: agua (4:1:1) a temperatura ambiente. Para localizar las regiones radioactivas en el papel se utilizaron dos técnicas en la primera la cromatografía se expuso en película de rayos X, los trozos de papel correspondientes a las regiones radioactivas fueron procesados para análisis de recuento por centelleo. En la segunda las zonas radioactivas fueron visualizadas en equipo Storm 860 Molecular Dynamics.

## Resultados y discusión

**Caracterización de las cepas:** la caracterización bioquímica de los aislamientos uno y dos utilizando el sistema Biotype-100 (BioMérieux) y el programa Recognizer (Instituto Pasteur Toxolab) en Macintosh (Apple Computers) se presentan en la tabla 1.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización molecular realizada a cada uno de los aislamientos utilizando la técnica de ARNr 16S sirvieron de base para la realización del análisis filogenético cuyos resultados se muestran en las figuras 1 y 2; para realizar dicho análisis se utilizaron los programas de computador Lasergene, Editseq, SeqMan, MegAlign; al igual que información de las bases de datos del GenBank y del Ribosomal Database Project II.

Al analizar la información obtenida a partir de la caracterización bioquímica, al igual que de la caracterización molecular y filogenética se tiene que los aislamientos uno y dos fueron identificados como *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens* respectivamente; apreciándose total coincidencia entre los resultados obtenidos con cada una de las técnicas utilizadas. La denominación del género *Raoultella* corresponde a la clasificación taxonómica realizada por **Drancourt et al.**, 2001 anteriormente era clasificada dentro del género *Klebsiella* sp. Con respecto a este resultado vale la pena enunciar que hasta la fecha en ninguna de estas dos especies bacterianas se han hecho estudios relacionados con la caracterización de los exopolisacáridos que sintetizan ni de las enzimas que participan en su producción.

**Producción de la enzima:** la cepa de *Raoultella terrigena* no produce la enzima de manera extracelular

esto se infiere a partir de los resultados obtenidos al hacer análisis de la actividad enzimática utilizando directamente los sobrenadantes obtenidos del cultivo y las muestras totales sometidas a ultrasonido, en los primeros al realizar la prueba del DNS no se registró presencia de azúcares reductores en los segundos si se registró presencia de azúcares reductores después de dos horas de reacción, alcanzado una concentración de azúcares reductores de 200µg ml $^{-1}$ . La bacteria produce la enzima por mecanismo de inducción, ya que no registró actividad enzimática en los extractos analizados a partir del cultivo realizado en ausencia de sacarosa este caso la sacarosa actúa como inductor. El resultado del análisis de las muestras sometidas a ultrasonido y de los sobrenadantes del cultivo de *Pseudomonas fluorescens* muestra que esta bacteria produce la enzima de manera extracelular y su expresión es constitutiva (se produce en ausencia de sacarosa) adicionalmente, la producción de la enzima se ve estimulada en la presencia de sacarosa. Este resultado muestra semejanza con estudios de la enzima realizados en cepas de *Pseudomonas syringae* y otros organismos Gram negativos como *E. amylovora*, *E. herbicola*, *Z. mobilis* a diferencia de la expresión dependiente de sustrato encontrada en bacterias Gram positivas (**Hettwer et al.**, 1998). Los resultados presentados por cada microorganismo permiten deducir que en cada caso los patrones de producción de las enzimas que participan en la síntesis de EPS son diferentes, indicando que cada microorganismo es un caso particular y es difícil hacer generalizaciones con respecto al comportamiento enzimático de los diferentes microorganismos productores de EPS.

**Evaluación de la actividad enzimática:** al observar la cromatografía en papel realizada con las muestras de la cepa de *Raoultella terrigena* no se ve presencia de regiones de radioactividad que indiquen la formación de polisacáridos de alto peso molecular, solo se visualizan las zonas correspondientes a los azúcares glucosa y fructosa (figura 3); este resultado y los resultados de la prueba del DNS permiten inferir que la cepa está produciendo una enzima con actividad hidrolítica pero no con actividad polimerizante, resultado que se corrobora con el análisis del recuento por centelleo; el valor calculado para la actividad de la enzima de la cepa de *Raoultella terrigena* es de 0.4 unidades enzimáticas (UE) definiendo UE como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa por minuto y por mililitro a temperatura de 37°C y pH 6.3.

En la cromatografía realizada con muestras procedentes de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* se visualizan zonas de radioactividad correspondientes a fructosa, glucosa, trisacáridos, tetrasacáridos y polisacáridos de ma-

**Tabla 1.** Resultados Caracterización Bioquímica realizada a los aislamientos 1 y 2. +, crecimiento en 1-2 días; x, crecimiento en 3,4 días; - no crecimiento.

PRUEBA	AISLAMIENTO UNO	AISLAMIENTO DOS	PRUEBA	AISLAMIENTO UNO	AISLAMIENTO DOS
D-Glucosa	+	+	L-Malato	+	+
D-Fructosa	+	+	Cis-Aconitato	+	+
D-Galactosa	+	+	Trans-Aconitato	+	+
D-Trealosa	+	+	Tricarbalilato	+	-
D-Manosa	+	+	Citrato	+	+
L-sorbosa	+	-	D-Glucoronato	+	+
D-Melibiosa	+	-	D-Galacturonato	+	+
Sacarosa	+	+	2-Cetogluconato	+	+
D-Rafinosa	+	-	5-Cetogluconato	+	-
Maltotriosa	+	-	Triptofano	-	+
Maltosa	+	-	N-Acetil-		
Lactosa	+	-	D-glucosamina	+	+
Lactulosa	+	-	D-Gluconato	+	+
1-O-Metil-			Fenilacetato	+	-
B-galactosidasa	+	-	Protocatecuato	+	+
1-O-Metil-			4-Hidroxibenzoato	+	+
a-galactosidasa	+	-	Quinato	+	+
D-Celobiosa	+	-	Gentisato	+	-
Gentiobiosa	+	-	3-Hidroxibenzoato	+	-
1-O-Metil-			Benzoato	+	+
B-D-glucosido	+	-	3-Fenilpropianato	-	-
Esculina	+	-	m-Cumarato	-	-
D-Ribosa	+	+	Trigonelina	-	-
L-Arabinosa	+	+	Betaina	-	+
D-Xylosa	+	+	Putrescina	+	+
Palatinosa	+	-	4-Aminobutirato	-	+
L-Ramnosa	+	-	Histamina	+	-
L-Fucosa	+	-	DL-Lactato	+	+
D-Melezitosa	+	-	Caprato	-	+
D-Arabitol	+	+	Caprilato	-	+
L-Arabitol	-	+	L-Histidina	-	+
Xylitol	-	+	Succinato	+	+
Dulcitol	-	-	Fumarato	+	+
D-Tagatosa	-	-	Glutarato	-	+
Glicerol	+	+	DL-Glicerato	x	+
Mio-Inositol	+	+	5-Aminovalerato	-	+
D-Manitol	+	+	Etanolamina	-	+
Maltitol	+	-	Triptamina	-	-
D-Turanosa	-	-	D-Glucosamina	-	+
D-Sorbitol	+	+	Itaconato	-	+
Adonitol	+	+	3-Hidroxibutirato	-	+
HQ-B-glucoronido	-	-	L-Aspartato	+	+
D-Lyxosa	-	-	L-Glutamato	+	+
i-Erytritol	-	+	L-Prolina	x	+
1-O-Metil-a-glucosido	+	-	D-Alanina	+	+
3-O-Metil-D-glucosa	+	-	L-Alanina	+	+
D-Sacarato	+	+	L-Serina	+	+
Mucato	+	+	Malonato	-	+
L-Tartrato	-	-	Propionato	-	+
D-Tartrato	-	-	L-Tirosina	-	+
Meso-Tartrato	+	-	2-Cetoglutarato	-	-
D-Malato	+	-	IDENTIFICACIÓN	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

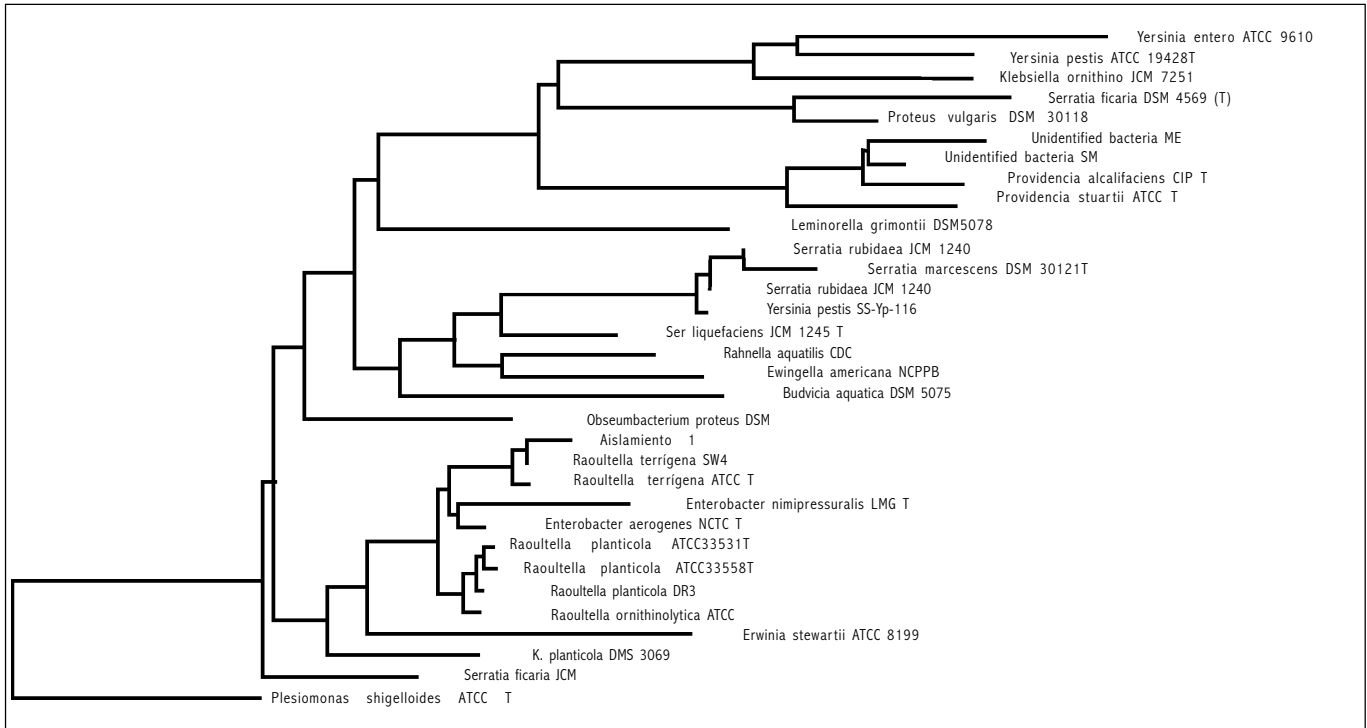


Figura 1. Árbol filogenético de enterobacterias. Se muestra la localización del aislamiento 1 dentro del árbol.

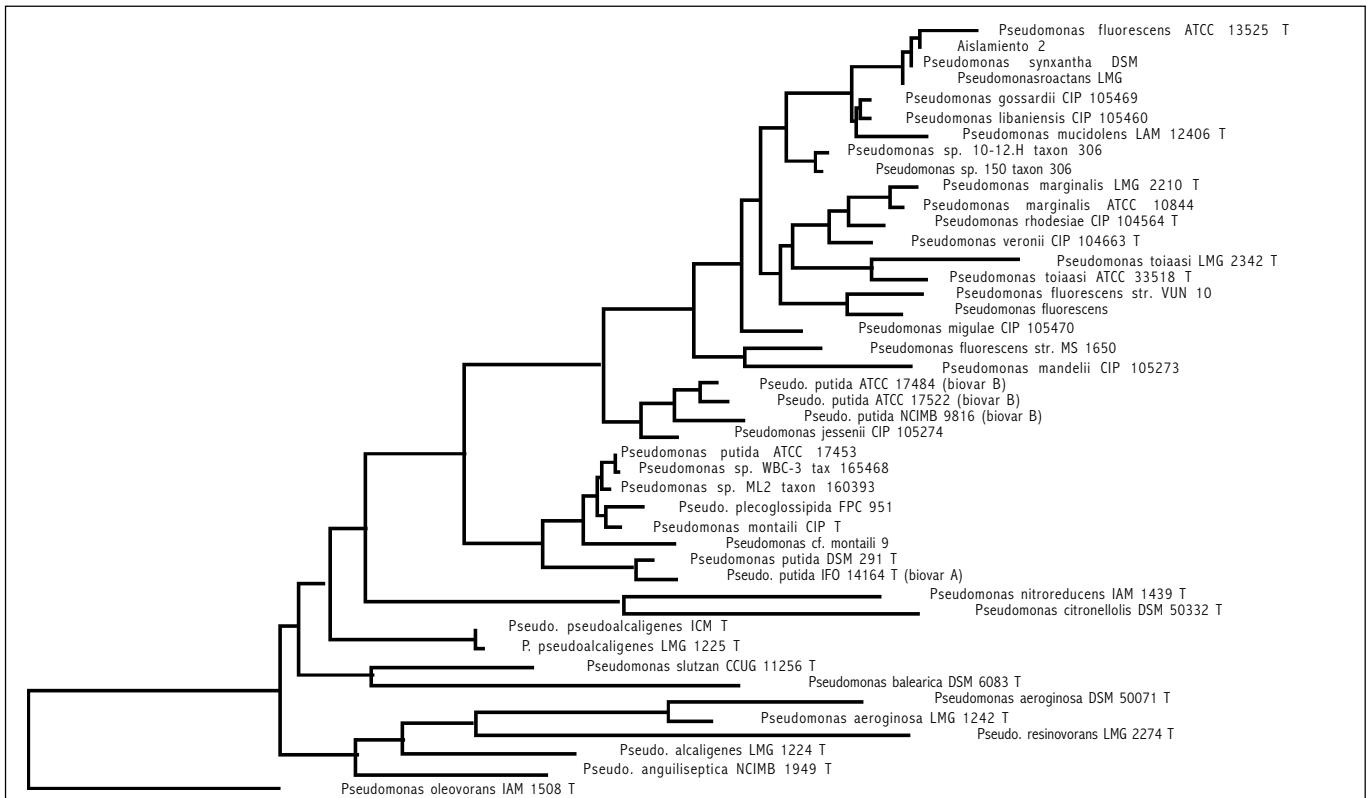
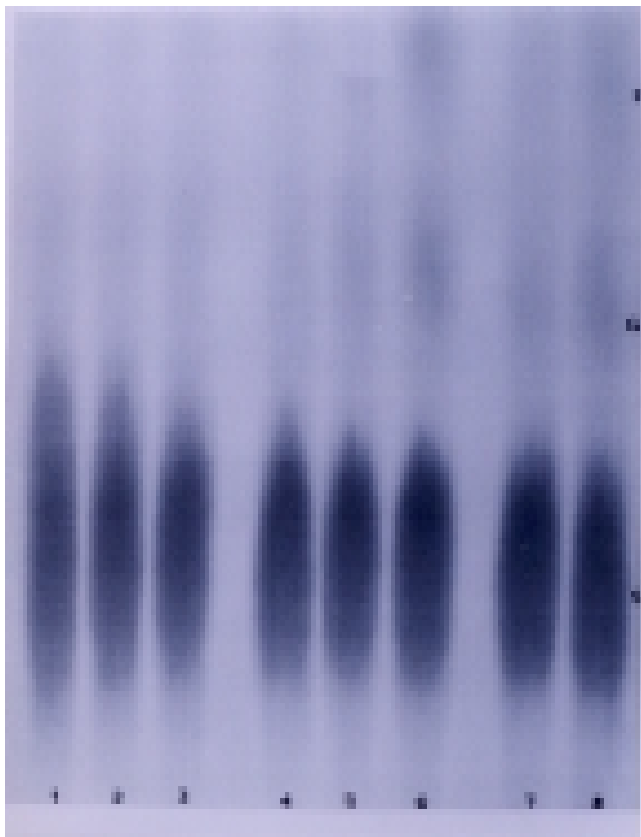
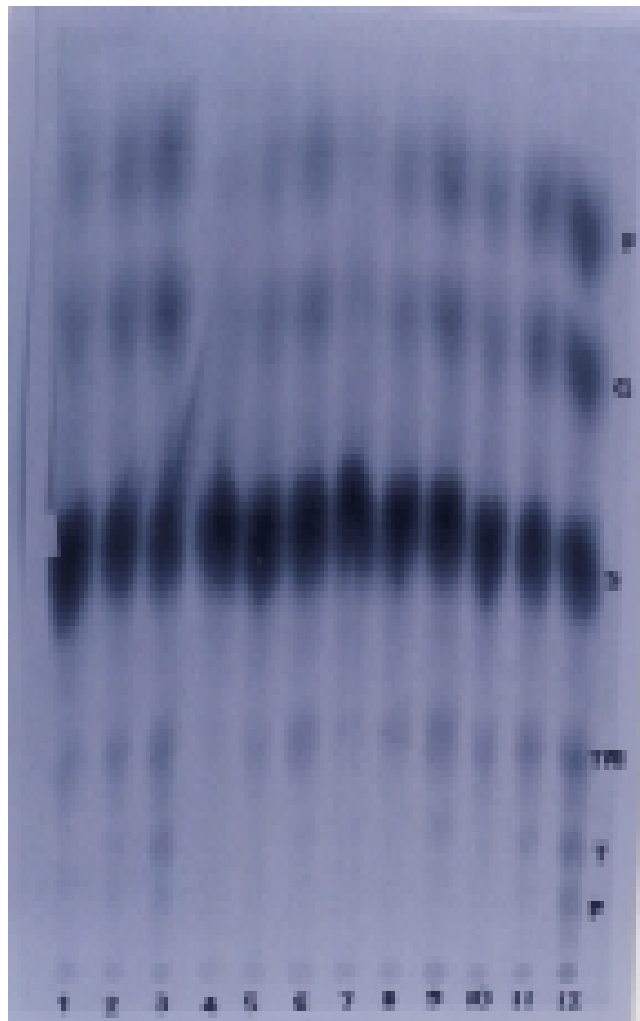


Figura 2. Árbol filogenético de Pseudomonas. Se muestra la localización del aislamiento 2 dentro del árbol.



**Figura 3.** Cromatografía en papel, cepa *Raoultella terrigena*. L1, L2, L3 y L4 muestra sonicada, D.  $O_{600nm}$  11.5; tiempo de reacción 8, 12, 16 y 24 horas respectivamente. L5, L6, L7 y L8 muestra sonicada, D.  $O_{600nm}$  10.62; tiempo de reacción 8, 12, 16 y 24 horas respectivamente. F = fructosa, G = glucosa, S = sacarosa.



**Figura 4.** Cromatografía en papel, cepa *Pseudomonas fluorescens*. L1, L2, L3 sobrenadante cultivo inducido, D.  $O_{600nm}$  22.46. L4, L5, L6 sobrenadante cultivo no inducido, D.  $O_{600nm}$  13.26nm. L7, L8, L9 muestra sonicada cultivo no inducido D.  $O_{600nm}$  13.26. L10, L11, L12 muestra sonicada cultivo inducido D.  $O_{600nm}$  22.26. L1, L4, L7, L10 tiempo de reacción 15 min.; L2, L5, L8, L11 tiempo de reacción 60 min; L3, L6, L9, L12 tiempo de reacción 240 min. F = fructosa, G = glucosa, S = sacarosa, Tri = trisacáridos, T = tetrasacáridos, P = polisacáridos (>4).

por peso molecular (figura 4), lo que indica que la enzima producida por esta cepa presenta actividad hidrolítica y de polimerización; la actividad de la enzima es de 0.53 UE definiendo UE como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa por minuto y por mililitro a temperatura de 25°C y pH 6.3. Al comparar los datos de actividad enzimática presentados por cada una de las bacterias estudiadas se puede ver que la cepa de *P. fluorescens* es más promisorio para la producción del polímero, teniendo en cuenta que para la síntesis de EPS es más importante que la enzima tenga gran actividad de polimerización que de hidrólisis, además una gran actividad de hidrólisis puede ser desfavorable ya que la enzima cataliza la hidrólisis de sacarosa pero también puede ejercer actividad hidrolítica sobre el polímero.

Los datos contenidos en las tablas 2 y 3 presentan los resultados del análisis de recuento por centelleo para la

reacción de transfructosilación (síntesis de trisacáridos y tetrasacáridos) y de polimerización (síntesis de levana y polisacáridos de alta masa molecular > 10<sup>6</sup> Da), se observa que la reacción de la enzima producida por *P. fluorescens* se ve favorecida a temperatura de 4°C y confirman que la bacteria produce niveles basales de la enzima que se ven aumentados cuando la bacteria es cultivada en presencia de sacarosa.

**Tabla 2.** Rendimiento de la reacción de transfructosilación y polimerización de la Enzima producida por *Pseudomonas fluorescens* en presencia de sacarosa (3%) como inductor.

	4°C	25°C	37°C
Reacción de transfructosilación (%)	70	37	15
Reacción de polimerización (%)	43	30	0.6

**Tabla 3.** Rendimiento de la reacción de transfructosilación y polimerización de la Enzima producida por *Pseudomonas fluorescens* sin inductor.

	4°C	25°C	37°C
Reacción de transfructosilación (%)	50	25	0
Reacción de polimerización (%)	30	9	0

Se han realizado numerosos estudios con el fin de examinar el efecto de la temperatura en la producción de polisacáridos, todos ellos mostrando una variedad de resultados, **Kimmel et al.**, 1998 refieren que la producción de polímero en una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se ve favorecida en temperaturas superiores a la temperatura óptima de crecimiento (37-42°C). Contrariamente otros investigadores han encontrado que la máxima producción del polímero se obtiene a temperaturas menores que la temperatura óptima de crecimiento, situación que coincide con la encontrada en la cepa de *P. fluorescens* objeto de este estudio.

## Conclusiones

- Los aislamientos bacterianos fueron caracterizados como *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens*.
- La cepa de *Raoultella terrigena* sintetiza de manera intracelular e inducida una enzima que tiene actividad hidrolítica sobre la sacarosa.
- *Pseudomonas fluorescens* sintetiza una enzima extracelular que actúa sobre la sacarosa, esta enzima posee actividad hidrolítica y polimerizante. La bacteria produce la enzima por mecanismo de expresión constitutiva y su producción se ve estimulada en presencia de la sacarosa.
- La temperatura óptima de reacción para la enzima producida por *Pseudomonas fluorescens* es de 4°C.

## Bibliografía

- Bryan, B, Linhardt, R, Daniels, L.** 1986. Variation in Composition and Yield of Exopolysaccharides Produced by *Klebsiella* sp. Strain K 32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. Applied and Environmental Microbiology. **51**(6): 1304-1308.
- Drancourt, M, Bollet, C, Carta, A, Rousselier, P.** 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen.nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. Nov. And *Raoultella planticola* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 925-932.
- Gamar, L, Blondeau, K, Simonet, J.** 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. Journal of Applied Microbiology. 83: 281-287.
- Hettwer, U, Gross, M, Rudolph, K.** 1995. Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. Journal of Bacteriology. **177**(10): 2834-2839.
- Hettwer, U, Jaekel, F, Boch, J, Meyer, M, Rudolph, K, Ullrich, M.** 1998. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of Levansucrase Genes from the Plant Pathogens *Pseudomonas syringae* pv glycinea and *P. syringae* pv phaseolicola. Applied and Environmental Microbiology **64**(9): 3180- 3187.
- Kimmell, S, Roberts, R, Ziegler, G.** 1998. Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* RR Grown in a Semidefined Medium. Applied and Environmental Microbiology. **64** (2): 659-664.
- Kojic, M, Vujcic, M, Banina, A.** 1992. Analysis of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from Cheese. Applied and Environmental Microbiology. **58** (12): 4086-4088.
- Mozzi, F, De Glori, G, Oliver, G.** 1996. Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. Biotechnology Letters. **18**(4): 435-439.
- Pérez, M, Guereca, L.** 1996. Properties of Levansucrase from *Bacillus circulans*. Appl Microbiol Biotechnol. 44: 367-371.
- von Wright, A, Tynkkynen, S.** 1987. Construction of *Streptococcus lactis* subsp *lactis* Strains with a Single Plasmid Associated with Mucoïd Phenotype. Applied and Environmental Microbiology **53**(6): 1385-1386.

Recibido el 20 de octubre de 2003

Aceptado para su publicación el 14 de octubre de 2004