

R.4273

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUIMICA

+
377

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA



ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL EXOPOLISACARIDO PRODUCIDO
POR RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM VAR. PHASEOLI CIAT899

Memoria presentada para
optar al grado de Licenciado
en Ciencias Químicas por
Angel Sánchez del Junco

Sevilla, Marzo de 1990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

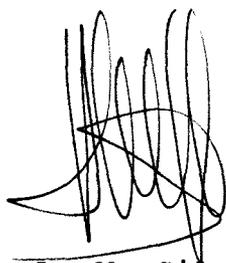
FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL EXOPOLISACARIDO PRODUCIDO
POR RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM VAR. PHASEOLI CIAT899

V°B°

Los Directores del Trabajo



Fdo.: A. M. Gil Serrano
Prof. Titular del Dpto.
de Química Orgánica de
la Facultad de Química
de la Universidad de
Sevilla.



Fdo.: P. Tejero Mateo
Prof. Titular del Dpto.
de Química Orgánica de
la Facultad de Química
de la Universidad de
Sevilla.

Deseo expresar mi agradecimiento:

A los Profesores Dr. Antonio M. Gil Serrano y Dra. Pilar Tejero Mateo, por su dirección y constante ayuda.

Al Dr. D. Manuel Gómez Guillén, Catedrático y Director del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, por las facilidades dadas en la realización de este Trabajo.

A los Profesores Dr. Manuel Megías Guijo y Dr. Miguel Angel Caviedes del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, por proporcionarnos las muestras del exopolisacárido y por la realización de la cromatografía líquida de alta resolución.

A los Servicios de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas de la Universidad de Sevilla.

Al Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Facultad de Química, por las facilidades dadas en el uso del espectrofotómetro UV-visible Beckman DU-7.

A la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía, por la subvención del Proyecto de Investigación: "Obtención y análisis estructural de polisacáridos con aplicaciones industriales producidos por Rhizobium", del que forma parte este Trabajo.

A todos los compañeros que son, o han sido, miembros del Departamento, por su ayuda y estímulo en todo momento.

1.

INTRODUCCION

Un rasgo común de bacterias, hongos y organismos vivos superiores es la producción de polisacáridos. Morfológicamente existen tres tipos: polisacáridos intracelulares localizados en el interior o como parte de la membrana citoplasmática; polisacáridos de la pared celular y polisacáridos exocelulares, localizados fuera de la pared celular y denominados exopolisacáridos (EPS). Algunos polisacáridos exocelulares se encuentran ligados covalentemente a la célula como una verdadera cápsula, mientras que otros son excretados al medio de crecimiento.

El interés de los exopolisacáridos es doble: por una parte, algunos de ellos presentan propiedades particulares de viscosidad que los convierten en sustancias aptas para aplicaciones industriales diversas (1); por otra parte, estos polímeros constituyen, junto con ciertos lipopolisacáridos, los principales inmunógenos y antígenos de bacterias debido a su localización externa en la célula (2).

Ambas propiedades están directamente ligadas a la estructura química de estos compuestos, por lo que, su conocimiento preciso es de gran importancia, dado que, establecida una correlación propiedades reológicas-estructura química, pueden

hacerse las modificaciones convenientes, tanto químicas como genéticas, que podrán conducir a la obtención de polisacáridos con un destacado interés industrial.

Por todo ello hemos intentado elucidar la estructura primaria de un exopolisacárido aislado de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899, cuyas propiedades reológicas se han estudiado en previsión de su posible aplicación industrial.

Este trabajo se ha estructurado en cinco capítulos. El primero corresponde a la introducción. El segundo se refiere a los conceptos generales y en él se detallan los antecedentes sobre polisacáridos bacterianos y concretamente sobre los exopolisacáridos del género *Rhizobium*, así como sus aplicaciones industriales.

En el capítulo tercero se detallan los métodos generales utilizados.

En el capítulo cuarto se describe la determinación estructural del EPS aislado de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899.

En el capítulo quinto se detallan las conclusiones.

2.

CONCEPTOS GENERALES Y ANTECEDENTES

2.1. Polisacáridos bacterianos.

Los polisacáridos bacterianos forman un grupo de polímeros en el cual las variaciones estructurales son siempre ilimitadas, y que frecuentemente incluyen como componentes azúcares inusuales.

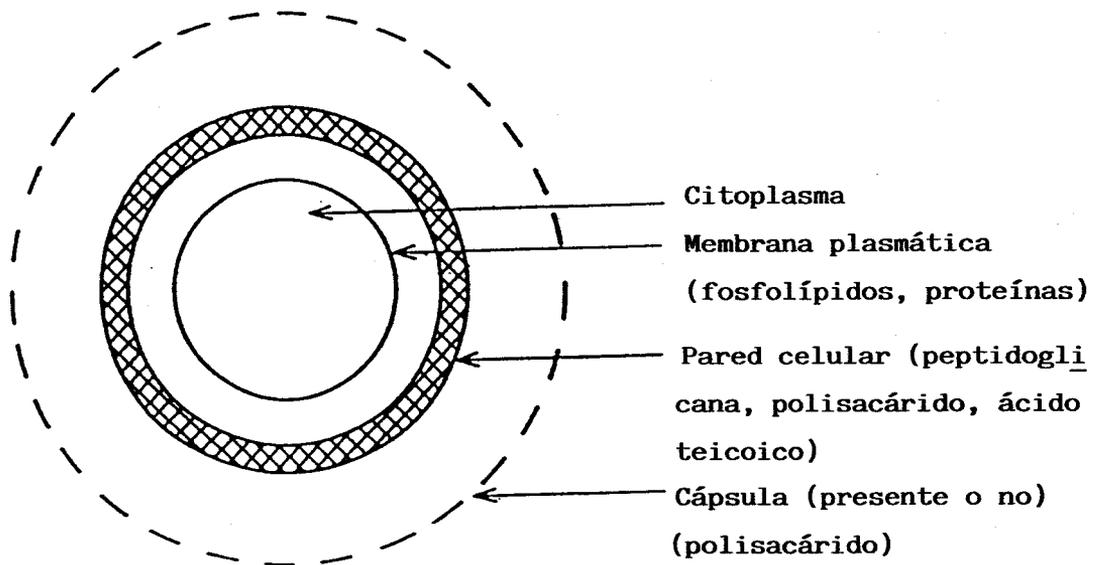
Además de los polisacáridos propiamente dichos, las bacterias también producen otros polímeros en los cuales los componentes principales son azúcares y que podemos agrupar en:

a) Lipopolisacáridos presentes en la pared celular de bacterias gram-negativas.

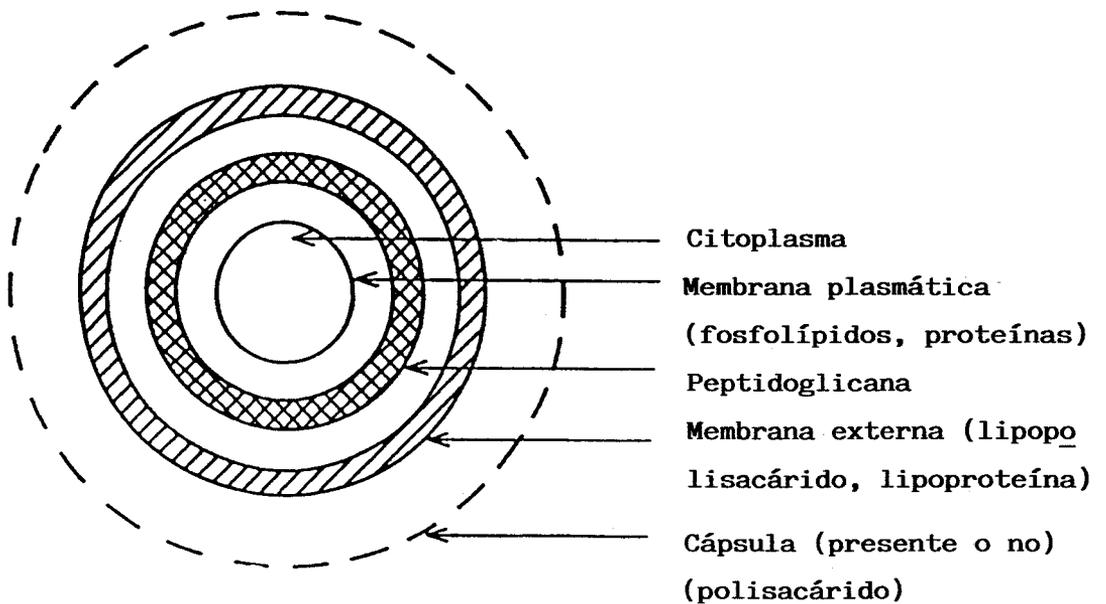
b) Peptidoglicanas de la pared celular de la bacteria en las que las cadenas de azúcares están enlazadas mediante cadenas cortas de péptidos y forman una red bidimensional.

c) Ácidos teicoicos; están presentes en paredes celulares y membranas de bacterias gram-positivas.

En la figura 1 se muestra un dibujo



Célula gram-positiva



Célula gram-negativa

Figura 1.- Dibujo simplificado de la célula bacteriana.

simplificado de la célula bacteriana.

En la tabla I se recogen los monosacáridos componentes de polisacáridos bacterianos (lipopolisacáridos, polisacáridos celulares, polisacáridos extracelulares y otros polímeros obtenidos de diferentes especies o grupos de bacterias) (3), y en la tabla II se muestran los sustituyentes no glicosídicos más frecuentes (3).

Los principales microorganismos productores de polisacáridos son: *Xanthomonas campestris* (productora de xantana), *Klebsiella*, *Acetobacter*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* (productoras de dextranas), *Alcaligenes faecalis* (productora de curdlan), *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii* (productoras de alginatos), *Azotobacter indicum*, *Erwinia*, *Sclerotium* (productora de escleroglucanas), *Aureobasidium pullulan*, *Rhizobium*, etc.

2.1.1. Género *Rhizobium*

Las bacterias del género *Rhizobium* (Gram-negativas) forman parte de la familia *Rhizobiaceae* que presenta cuatro géneros: *Rhizobium*,

Tabla I. Monosacáridos componentes de polisacáridos bacterianos.

Monosacáridos	Microorganismos
Pentosas	
L-Arabinosa	Procariotes fotosintéticos
D-Ribosa	Común
D-Xilosa	<i>Neisseria</i>
L-Xilosa	<i>Pseudomonas</i>
D-treo-pentulosa	<i>Pseudomonas</i>
Hexosas	
D-Glucosa	Común
D-Manosa	Común
D-Galactosa	Común
D-Alosa	<i>Pseudomonas</i>
D-Fructosa	Levanas, <i>Vibrio</i>
4-Desoxi-D-arabino-hexosa	<i>Citrobacter</i>
6-Desoxi-D-manosa	<i>Pseudomonas</i>
6-Desoxi-L-manosa	Común
Aminoazúcares	
D-glucosamina	Común
D-manosamina	<i>Streptococcus</i>
D-galactosamina	Común

Tabla I (continuación)

Monosacáridos	Microorganismos
Acidos urónicos	
Acido D-riburónico	<i>Rhizobium</i>
Acido D-glucurónico	Común
Acido D-manurónico	<i>E. coli</i>
Acido D-galacturónico	Común
Acido L-gulurónico	<i>Azotobacter</i>
Monosacáridos metilados	
4-O-Metil-D-galactosa	<i>Rhizobium</i>
6-O-Metil-D-galactosa	<i>Rhizobium</i>
3-O-Metil-L-fucosa	<i>Rhizobium</i>
3-O-Metilheptosa	<i>Rhizobium</i>
3,6-di-O-metilheptosa	<i>Rhizobium</i>
Ac. 4-O-metil-D-glucurónico	<i>Rhizobium</i>

Tabla II. Sustituyentes de tipo no-carbohidrato más frecuentes en EPS de *Rhizobium*.

Sustituyente	Modo de enlace
Acido fórmico	O-Acil
Acido acético	O-Acil, N-Acil
Acido succínico	O-Acil
Formaldehido	Acetal
Acetaldehido	Acetal
Acido pirúvico	Cetal
Acido fosfórico	Ester, diéster
Acido pirofosfórico	Ester, diéster
Acido 3-hidroxibutanoico	Ester

Bradyrhizobium, *Agrobacterium* y *Phylobacterium*.

Se describen tres especies dentro del género *Rhizobium* (bacterias de crecimiento rápido):

a) *Rhizobium leguminosarum*, con tres variedades: *trifolii*, *phaseoli* y *viceae*. Produce nódulos en raíces de algunas, aunque no necesariamente en todas, de las especies de *Pisum* (guisante de campo), *Lathyrus* (guisante), *Vicia* (guisante), *Lens* (lenteja) y especies templadas de *Phaseolus* y *Trifolium* (trébol).

b) *Rhizobium meliloti*. Forma nódulos en raíces de algunas especies de *Melilotus* (meliloto), *Medicago* (alfalfa) y *Trigonella* (alholva).

c) *Rhizobium loti*. Normalmente produce nódulos en algunos de los siguientes hospedadores: *Lotus*, *Lupinus*, *Anthyllis*, *Ornithopus*, *Cicer*, *Caragana*, *Leucaena* y *Mimosa*.

Dentro del género *Bradyrhizobium* (bacterias de crecimiento lento) se encuentran: *Rhizobium japonicum* (nodula la soja) y las del grupo Cowpea, además de *Rhizobium lupini*.

2.2. Polisacáridos del género *Rhizobium*

El polímero que biosintetiza el género *Rhizobium* es un heteropolisacárido de composición diversa según la especie.

Las especies de *Rhizobium* excretan al menos dos tipos de polisacáridos: β -D-glucanas neutras y polisacáridos ácidos complejos. Estas especies son selectivas con respecto a las especies de leguminosas que pueden nodular. Sus EPS excretados son muy similares en su composición (4).

Los EPS excretados por las especies de crecimiento lento son muy heterogéneos con respecto a su composición (compuestos de azúcares no frecuentes) y normalmente varían de una cepa a otra (5).

Dudman y col. (6) sugieren que las diferentes cepas de una misma especie de *Rhizobium* aparentemente excretan los mismos polisacáridos, mientras que cepas diferentes de distintas especies de *Rhizobium* excretan polisacáridos estructuralmente distintos.

Esta similitud estructural encontrada

entre polisacáridos de una misma especie de *Rhizobium* puede ser crucial para comprender el papel de los polisacáridos en la selectividad de la simbiosis con las leguminosas.

En la figura 2 se muestran las estructuras de varios polisacáridos (7). Se observa que la cadena principal es la misma, mientras que las cadenas laterales varían en su composición.

De los sustituyentes de tipo no-carbohidrato relacionados en la tabla II, los que se encuentran más frecuentemente en EPS de *Rhizobium* son: ácido pirúvico, O-acetilos, O-succinilos y ácido 3-hidroxibutanoico.

El ácido pirúvico fue detectado por primera vez como constituyente de un polisacárido en agar-agar y en polisacáridos capsulares de *Xanthomonas campestris* (8). El ácido pirúvico se encuentra enlazado como grupo cetil en posiciones 4 y 6 de galactosa y glucosa en polisacáridos de *Rhizobium*, en posiciones 2 y 3 de galactosa en polisacáridos de *Pneumococcus* y en posiciones 3 y 4 de galactosa en polisacáridos de *Salmonella* y *Klebsiella*.

Se ha observado que en los polisacáridos

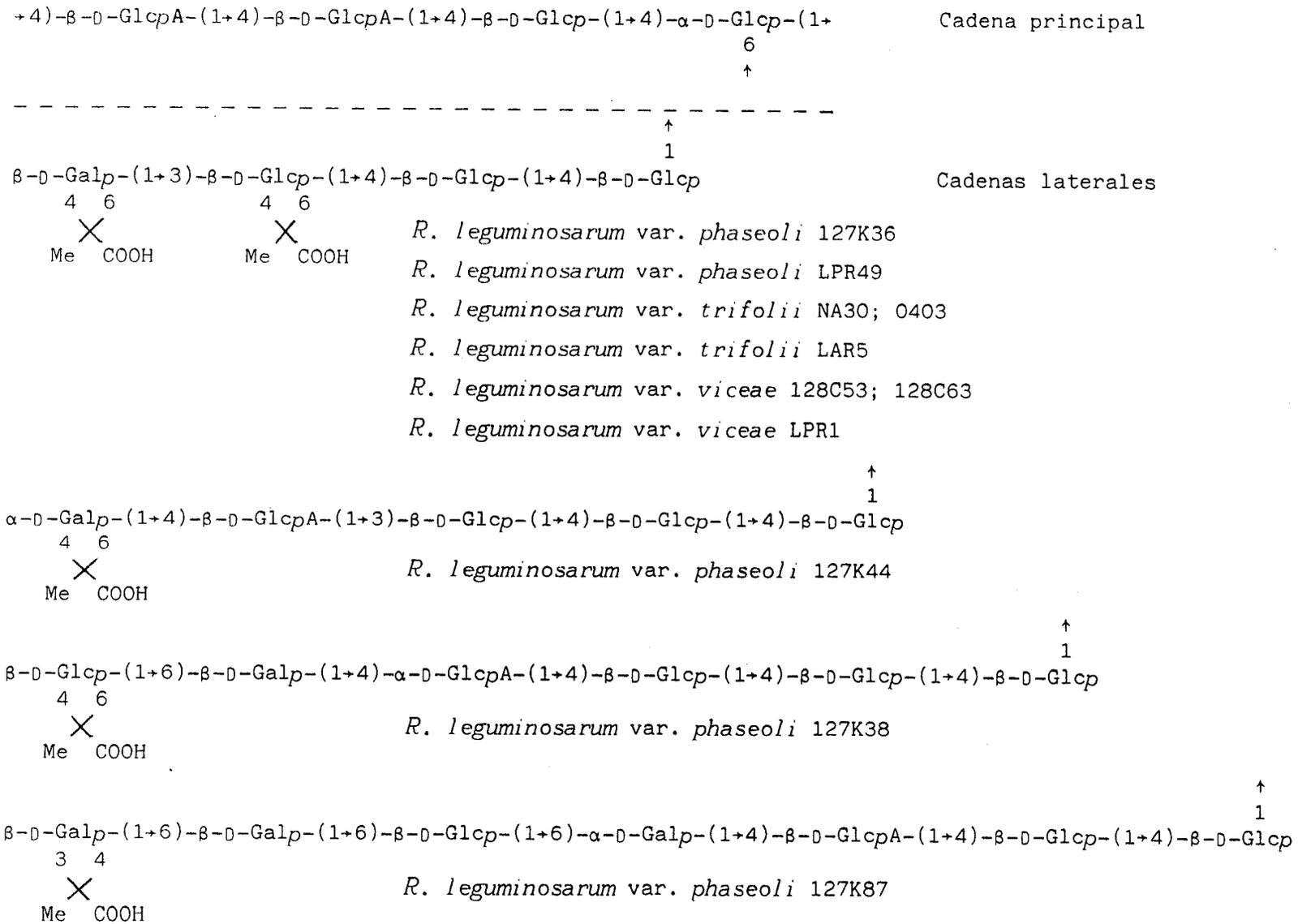


Figura 2

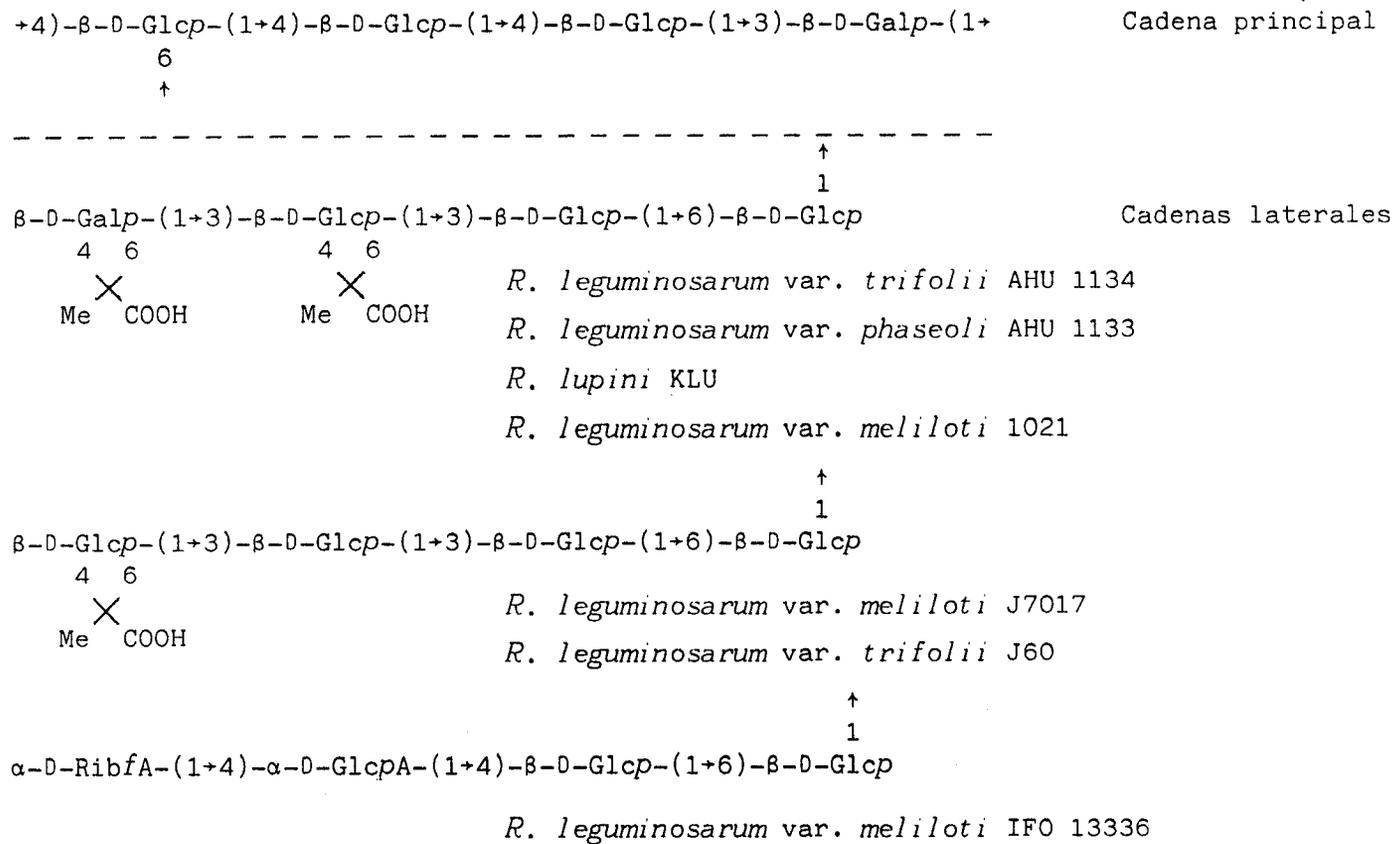


Figura 2 (continuación)

de *Rhizobium* con un contenido relativamente bajo en residuos de ácido pirúvico, éstos se localizan en residuos de hexosas terminales; en los polisacáridos de *R. leguminosarum* var. *viceae*, *R. leguminosarum* var. *phaseoli* y *R. leguminosarum* var. *trifolii*, están unidos parcialmente a residuos de hexosas terminales y parcialmente también a residuos de la cadena (9).

Los sustituyentes *O*-acilos pueden estar presentes o no en cualquier posición de cualquier residuo glicosídico de los polisacáridos. En los EPS de *Rhizobium leguminosarum* var. *viceae* y *Rhizobium leguminosarum* var. *trifolii*, las estructuras básicas son idénticas, pero el contenido y localización de los sustituyentes *O*-acilos difieren (10).

En la tabla III (11) se muestra el contenido de *O*-acetilo (*O*-Ac) y ácido pirúvico (Pyr) en algunos polisacáridos de *Rhizobium*, referido al contenido de muestras secas.

Dudman y Heidelberger (11) afirman que estos dos tipos de sustituyentes son determinantes inmunológicos (inmunodeterminantes) en polisacáridos de *Rhizobium*. Mort y Bauer (12) observan además que el contenido de *O*-Ac y Pyr en polisacáridos varía con el tiempo de cultivo de las células bacterianas.

Tabla III. Contenido de O-Ac y Pyr en algunos polisacáridos de *Rhizobium*.

Polisacárido	Acetilo (%)	Pirúvico (%)
<i>R. leguminosarum</i>	4.5	4.7
var. <i>meliloti</i> B		
<i>R. leguminosarum</i>	4.1	5.0
var. <i>meliloti</i> F		
<i>R. leguminosarum</i>		
var. <i>trifolii</i> TA1	4.1	9.0
UNZ29	3.7	10.4
WA67	3.3	9.1
CC10	2.1	8.8
2480a	4.0	9.2
<i>R. radicicolum</i>	2.2	7.8
<i>R. leguminosarum</i>		
var. <i>trifolii</i>		
degradación con ácido	4.4	0.3
tratamiento con NaOH	0	6.9

2.2.1. Papel de los polisacáridos de *Rhizobium* en la interacción bacteria-planta

Desde el trabajo de Beijerinck en 1888 (13), se sabe que la formación de nódulos en las raíces de *Leguminous* (leguminosas) se debe a la simbiosis entre una bacteria (del género *Rhizobium*) y la planta. Un rasgo característico común de estas bacterias es la producción de un EPS altamente viscoso.

Las bacterias del género *Rhizobium* son capaces de formar nódulos que convierten ("fijan") el nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados útiles; el nitrógeno así fijado por la bacteria es entonces transferido a la planta.

La interacción simbiótica entre bacterias *Rhizobium* y sus plantas hospedadoras es de importancia fundamental en agricultura. En general, una especie de *Rhizobium* es capaz de nodular una especie de leguminosa o un restringido rango de leguminosas relacionadas botánicamente. El mecanismo responsable de esta especificidad simbiótica es todavía desconocido, pero existen evidencias que sugieren que los polisacáridos sintetizados por *Rhizobium* pueden

estar implicados.

El proceso de reconocimiento celular entre la bacteria y la planta se cree que proviene de una unión específica entre receptores químicos en la superficie de las células implicadas. Esta teoría indujo a elaborar la hipótesis de la lectina (14).

Bauer (15) propone los polisacáridos ácidos producidos por las bacterias *Rhizobium* participan en las principales fases iniciales de reconocimiento en la nodulación huésped-leguminosa, a través de la interacción con las lectinas en los pelos radicales de la planta. Por tanto, cabe esperar que los polisacáridos excretados por especies distintas de bacterias del género *Rhizobium* tengan estructuras muy distintas, y que los polisacáridos excretados por distintas cepas de la misma especie de bacterias del género *Rhizobium* tengan estructuras prácticamente idénticas. Sin embargo, el examen estructural de polisacáridos producidos por cuatro cepas nodulantes de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* revela variaciones en sus estructuras, aunque hay ciertos rasgos comunes (figura 3) (16). Incluso cepas nodulantes pertenecientes a diferentes especies nodulantes de *Rhizobium* presentan la misma cadena principal en sus unidades de repetición así como los

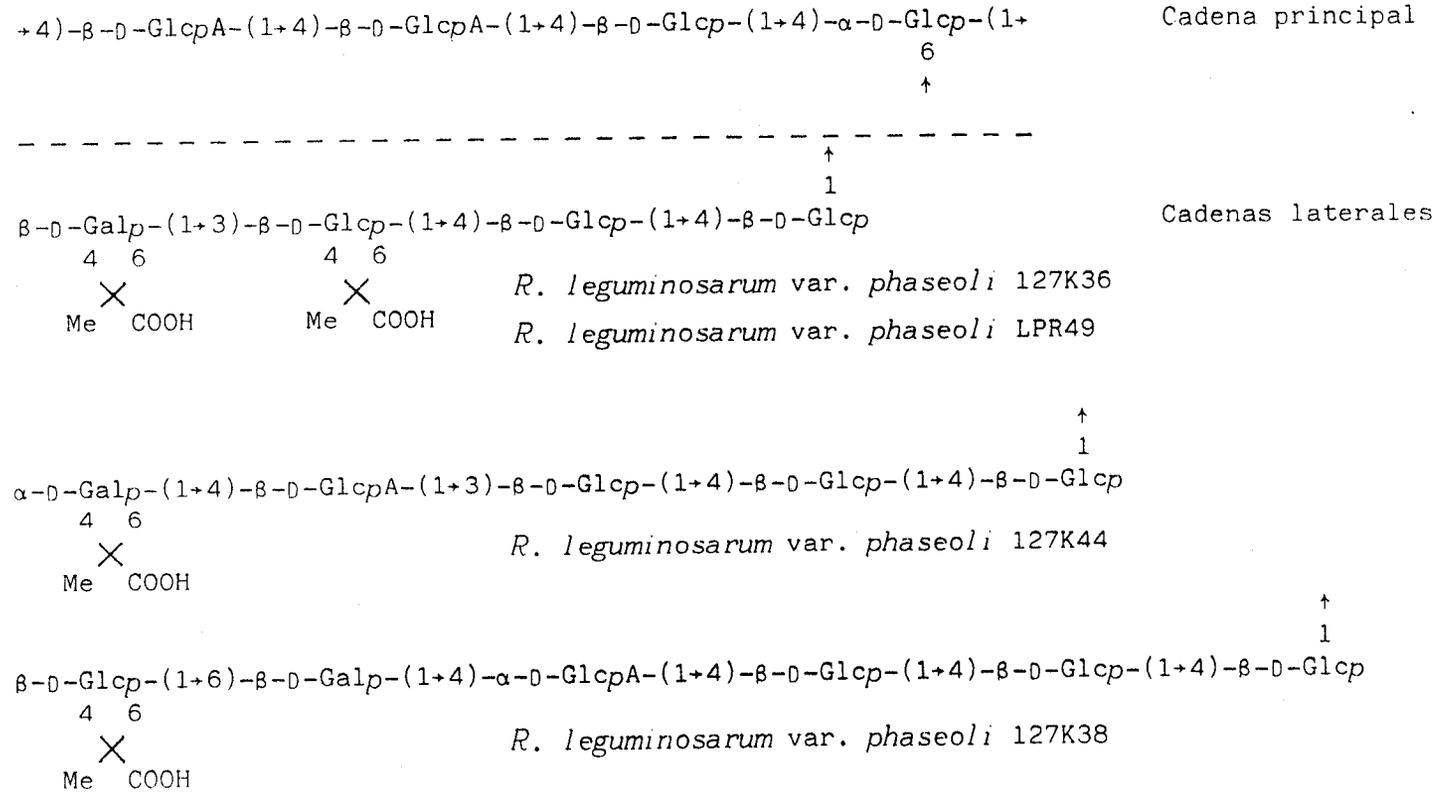


Figura 3

dos primeros residuos glicosídicos de sus cadenas laterales (figura 2-continuación).

Parece, pues, probable que algún rasgo estructural de los polisacáridos excretados por bacterias del género *Rhizobium* pudiera estar implicado en el proceso específico de reconocimiento de la bacteria hacia la planta.

Es importante determinar la estructura del EPS excretado por *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899, con vistas a establecer correlaciones de tipo estructural con otros polisacáridos de su misma especie o de especies distintas, conociendo un poco más acerca del papel de estos polímeros en la simbiosis con sus leguminosas específicas.

2.3. Utilización industrial de polisacáridos bacterianos

Desde hace mucho tiempo, los polisacáridos extraídos de vegetales o de algas (celulosa, almidón, gomas, alginatos,...) han permitido responder, por su abundancia y la diversidad de sus

propiedades, a las necesidades esenciales de las industrias papeleras, textiles, alimentarias y otras (17). Los principales se recogen en la tabla IV (1).

Para alcanzar una aplicación industrial, se debe estudiar un polímero en los tres campos siguientes:

- la composición química: todos los residuos deben ser identificados con el fin de apreciar la pureza de los productos preparados.

- Las características biológicas: debe determinarse su posible toxicidad. Por ejemplo, en el caso de polisacáridos bacterianos de Gram-negativas debe descubrirse la presencia de lipopolisacáridos, frecuentemente tóxicos (18).

- Las propiedades físicas: el valor industrial de los biopolímeros reside en su aptitud para modificar las propiedades reológicas de soluciones acuosas formando geles. Estos hidrocoloides deben ser, si es posible, relativamente insensibles a la presencia de diferentes iones, diferentes temperaturas y pH variados. Es decir, las interacciones que puedan tener estas macromoléculas con otras sustancias son un elemento suplementario en vistas a una

Tabla IV. Principales polímeros de uso industrial.

Origen	Polímero
Polisacáridos de algas:	
extractos de algas rojas:	agar, carragenanas
extractos de algas pardas:	alginatos
Polisacáridos de plantas:	
exudados de plantas:	goma arábiga, ghatti, karaya, tragacanto
semillas:	goma guar y derivadas
extractos de plantas:	pectina y goma de melaza
Derivados de celulosa:	
(CMC), hidroxietilcelulosa (HEC), metilcelulosa, celulosa microcristalina	carboximetilcelulosa
Polisacáridos microbianos:	
comercializados:	goma xantano, dextranos
en desarrollo:	escleroglucana, pullulana, curdlan, alginatos

aplicación potencial.

2.3.1. Campos de aplicación

1) Alimentación.- Como agentes gelificantes, espesantes, estabilizantes, emulsionantes; y como inhibidores de la cristalización para asegurar una protección contra la formación de cristales de hielo.

2) Medicina.- Como inmunoestimulantes o conjugados a enzimas para la formación de glicoproteínas en la circulación rápida dentro del organismo.

3) Agricultura.- Protegen las raíces de los árboles contra la desecación manteniendo una reserva hidrófila. Esta propiedad se utiliza igualmente para favorecer la germinación de semillas.

Juegan un papel como agentes de suspensión en la industria de herbicidas y pesticidas.

4) Industrias diversas.- Absorbentes en industrias de pintura, aderezantes para modificar las propiedades de ropas o papeles con el fin de facilitar

la adherencia de colorantes o tintes, estabilizadores de pinturas al agua, emulsionantes en esmaltes de cerámica, gelificantes de explosivos, agentes de desecación de la dinamita, flexibilizantes y espesantes en productos cosméticos, agentes de "recuperación asistida" del petróleo.

5) Otra aplicación de los polímeros bacterianos menos conocida, pero no por ello menos importante, es en la eliminación de iones metálicos en soluciones, y en concreto de aguas residuales. Parece que la eliminación de metales que tiene lugar durante el tratamiento biológico de un agua se debe en parte al complejo formado entre el metal y los polisacáridos externos de los microorganismos (19).

2.3.2. Perspectivas

Los progresos realizados en diversos sectores de la biotecnología están abiertos a perspectivas nuevas en lo que concierne a la producción de polisacáridos de origen microbiano. Ahora es posible obtener, por fermentación, biopolímeros cuyas propiedades, sobre todo características reológicas en solución, son al menos

equivalentes a las de los productos tradicionales.

Es cierto que estos productos de fermentación tienen todavía un coste de fabricación elevado y, de hecho, no reemplazan totalmente a los polímeros tradicionales. No obstante, las estructuras infinitamente variadas de los polisacáridos microbianos le confieren propiedades nuevas, incluso originales.

La investigación actual se orienta en tres direcciones:

- mejora genética de la fuente productora del polímero;

- optimización de las condiciones de producción en fermentos;

- estudio de las condiciones de recuperación de biopolímeros.

El interés de la explotación de microorganismos reside en esta posibilidad de descubrir biopolímeros con características muy necesarias en la industria; en contrapartida, queda la dificultad de establecer un lazo cualquiera entre la

naturaleza de la fuente, el tipo de polisacárido excretado y las propiedades esperadas, todo lo cual necesita una fase previa con el fin de seleccionar nuevas fuentes y estudiar las propiedades de sus hidrocoloides.

En el laboratorio de investigación del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla se ha realizado un estudio sobre este fenómeno de varias cepas de *Rhizobium*, entre ellas *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899, presentando capacidad de retención de iones cromo (20).

Igualmente, y llevados a cabo por el mismo grupo de investigación, se han realizado estudios de las propiedades reológicas del EPS cuya composición se estudia en este trabajo, llegándose a los siguientes resultados (20):

- posee una viscosidad alta en solución acuosa,
- presenta carácter pseudoplástico y comportamiento reopéctico,
- es bastante estable a los cambios de

temperatura en un intervalo de 20 a 80°C,

- es bastante estable a los cambios de pH en un intervalo de 1 a 13 unidades y
- es estable frente a deformaciones sucesivas.

Estos estudios preliminares abren un camino de investigación muy interesante, pues no sólo el género *Rhizobium* es capaz de competir con las cepas productoras de EPS para uso industrial, sino que el polímero que sintetiza tiene una composición muy sencilla, fácilmente modificable y con unas características reológicas apropiadas para su uso industrial, incluso con buenas perspectivas para su utilización en depuración de aguas residuales.

3.

METODOS GENERALES

3.1. Análisis de los componentes del polisacárido.

La determinación de la composición del polisacárido requiere la identificación y estimación cuantitativa de los azúcares y sustituyentes que lo forman.

Para determinar la composición química del polisacárido es necesario en primer lugar una despolimerización total del mismo. La determinación cualitativa de los monosacáridos y sustituyentes obtenidos se realiza por cromatografía líquida de alta resolución (c.l.a.r.).

Para la determinación cuantitativa de dichos monosacáridos se utiliza la cromatografía gas-líquido (c.g.l.).

Para la determinación de sustituyentes de tipo no-carbohidrato se emplean métodos colorimétricos.

3.1.1. Despolimerización total del polisacárido.

La extensa variedad de polisacáridos excluye un procedimiento completamente general para su despolimerización total.

El método más empleado en la rotura de enlaces glicosídicos en un polisacárido es la hidrólisis (21). Las condiciones de hidrólisis deben ser cuidadosamente escogidas y controladas. Cada polisacárido representa una situación diferente y las condiciones óptimas para la hidrólisis de cada componente deben ser determinadas independientemente.

La hidrólisis suele llevarse a cabo en soluciones acuosas (ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, etc) o en otros solventes (metanol, anhídrido acético-ácido acético, ácido fórmico, etc) (22).

El método que se utiliza en este trabajo es la hidrólisis con ácido trifluoroacético. Esta hidrólisis tiene la ventaja de que una vez completada, el ácido puede ser eliminado fácilmente del medio de reacción.

El procedimiento que se sigue es el siguiente (23): se pesa una cantidad de polisacárido liofilizado, se añade ácido trifluoroacético 4 N (1

ml/mg de polisacárido) y se calienta a 100°C durante 4 horas. Se evapora a sequedad y las trazas de ácido se eliminan con tres evaporaciones sucesivas con metanol.

3.1.2. Análisis cualitativo por cromatografía líquida de alta resolución.

La aplicación de la c.l.a.r. en el campo de los carbohidratos (24) presenta la ventaja de una identificación y cuantificación rápida y con gran resolución de los componentes más frecuentes en polisacáridos bacterianos (azúcares neutros, ácidos urónicos y sustituyentes fundamentalmente) y de no tener que preparar derivados, lo que evita posibles pérdidas.

Esta técnica ha sido utilizada por nosotros en el análisis cualitativo de los componentes del polisacárido.

3.1.2.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas.

La mezcla de azúcares y sustituyentes que proceden de la despolimerización total del polisacárido (1 mg) se separan utilizando un cromatógrafo Sugar Analyzer I Waters Associated Inc, provisto de un inyector de volumen fijo de 20 μ l, una bomba de alta presión modelo M 510 y un detector de índice de refracción R 401. Se utiliza una columna de acero inoxidable (30 cm x 7,8 cm) rellena con Aminex ión exclusión HPX-87 H (Biorad). Las condiciones cromatográficas son: temperatura de la columna, 65°C; eluyente, ácido sulfúrico 0,015 N; velocidad de flujo, 0,3 ml/min.

La figura 4 muestra el cromatograma correspondiente a una mezcla patrón que contiene ácido glucurónico, ácido galacturónico, glucosa, galactosa, piruvato, succinato y acetato.

En la tabla V se recogen los distintos componentes y sus tiempos de retención obtenidos en las condiciones cromatográficas empleadas.

3.1.3. Análisis cuantitativo.

Se realiza una determinación cuantitativa

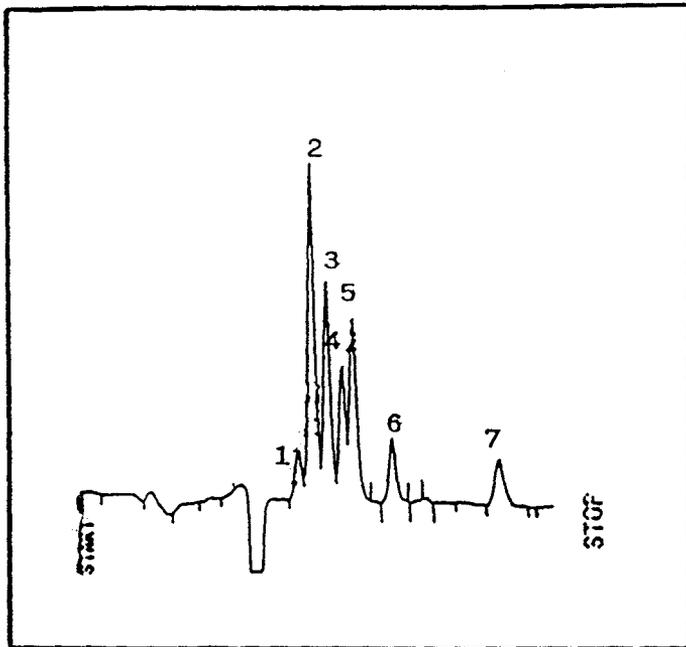


Figura 4.- Análisis cualitativo por c.l.a.r.
Cromatograma obtenido de una muestra patrón.

Tabla V

Picos	Sustancias de referencia	t_R (min.)
1	Acido glucurónico	15.21
2	Acido galacturónico	16.67
3	Glucosa	17.00
4	Galactosa	18.01
5	Acido pirúvico	18.77
6	Acido succínico	21.44
7	Acido acético	28.45

de los azúcares que componen el polisacárido así como de los sustituyentes de tipo no-carbohidrato, una vez identificados ambos por c.l.a.r.

3.1.3.1. Determinación cuantitativa de azúcares por cromatografía gas-líquido.

La c.g.l. es un método muy apropiado para la determinación cuantitativa de los componentes de una mezcla de azúcares (25). Se necesita una pequeña cantidad de muestra y existe una amplia gama de fases estacionarias capaces de resolver cualquier tipo de mezcla de azúcares. Presenta el inconveniente de tener que convertir éstos en derivados volátiles. Se consigue mediante la transformación en: trimetilsilil éteres, acetatos de alditoles, trifluoroacetatos, acetatos de aldonitrilos, metilglicósidos, etc. En este trabajo se utilizan los acetatos de alditoles por su facilidad de preparación.

La determinación cuantitativa de los azúcares que componen el polisacárido se realiza por c.g.l. de los correspondientes acetatos de alditoles, preparados según el método de Blakeney y col. (26). Se utiliza inositol como patrón interno que se añade

después de realizada la hidrólisis del polisacárido. El patrón interno no coincide con ninguno de los azúcares presentes (27).

3.1.3.1.1. Preparación de los acetatos de alditoles.

Los monosacáridos procedentes de la despolimerización total del polisacárido (3 mg) (apartado 3.1.1.) se convierten en sus acetatos de alditoles según el procedimiento descrito por Blakeney y col (26).

Procedimiento: los monosacáridos (3 mg) se reducen con una disolución de borohidruro sódico (2 g) en dimetilsulfóxido (100 ml). La reducción se realiza durante 90 minutos a 40°C por adición de solución de borohidruro (1 ml) a la mezcla de monosacáridos y patrón interno (inositol) en amoniaco 1 M (0,1 ml). El exceso de borohidruro se destruye por adición de ácido acético concentrado (0,1 ml). Se añade 1-metil-imidazol (0,2 ml) seguido de anhídrido acético (2 ml). Después de 10 minutos a temperatura ambiente se añade 5 ml de agua destilada. Se extraen los acetatos de alditoles con diclorometano (3 x 1 ml). Las fases orgánicas se lavan con agua destilada

(5 x 3 ml). Se añade sulfato sódico anhidro y la disolución orgánica se seca bajo corriente de nitrógeno seco. Se disuelven en diclorometano (100 μ l).

3.1.3.1.2. Instrumentación y condiciones cromatográficas.

La separación de los acetatos de alditoles se realiza en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5.710 A con detector de ionización de llama, equipado con un registrador integrador Varian CDS 401. Se utiliza una columna de vidrio (2 m x 0,6 cm) rellena de 3% SP-2340 en Supelcoport (100-120 mesh).

Las temperaturas de los distintos elementos del cromatógrafo son: temperatura del bloque de inyección, 250°C; temperatura del detector, 250°C; temperatura de la columna, 235°C. El gas portador es nitrógeno a 20 ml/min.

La figura 5 muestra el cromatograma correspondiente a una mezcla patrón que contiene acetatos de alditoles de los siguientes azúcares:

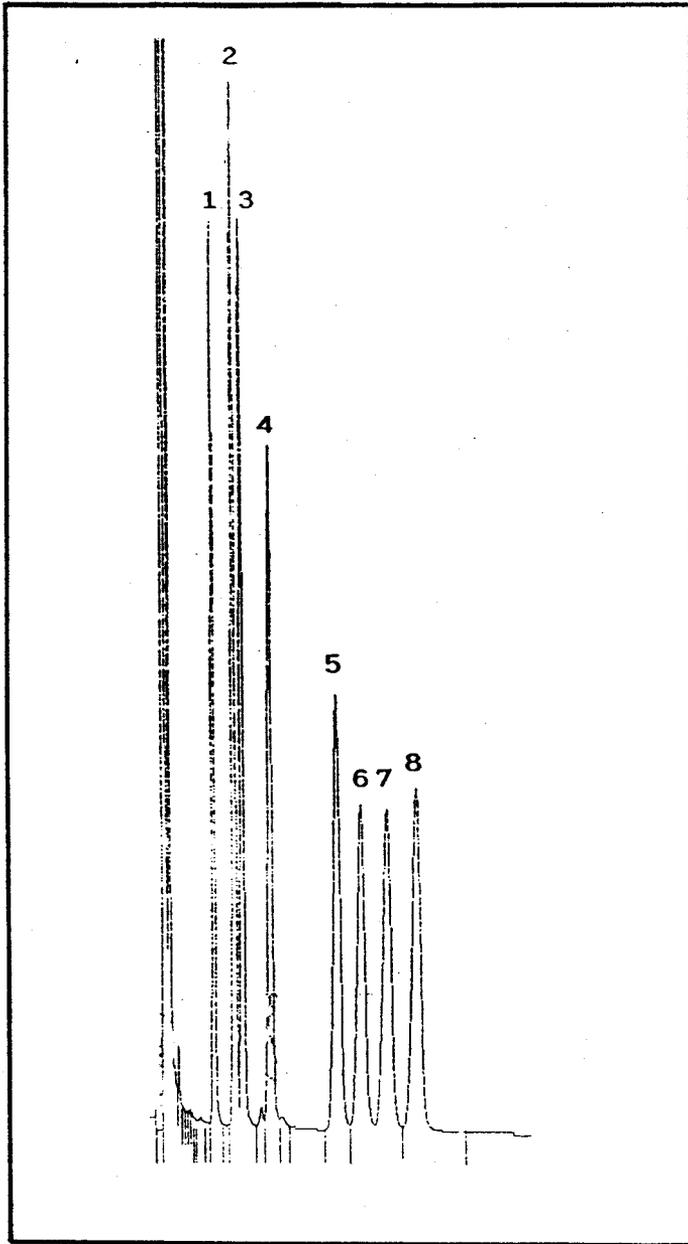


Figura 5.- Análisis cuantitativo por c.g.l.
Cromatograma obtenido de una muestra patrón.

Tabla VI

Picos	Sustancias de referencia ^a	t _R (min.)
1	Ramnosa	4.050
2	Ribosa	5.490
3	Arabinosa	6.047
4	Xilosa	7.908
5	Manosa	12.279
6	Galactosa	13.809
7	Glucosa	15.443
8	Inositol	17.374

^a : Como acetatos de alditoles.

ramnosa, ribosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

En la tabla VI se recogen los distintos componentes y sus tiempos de retención obtenidos en las condiciones cromatográficas empleadas.

3.1.3.2. Determinación cuantitativa de sustituyentes.

La determinación cuantitativa de los sustituyentes del polisacárido se lleva a cabo mediante reacciones colorimétricas específicas para cada tipo de ellos, midiendo las absorbancias y calculando las concentraciones con ayuda de una recta de calibrado construida a partir de disoluciones de referencias de concentraciones conocidas.

3.1.3.2.1. Análisis cuantitativo de ácido pirúvico.

La proporción de 1-carboxietiliden derivado se determina por una modificación del método de Sloneker y Orentas (8) llevada a cabo por Sutherland

(28).

Se prepara una disolución patrón que contiene piruvato sódico en una concentración de 1 mg/10 ml. Se toman 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μ l de esta disolución y se llevan a un volumen de 100 μ l con agua destilada. Cada disolución representa 5, 6, 7, 8, 9 y 10 μ g de piruvato sódico por cada 100 μ l de disolución.

Procedimiento: a cada disolución se añade ácido clorhídrico 2 M (100 μ l) y se hidroliza a 100°C durante 3 horas. Se añade una disolución de 2,4-dinitro-fenilhidrazina al 0,5% en ácido clorhídrico 2 M (100 μ l). La mezcla se agita y se deja a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se añade acetato de etilo (0,5 ml). Se agita y se separa la fase orgánica (fase superior). La fase orgánica se extrae con una solución de carbonato sódico al 10% (3 x 0,5 ml). Los extractos unidos se llevan a un volumen exacto de 10 ml y se mide su absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro UV-visible Beckman DU-7 Spectrophotometer.

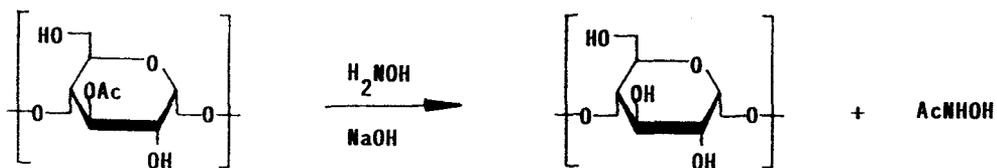
Con los datos de absorbancia y de concentración de piruvato que se detallan en la tabla VII se construye la recta de calibrado que se muestra

en la figura 6, cuya ecuación es:

$$\text{Abs.} = 0,1165C - 0,276; r = 0,988.$$

3.1.3.2.2. Análisis cuantitativo de acetato.

El método de Hestrin (29) es un micrométodo rápido para el ensayo de ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta, lactonas y anhídridos. Está basado en la capacidad de un éster para reaccionar cuantitativamente con hidroxilamina en solución alcalina acuosa:



El ácido hidroxámico resultante reacciona cuantitativamente con iones férricos para producir un cromógeno de color naranja-marrón.

Se sigue el método adaptado por Downs y Pigman (30). Se prepara una disolución de acetato de

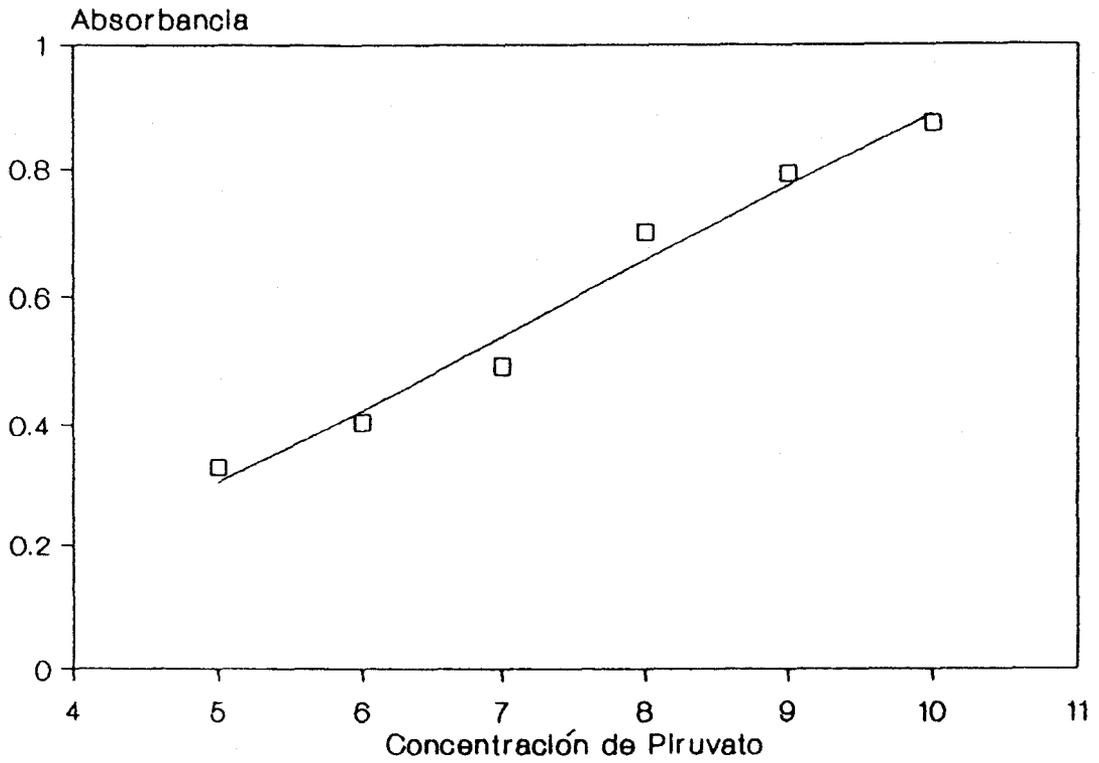


Figura 6.- Recta de calibrado para la determinación cuantitativa de ácido pirúvico.

Tabla VII

Disolución de referencia	Concentración de piruvato ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)	Absorbancia
1	5	0.3303
2	6	0.4029
3	7	0.4929
4	8	0.6990
5	9	0.7903
6	10	0.8720

etilo (40 μ l) en metanol al 0,1% [v/v]. De esta disolución se toman 250, 500, 750, 875 y 1000 μ l y se llevan a 1 ml con agua destilada. Cada disolución representa 1; 2; 3; 3,5 y 4 μ moles de acetato por cada ml de disolución.

Los reactivos a emplear son:

[1].- Hidrocloruro de hidroxilamina 2 M.

[2].- Hidróxido sódico 3,5 M.

[3].- Acido clorhídrico 4 M.

[4].- Cloruro férrico 0,37 M en ácido clorhídrico 0,1 M.

[5].-Hidrocloruro de hidroxilamina alcali na: se prepara mezclando los reactivos [1] y [2] a partes iguales.

Procedimiento: a cada disolución problema (1 ml) se le añade hidrocloruro de hidroxilamina alcalina recién preparado (2 ml) y se agita vigorosamente. Se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lleva a pH ácido (1-3) con ácido clorhídrico 4 M (1 ml). Se añade disolución férrica (1 ml), se agita vigorosamente y se miden las absorban cias a 540 nm.

Con los datos de absorbancia y de

concentración de acetato que se detallan en la tabla VIII se construye la recta de calibrado que se muestra en la figura 7, cuya ecuación es:

$$\text{Abs.} = 0,1387C + 0,0114; r = 0,9989.$$

3.2. Resonancia magnética nuclear de protón.

La resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-r.m.n.}$) es un medio indispensable en el estudio de la secuencia primaria de polisacáridos (31).

En común con otros métodos físicos, la $^1\text{H-r.m.n.}$ es no-destructiva: es posible examinar un polímero sin modificarlo o degradarlo y recuperar el material intacto.

De los espectros de $^1\text{H-r.m.n.}$ se obtiene información tanto cualitativa como cuantitativa. En nuestro trabajo se aplica para la identificación de los sustituyentes presentes en el polisacárido y de la anomería de los azúcares que lo componen.

El polisacárido (1 mg) se suspende en óxido de deuterio (1 ml) y se liofiliza, esta

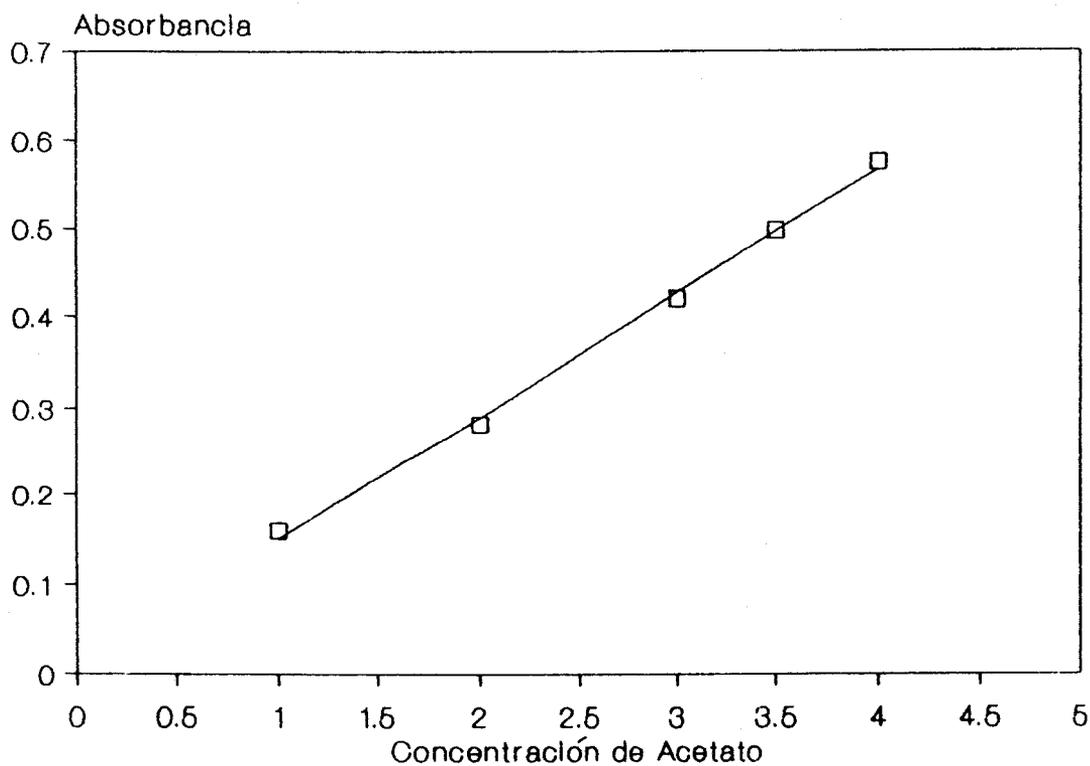


Figura 7.- Recta de calibrado para la determinación cuantitativa de acetato.

Tabla VIII

Disolución de referencia	Concentración de acetato ($\mu\text{mol}/1 \text{ ml}$)	Absorbancia
1	1	0.1579
2	2	0.2813
3	3	0.4194
4	3.5	0.4971
5	4	0.5741

operación se realiza tres veces, con el fin de que el intercambio de los protones móviles sea efectivo. Seguidamente el polisacárido suspendido en óxido de deuterio (1 ml) se analiza a 75°C. El espectro de ^1H -r.m.n. se registra a 200 MHz en un aparato VarianXL. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) utilizando 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato de sodio como referencia interna.

3.3. Estudio por metilación del polisacárido.

La metilación de los hidroxilos libres de un polisacárido, es decir, de aquellos que no están implicados en la formación del anillo, ni en los enlaces glicosídicos, ni llevan sustituyentes estables, seguida de hidrólisis e identificación de los azúcares parcialmente metilados, constituye uno de los métodos más antiguos pero aún más utilizado en la determinación estructural de un polisacárido (32).

3.3.1. Metilación del polisacárido.

Los procedimientos más utilizados en la

metilación de oligosacáridos y polisacáridos son el de Haworth (33), que emplea sulfato de dimetilo en hidróxido sódico acuoso; el de Purdie e Irvine (34), que utiliza yoduro de metilo y óxido de plata; el de Kuhn (35), que usa yoduro de metilo y óxido de plata en dimetilformamida o dimetilsulfóxido y el de Hakomori (36), que emplea yoduro de metilo y metilsulfinilmetanuro sódico. Este último es el que se utiliza en este trabajo, siguiendo el procedimiento modificado por Paz Parente y col (37).

La base usada en esta reacción, metilsulfinilmetanuro, se genera por reacción del *terc*-butóxido potásico con dimetilsulfóxido (38). Cuando se añade el anión a una solución del oligosacárido o polisacárido en dimetilsulfóxido, los hidroxilos libres se transforman completamente en alcóxidos. La adición de yoduro de metilo a la solución de alcóxidos conduce a la eterificación completa.

Para la preparación de la base hemos seguido el método de Finne y col (39). El procedimiento que se sigue es el siguiente: se prepara una disolución de *terc*-butóxido potásico (1,4 g) en dimetilsulfóxido seco (4,2 ml) y se introduce en un baño ultrasónico durante 30 minutos para formar el carbanión. El polisacárido (3 mg) se disuelve en

dimetilsulfóxido (1 ml) con ayuda del baño ultrasónico. Se añade metilsulfinilmetanuro potásico (1 ml) y se introduce en el baño ultrasónico durante 60 minutos. Se comprueba la existencia de un ligero exceso de base en la mezcla de reacción mediante un ensayo descrito por Rauvala (40), que consiste en depositar una pequeña alícuota de la disolución sobre una pequeña cantidad de trifenilmetano en un vidrio de reloj, la aparición de una coloración roja indica un exceso de base en el medio. Después de esta comprobación, se enfría la mezcla a -4°C y se añade yoduro de metilo (1 ml) a dicha temperatura. Se introduce en el baño ultrasónico durante 45 minutos. Todas las etapas de la reacción se realizan en atmósfera de nitrógeno. La metilación se detiene por adición de 5 ml de agua destilada con unos cristales de tiosulfato sódico. A continuación se extrae con diclorometano (3 x 1 ml). Los extractos orgánicos se lavan con agua (3 x 3 ml) y se evaporan a sequedad. El polisacárido permetilado se disuelve en una pequeña cantidad de diclorometano-etanol (1:1) y se pasa por una columna (34 x 1 cm) de Sephadex LH-20 estabilizada en diclorometano-etanol (1:1) y se eluye con este mismo disolvente (41). El polisacárido permetilado se recupera en el volumen vacío de la columna.

Los polisacáridos permetilados son mucho

menos solubles en disolventes acuosos que en disolventes orgánicos, por ello la despolimerización de un polisacárido permetilado conviene realizarla en primer lugar con un ácido orgánico y luego completarla con un ácido acuoso (42).

El polisacárido permetilado se hidroliza con ácido fórmico (1 ml) al 88% durante 1 hora a 100°C (10). Se elimina el ácido por evaporación a sequedad bajo presión reducida. Se realiza una hidrólisis con ácido trifluoroacético 2 N (1 ml) durante 90 minutos a 121°C o durante 4 horas a 100°C. El ácido trifluoroacético se elimina como se describe en el apartado 3.1.1.

3.3.2. Caracterización de los monosacáridos parcialmente metilados.

La identificación de la estructura de un polisacárido requiere la identificación de los azúcares parcialmente metilados formados en la despolimerización del polisacárido permetilado.

La despolimerización puede hacerse por hidrólisis ácida o metanólisis (43). En el primer caso

se obtendrán los azúcares parcialmente metilados que pueden acetilarse o convertirse en los trimetilsilil éteres; en el segundo caso se obtendrán los metilglicósidos. Tanto en un caso como en otro, para un mismo derivado de azúcar se obtendrán varios picos cromatográficos correspondientes a los anómeros α y β . Lo más usual es convertir los azúcares parcialmente metilados en acetatos de alditoles parcialmente metilados (44). Este último procedimiento es el que se sigue en este trabajo, dada la facilidad en la preparación de los alditoles metilados, en la interpretación de los espectros de masas y porque existe una amplia bibliografía donde se recogen los tiempos de retención en diversas columnas y condiciones cromatográficas (45).

En cuanto a la espectrometría de masas (e.m.) de los acetatos de alditoles parcialmente metilados, existe abundante bibliografía (46, 47, 48). En ella se propone que la fragmentación de estos compuestos tiene lugar según las siguientes consideraciones:

- Los fragmentos primarios se forman por rotura de la cadena del alditol como se formula en la figura 8.

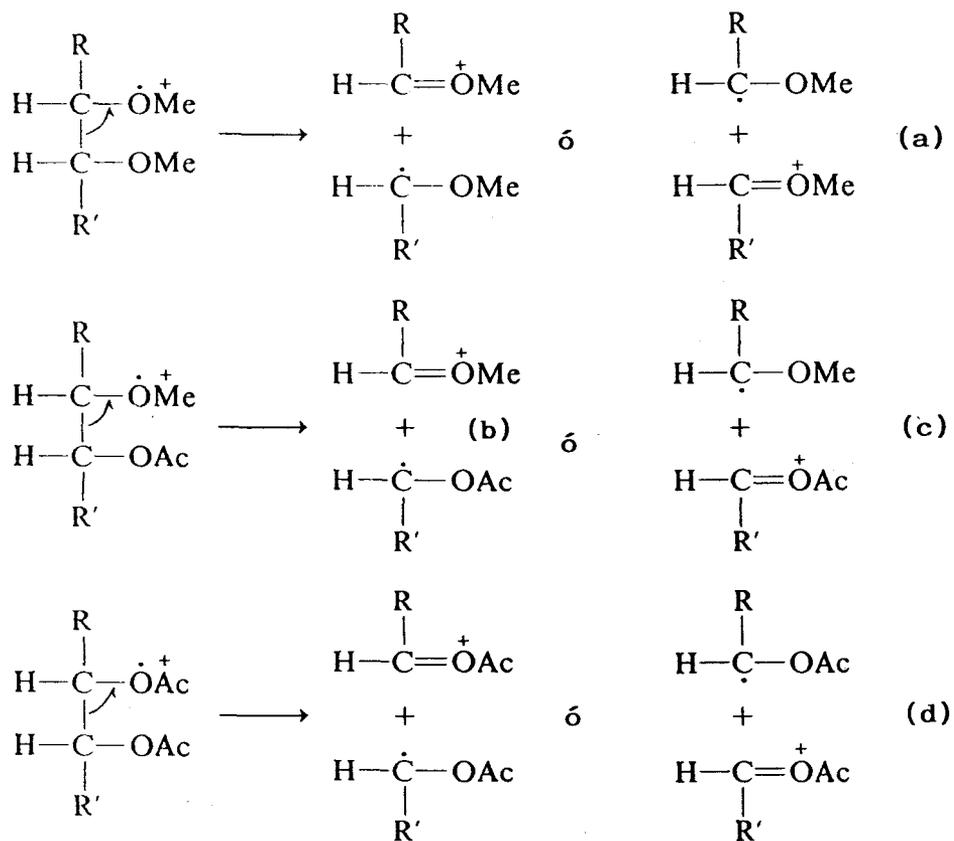


Figura 8.- Fragmentos primarios formados por rotura de la cadena del acetato de alditol parcialmente metilado.

- Las fragmentaciones a y b son mucho más importantes que las c y d.

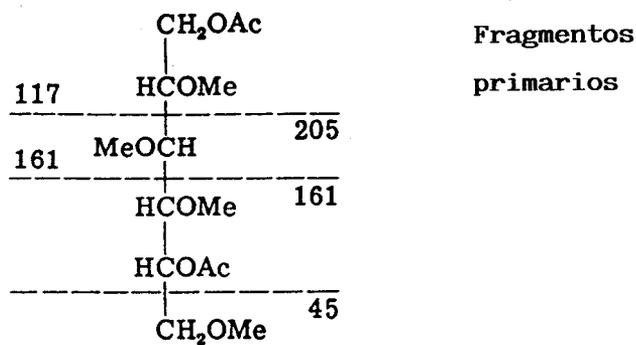
- Los fragmentos secundarios observados pueden derivar de los primarios por pérdidas de ácido acético, cetena, metanol o formaldehído.

Los esquemas de fragmentación y los espectros de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados de los azúcares más frecuentes están descritos por Lindberg y col (49). En la figura 9 se representan, a modo de ejemplo, las fragmentaciones del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

3.3.2.1. Instrumentación.

C.g.l.: se utiliza el mismo cromatógrafo descrito en el apartado 3.1.3.1.2. La columna utilizada es de acero inoxidable (2 m x 0,3 cm) rellena con 3% de ECNSS-M en Gas Chrom Q (100-120 mesh). La temperatura de la columna es 170°C y el gas portador nitrógeno a 30 ml/min.

Los tiempos de retención relativos se



Fragmentos
primarios

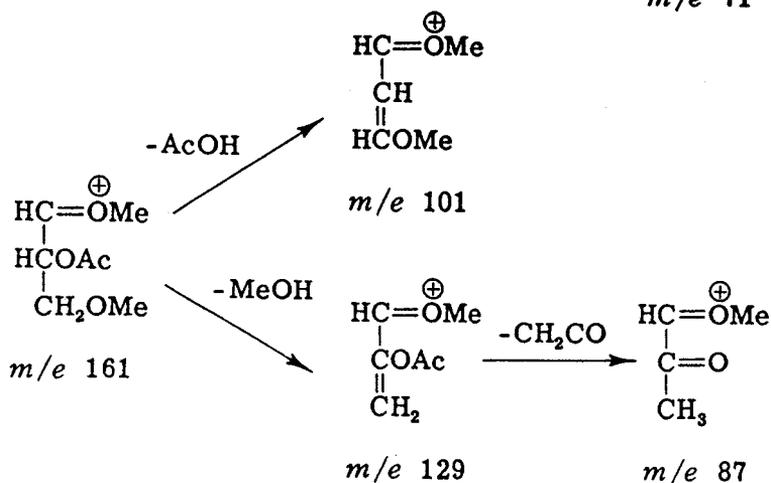
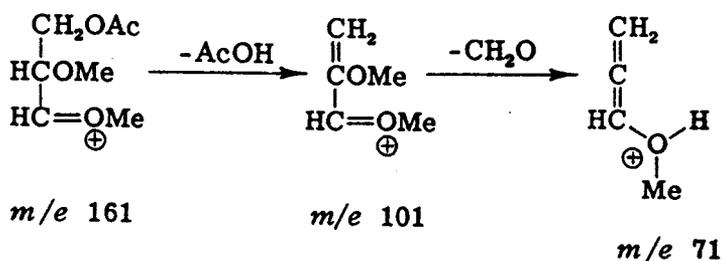
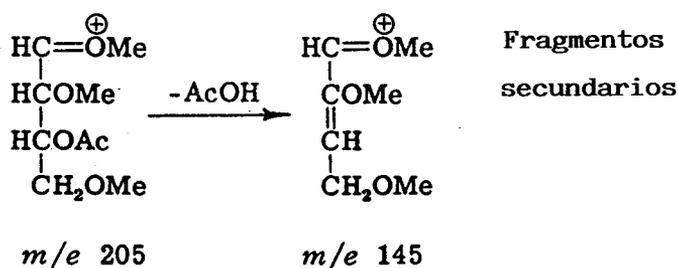


Figura 9.- Fragmentaciones del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

calculan respecto al del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol. La preparación de los acetatos de alditoles parcialmente metilados es semejante a la de los acetatos de alditoles (apartado 3.1.3.1.1.). La relación molar entre los distintos componentes de una mezcla se calcula basándose en los factores molares de respuesta según la teoría de e.c.r. (effective carbon response) tal como describe Albersheim y col (50).

C.g.l.-e.m.: se utiliza un sistema Kratos MS-80 RFA equipado con una columna CP-SIL 5 W.C.O.T. (25 m x 0,32 mm). Se utiliza un gradiente de temperatura de 5°C/min. desde una temperatura inicial de 100°C hasta una temperatura final de 250°C. Todos los espectros se realizan a 70 eV.

3.4. Localización de sustituyentes.

Los sustituyentes encontrados en el polisacárido son el piruvato y el acetato. El piruvato se localiza por comparación entre los resultados del análisis por metilación del polisacárido nativo y del polisacárido modificado; el acetato se localiza comparando los resultados del análisis por metilación del polisacárido siguiendo diferentes métodos de

metilación.

3.4.1. Localización de ácido pirúvico.

La comparación de los resultados del análisis por metilación del polisacárido nativo y del polisacárido despiruvatado indican sobre qué azúcar y sobre cuáles hidroxilos de dicho azúcar se localiza la función cetal en el polisacárido, tal como se indica en la figura 10.

Estos residuos del ácido pirúvico son fácilmente eliminados por hidrólisis ácida moderada. Se utiliza una modificación de la técnica descrita por Lew y Heidelberger (51).

Se añade ácido sulfúrico 5 mM (6 ml) sobre el polisacárido nativo (3,5 mg) y se calienta a 90°C durante 135 minutos. Se dializa durante 24 horas y se evapora hasta sequedad.

El posterior proceso de metilación, obtención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados y su análisis por c.g.l. y c.g.l.-e.m. es idéntico al descrito para el polisacárido nativo

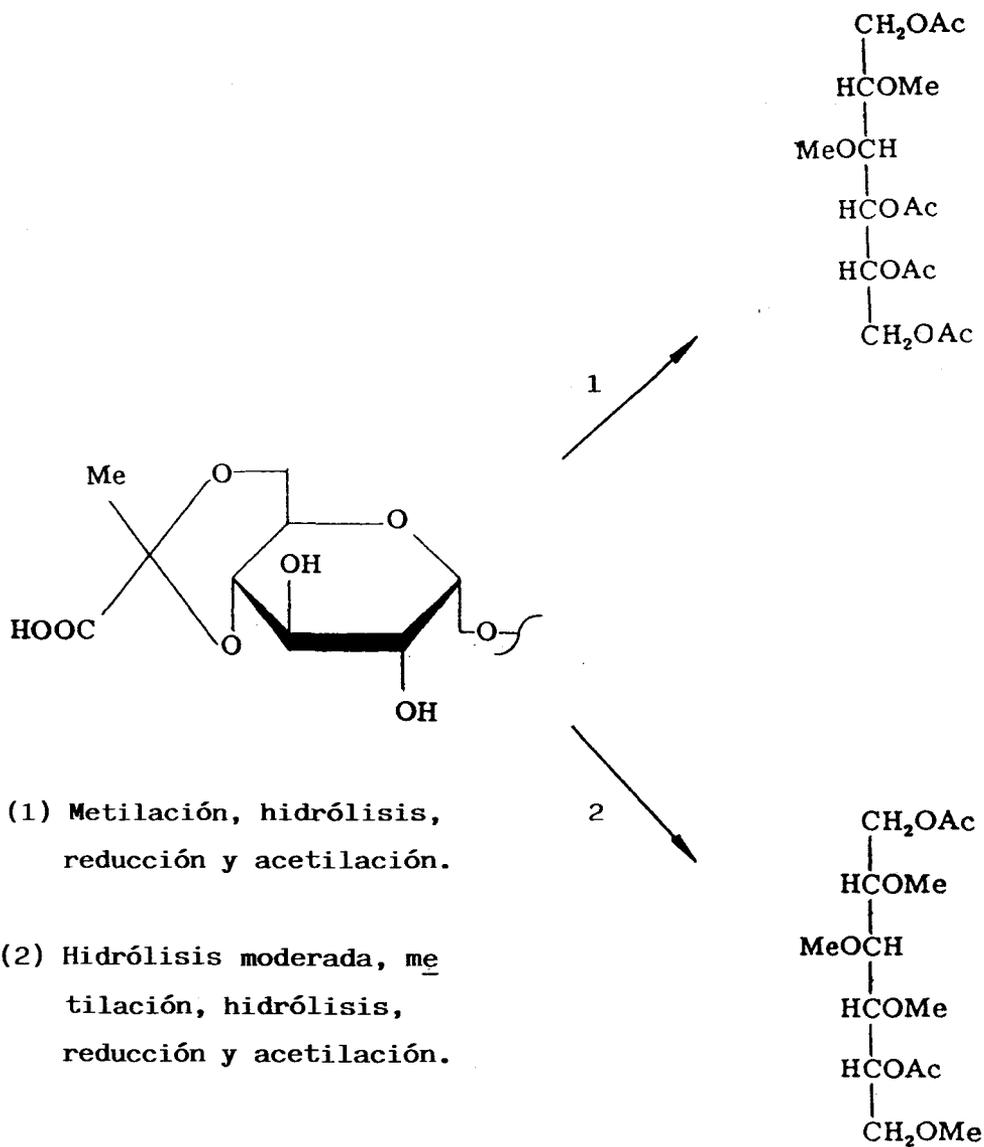


Figura 10.- Esquema de localización del ácido pirúvico.

(apartado 3.3.).

3.4.2. Localización de acetato.

Acabamos de ver que la estabilidad de los enlaces cetálicos de piruvato permite su localización por sustitución de los hidroxilos libres del polisacárido con ayuda de la metilación.

Esta técnica no es aplicable en lo que concierne a sustituyentes O-acetilos por ser saponificables por la base de metilación que se emplea. En este caso se recurre al método de metilación desarrollado por Prehm (52) en el cual los acetilos son retenidos durante la metilación debido a la baja nucleofilia existente.

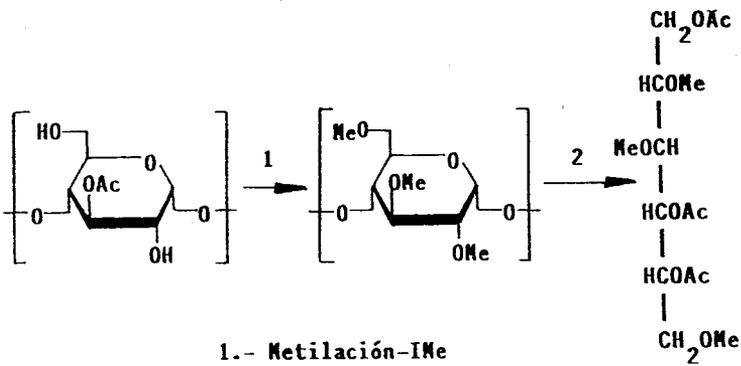
En este trabajo se pone a punto con éxito un método nuevo no descrito en la bibliografía que consiste en una metilación de Prehm seguida de metilación con yoduro de trideuterometilo en medio básico.

En ambos casos se comparan los cromatogramas c.g.l.-e.m. obtenidos con los del polisacárido

nativo para localizar sobre qué azúcar y sobre cuál hidroxilo de dicho azúcar se localiza el acetato en el polisacárido nativo. El proceso detallado se muestra en la figura 11.

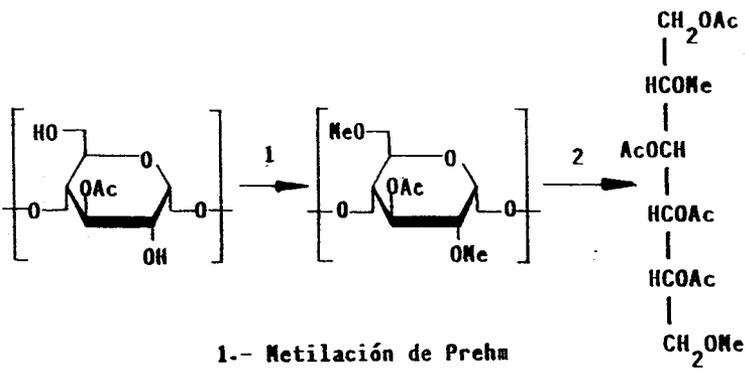
El procedimiento de metilación de Prehm es el siguiente (52): se suspende el polisacárido (5 mg) en trimetilfosfato (1 ml) con ayuda de un baño ultrasónico. Se añade 2,6-di-(terc-butil)piridina (150 μ l) a la solución obtenida. Se adiciona a continuación trifluorometanosulfonato de metilo (100 μ l) y se deja reaccionar durante 2 horas a 50°C. Se añade a la solución cloroformo-agua (1:4) (25 ml) y la fase clorofórmica se separa por centrifugación. Se extrae la fase orgánica y se lava con agua destilada. Se evapora a sequedad y se procede a la purificación del polisacárido permetilado por cromatografía de filtración sobre gel Sephadex LH-20 tal como se describe en el apartado 3.3.1..

La obtención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados y su análisis por c.g.l.-e.m. se sigue según el procedimiento descrito para el polisacárido en el apartado 3.3.



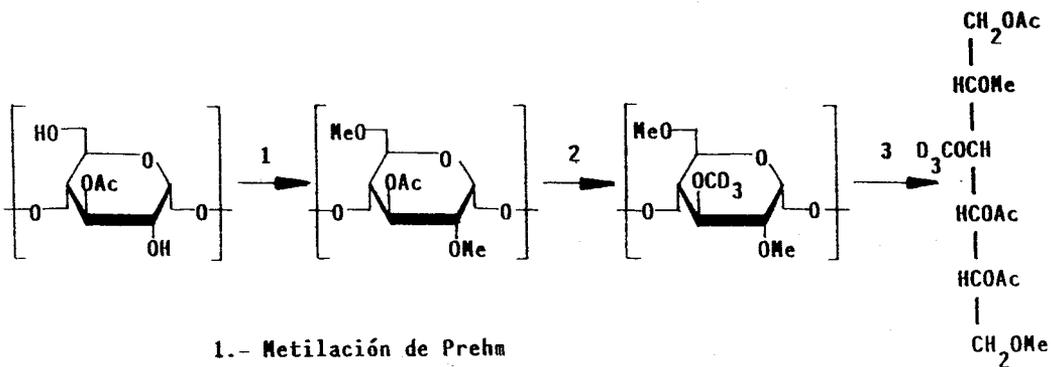
1.- Metilación- I-Me

2.- Hidrólisis, reducción
y acetilación.



1.- Metilación de Prehm

2.- Hidrólisis, reducción
y acetilación.



1.- Metilación de Prehm

2.- Metilación- ICD_3

3.- Hidrólisis, reducción
y acetilación.

Figura 11.- Esquema de localización del acetato.

3.5. Caracterización de oligosacáridos.

La estructura de los oligosacáridos aislados de un polisacárido por despolimerización parcial del mismo nos dará información sobre la secuencia en que se hallan enlazados los restos de azúcares, los tipos de enlaces entre ellos y la configuración de los enlaces glicosídicos.

Dependiendo de la complejidad de la mezcla de azúcares obtenida en la despolimerización parcial, la separación a escala preparativa para una caracterización individual puede ser llevada a cabo por combinación de cromatografía sobre papel (53) y varios tipos de columnas cromatográficas de filtración sobre gel (54).

El análisis estructural de los oligosacáridos se efectúa por metilación análoga a la aplicada en el polisacárido nativo.

3.5.1. Despolimerización parcial.

En la bibliografía se detallan diversos

métodos de despolimerización parcial de polisacáridos (55) tanto en medio acuoso como es el caso de la hidrólisis parcial ácida, como en medio no acuoso entre los que se encuentran: acetólisis, trifluoroacetólisis, mercaptólisis, metanólisis; así como métodos basados en degradaciones oxidativas y enzimáticas.

De entre todos estos métodos se utiliza la hidrólisis parcial ácida.

La hidrólisis parcial ácida de un polisacárido (56) que contiene un sólo tipo de enlace, da lugar a una serie homóloga de oligosacáridos. Sin embargo, los polisacáridos contienen ordinariamente diferentes enlaces glicosídicos, que se hidrolizan a distintas velocidades (57). En general los enlaces furanósicos son más lábiles que los enlaces piranósicos, los enlaces α -glicosídicos son frecuentemente más lábiles que los enlaces β -glicosídicos y también se incrementa la resistencia a la hidrólisis ácida por la presencia de ácidos urónicos y aminoazúcares.

El grado de hidrólisis se consigue variando la concentración de los ácidos o los tiempos de hidrólisis. En la literatura se recoge el uso de diferentes ácidos como el ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, etc (58).

En este trabajo se sigue el procedimiento siguiente: al polisacárido nativo se le añade ácido trifluoroacético 0,5 N (1 ml/10 mg de polisacárido). Se calienta a 100°C durante 1 hora. A continuación se dializa frente a agua destilada durante 24 horas. El agua de diálisis que contiene monosacáridos y oligosacáridos se concentra a volumen pequeño (2 ml) y la solución del interior del saco de diálisis se liofiliza y se procede a una nueva despolimerización parcial con ácido trifluoroacético 0,5 N a 100°C durante 1 hora. Esta operación se repite otra vez más variando el tiempo de hidrólisis a 2 horas.

3.5.2. Separación de los oligosacáridos.

La separación de los oligosacáridos procedentes de la hidrólisis parcial del polisacárido se lleva a cabo por diferentes técnicas cromatográficas (59): cromatografía sobre resinas de intercambio iónico, cromatografía de filtración sobre gel o cromatografía de partición sobre celulosa o de adsorción sobre carbón-celita.

En nuestro caso se utiliza la cromatografía de filtración sobre gel (c.f.g.), cromatografía

sobre capa fina (c.c.f.) y cromatografía sobre papel (c.p.).

3.5.2.1. Cromatografía de filtración sobre gel.

La cromatografía de filtración sobre geles porosos está basada en la permeabilidad decreciente de las moléculas de un soluto a través de una red tridimensional de gel hinchado, en función de sus pesos moleculares crecientes (54).

Este procedimiento proporciona un método rápido y relativamente simple para la separación de sustancias que difieren en su tamaño molecular, o para el fraccionamiento de polímeros (tales como polisacáridos) (60).

Como el orden de elución de una serie de sustancias similares está gobernado por el peso molecular, la cromatografía de filtración sobre gel puede ser utilizada en la determinación de pesos moleculares de polisacáridos.

En este trabajo se aplica al fraccionamiento de los oligosacáridos obtenidos en la

despolimerización parcial del polisacárido.

3.5.2.1.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas.

El fraccionamiento de los oligosacáridos, se realiza en una columna de la firma Pharmacia Fine Chemicals con un diámetro de 2,5 cm y una altura de 90 cm, rellena de Biogel P-2. El Biogel P-2 es un gel formado por polimerización de acrilamida en presencia de N,N'-metilenbisacrilamida.

El flujo del eluyente se controla con una bomba peristáltica P-3 de la casa Pharmacia Fine Chemicals. El eluyente utilizado es agua destilada con un velocidad de flujo de 8, 20 ó 10 ml/hora según los casos. Las muestras se disuelven en el mismo eluyente. Se recogen fracciones de 2 ó 3,3 ml con un colector de fracciones automático LKB 7000 Ultrorac y el curso de la separación cromatográfica se sigue mediante la determinación del contenido de azúcares totales en cada eluato por el método del orcinol-sulfúrico (61).

El método es como sigue: se toman 5 μ l de cada eluato y se depositan sobre una placa de aluminio

con gel de sílice 60 (Alugram Sil G) y se deja secar. Se pulveriza con una disolución que contiene 200 mg de orcinol (3,5-dihidroxitolueno) en 100 ml de ácido sulfúrico al 20% y se calienta a 100°C. En los eluatos donde hay azúcar aparece una coloración violeta.

3.5.2.2. Cromatografía sobre capa fina.

Los eluatos con los azúcares procedentes de la hidrólisis parcial se cromatografían sobre capa fina. Mediante esta técnica los distintos azúcares (monosacáridos y oligosacáridos) se separan según su grado de polimerización o peso molecular aproximados (62).

Se utiliza una placa de 20 cm x 20 cm de gel de sílice 60. La placa se introduce en un tanque cromatográfico que contiene 80 ml de butanol-ácido acético-agua (2:1:1) y se eluye por técnica ascendente durante una noche. Se revela con orcinol-sulfúrico. Las disoluciones de referencia se preparan con azúcares comerciales a una concentración del 2% para los monosacáridos y del 5% para los oligosacáridos.

3.5.2.3. Cromatografía sobre papel.

La cromatografía sobre papel es un método eficaz en la separación e identificación de mezclas complejas de azúcares (63). En este trabajo se sigue la técnica vertical descendente.

3.5.2.3.1. Materiales.

Se utilizan tiras de papel Whatman n° 3MM de 48 cm de longitud y ancho variable. Las muestras a aplicar se colocan dejando intervalos de 2 cm entre cada dos puntos y a una distancia de 2 cm del borde del papel. Se trazan a cada lado de la tira de papel dos tiras testigos con un punto cada una a 2 cm de cada uno de sus extremos. Las disoluciones de referencia se preparan con azúcares comerciales a una concentración del 2% para los monosacáridos y del 5% para los oligosacáridos.

El desarrollador utilizado es butanol-etanol-agua (2:1:1).

El revelador empleado es nitrato de

plata-hidróxido sódico (64). El revelador se prepara diluyendo una disolución acuosa saturada de nitrato de plata (1 ml) con acetona (200 ml). El revelado se realiza de la siguiente manera: las tiras testigos una vez secas se sumergen en esta disolución, se evapora la acetona y se introduce en una disolución de hidróxido sódico 0,5 N en etanol acuoso (preparada por dilución de hidróxido sódico al 40% acuoso en etanol). El exceso de plata se elimina lavando con una solución acuosa al 20% de tiosulfato sódico y posteriormente con agua.

3.5.2.3.2. Cromatografía sobre papel preparativa.

La cromatografía sobre papel preparativa (c.p.p.) se utiliza para el aislamiento de pequeñas cantidades de muestra.

Para ello se prepara una tira de papel tal como se indica en el apartado 3.5.2.3.1. La muestra se deposita en la línea base de manera que las manchas sean tangentes unas a otras hasta agotar la muestra. Se eluye durante aproximadamente 72 horas y luego se seca. Se cortan las bandas testigos y se revelan. Se reconstruye el cromatograma y se corta la

banda central transversalmente por donde, a la vista del revelado de las bandas testigos, se encuentran las distintas sustancias separadas. Estas tiras de papel se eluyen con agua destilada durante 24 horas. Por último cada disolución obtenida se liofiliza.

3.5.3. Análisis estructural de los oligosacáridos.

El análisis se lleva a cabo por metilación de forma análoga a la descrita para el polisacárido nativo.

En los oligosacáridos en los cuales puedan existir dudas sobre la identificación del azúcar reductor, se realiza una reducción del oligosacárido con borodeuteruro antes de proceder a su metilación (65).

Con este procedimiento se consigue reducir el residuo de azúcar terminal de un oligosacárido a su correspondiente alditol. Por comparación del cromatograma de los acetatos de alditoles parcialmente metilados (tras metilación, hidrólisis, reducción y acetilación) con el obtenido por metilación del

oligosacárido nativo, se consigue identificar cuál es la posición del enlace que une la cadena del oligosacárido a su azúcar terminal reductor tal como se muestra en la figura 12 para el caso de un oligosacárido hipotético.

3.5.3.1. Prerreducción de los oligosacáridos.

El procedimiento que se sigue es el de Waeghe y col. (66): al oligosacárido (100 μg) se le añade una solución de borodeuteruro sódico al 0,1% en amoníaco 1 M (100 μl). La disolución se agita y se deja a temperatura ambiente durante toda una noche. El exceso de borodeuteruro se destruye por adición de ácido acético concentrado (10 μl), el borato formado se elimina bajo presión reducida por evaporaciones sucesivas con metanol-ácido acético (9:1) (3 x 0,5 ml) bajo corriente de nitrógeno mientras la solución se calienta a 50°C, y posteriormente con metanol (4 x 0,5 ml).

El oligosacárido prerreducido se pasa a través de una columna de resina de intercambio catiónico (forma H^+). El acetato sódico formado durante las evaporaciones se transforma en ácido

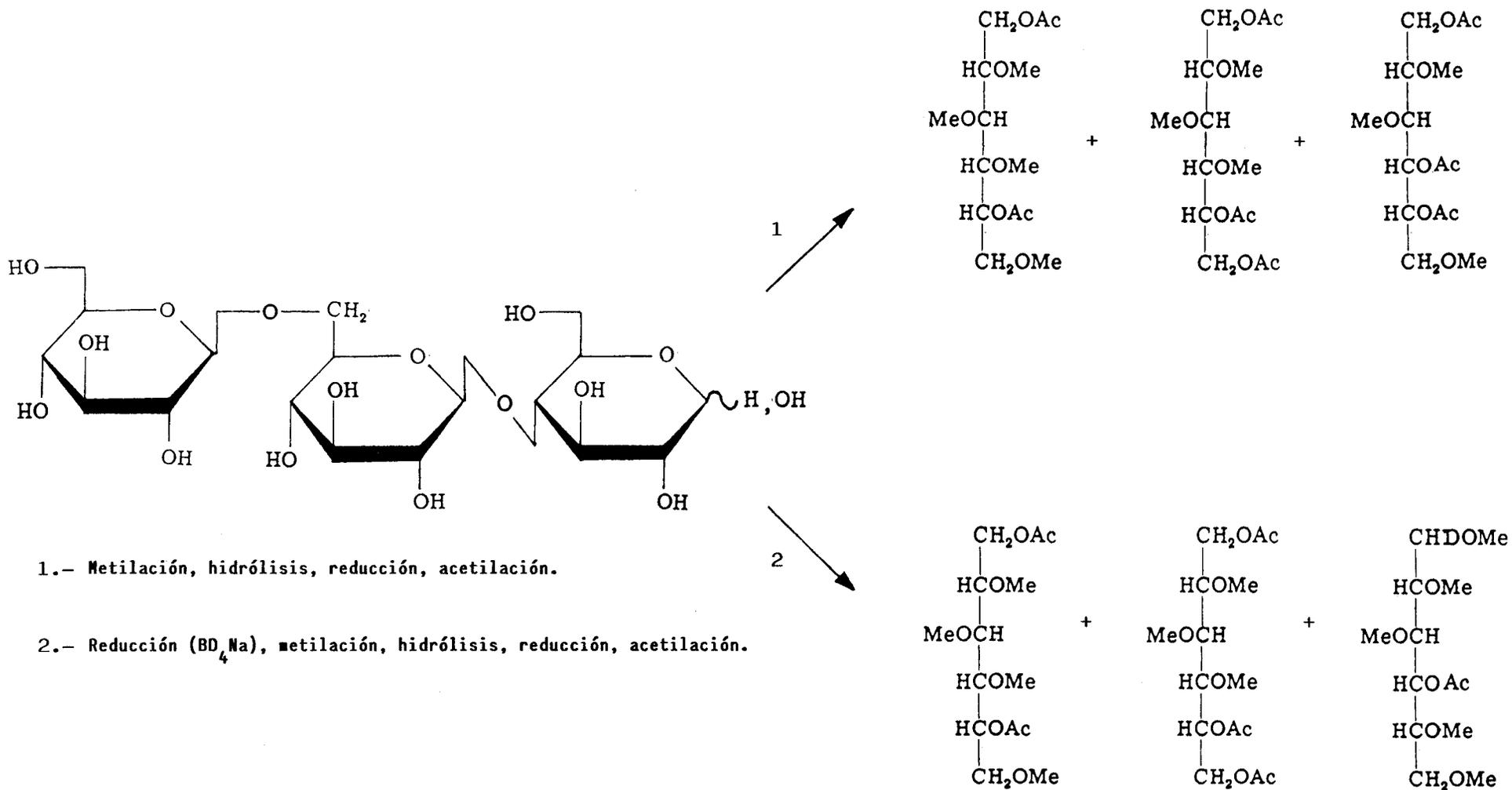


Figura 12

acético, el cual se elimina por liofilización: el oligosacárido disuelto en agua (0,2 ml) se pasa por una columna que contiene resina Dowex 50W-X (forma H⁺) (0,5 ml) y se eluye con agua. Los eluatos reunidos se liofilizan.

3.5.3.2. Metilación de oligosacáridos.

Se realiza sobre el oligosacárido nativo y sobre el mismo oligosacárido prerreducido de la misma forma que con el polisacárido nativo, con la única particularidad de que se añade una cantidad doble de yoduro de metilo con respecto al metilsulfonilmetanuro, y que no se realiza la etapa de purificación por columna de Sephadex LH-20.

La hidrólisis del oligosacárido permetilado (prerreducido o no), reducción, acetilación y análisis de los acetatos de alditoles parcialmente metilados por c.g.l.-e.m., son idénticas a las descritas para el polisacárido nativo.

4.

RESULTADOS

4.1. Cultivos de bacterias y aislamiento del exopolisacárido.

Tanto la producción como las propiedades físico-químicas de los exopolisacáridos experimentan variaciones dependiendo de las condiciones a las que sean sometidas las bacterias durante su cultivo.

Los factores críticos para la producción de polisacáridos bacterianos son aquellos que influyen directamente en el crecimiento de los microorganismos (temperatura, pH y oxigenación), y los relacionados con las fuentes energéticas carbonadas y nitrogenadas.

En el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla se ha estudiado la influencia que pueden ejercer algunos factores en la producción del exopolisacárido de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899, y se ha llegado a la conclusión de que las condiciones óptimas de producción son:

- 28°C y 37°C.
- Oxigenación aeróbica en condiciones de aireación forzada.
- Velocidad de agitación a 200 r.p.m.

- Tiempo de incubación de 120 horas.
- Sacarosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (relación C:N, 5:1).

La fuente bacteriana productora del poli sacárido que se propone estudiar ha sido aislada y cultivada por el mismo Departamento.

4.1.1. Materiales y métodos.

Para la producción del polisacárido se utiliza el medio 79 de Allen, cuya composición se describe a continuación:

K_2HPO_4	0,6 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$CaCO_3$	3,0 g
NaCl.....	0,2 g
Manitol.....	7,6 g
Glucosa.....	2,4 g
Extracto de levadura.....	1,0 g
Agua destilada c.s.p.....	1000,0 ml

El pH se ajusta a 7,0 y se esteriliza en

autoclave a 121°C durante 20 minutos.

El cultivo bacteriano se inocula a partir de una colonia bacteriana y se incuba a 28°C con agitación durante 48 horas. A continuación se diluyen en medio fresco y se dejan crecer hasta una concentración aproximada de $2 \cdot 10^8$ células/ml.

4.1.1.1. Producción del polisacárido.

Las bacterias se cultivan en 125 ml de medio líquido 79 de Allen en matraces de 250 ml. Los matraces se inoculan con 5 ml de una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de $2 \cdot 10^8$ células/ml, y se incuban a 28°C con agitación durante 5 días.

4.1.1.2. Extracción.

Los cultivos obtenidos se centrifugan a 40.000 g durante 20 minutos. Al líquido sobrenadante, resultante de la centrifugación del medio de cultivo, se le adicionan dos volúmenes de acetona y el precipi

tado recogido se seca con aire caliente. Se disuelve en agua destilada y se dializa frente a agua destilada a 4°C durante 24 horas. Se vuelve a precipitar con acetona.

4.1.1.3. Purificación.

Entre los métodos descritos sobre precipitación con sales de amonio cuaternario se elige el de Scott (67) desarrollado por Valent y col (68).

Al polisacárido (1,83 g) en agua (3,66 l) se le añade sulfato sódico anhidro (5,2 g) y se agita a temperatura ambiente durante una noche. Se añade cetavión (bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio) al 10% acuoso hasta precipitación del polisacárido (50 ml). Se centrifuga, se lava con agua y se disuelve con cloruro sódico al 10% (50 ml). Se precipita con dos volúmenes de acetona, se separa el precipitado y se redisuelve en cloruro sódico al 10% (40 ml). Se dializa frente a una disolución acuosa de cloruro sódico al 1% durante 24 horas y luego frente a agua destilada durante 24 horas. Finalmente se liofiliza obteniéndose 1,012 g de polisacárido purificado.

4.2. Análisis de los componentes del polisacárido.

4.2.1. Análisis cualitativo por c.l.a.r.

El polisacárido (1 mg) se hidroliza con ácido trifluoroacético 4 N (1 ml) tal como se describe en los métodos generales (apartado 3.1.1.). El hidrolizado se cromatografía por c.l.a.r. La instrumentación y condiciones cromatográficas se detallan en el apartado 3.1.2.1.

En la figura 13 se muestra el cromatograma obtenido. Comparándolo con el de una mezcla patrón (figura 4, página 33), se identifican los siguientes componentes en el polisacárido: glucosa, galactosa, piruvato y acetato. No se observan picos que pudiesen asignarse a ácidos urónicos.

4.2.3. Determinación cuantitativa de azúcares por c.g.l.

Se realiza una hidrólisis con ácido tri

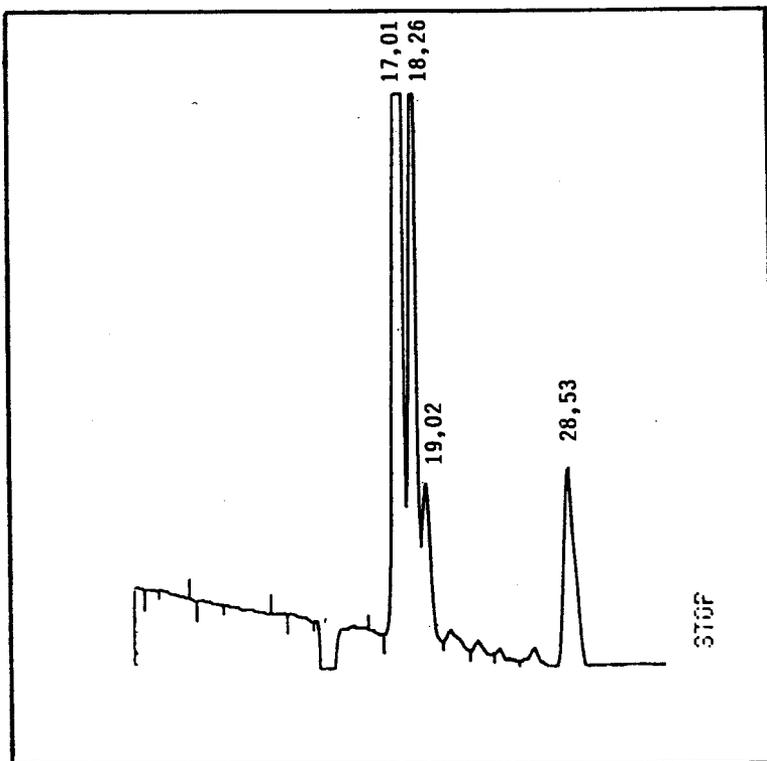


Figura 13.- Análisis cualitativo de los componentes del polisacárido. Cromatograma obtenido por c.l.a.r.

fluoroacético de 10 mg del polisacárido en presencia de 2 mg de inositol como se describe en métodos generales (apartado 3.1.1.). La determinación cuantitativa de los monosacáridos obtenidos se efectúa como se describe en el apartado 3.1.3.1.

El cromatograma obtenido se muestra en la figura 14. Tomando como referencia el cromatograma de una mezcla patrón (figura 5 , página 38), podemos identificar la glucosa y la galactosa en razón molar de 3:1.

El mismo procedimiento experimental se aplica sobre 10 mg de polisacárido reducido según el método de Taylor y Conrad (69). Mediante este procedimiento los ácidos urónicos que pudieran estar presentes se reducen a sus correspondientes azúcares neutros. La reacción tiene lugar mediante la conversión del ácido urónico en una lactona por tratamiento con una carbodiimida, y posterior reducción de la lactona a su correspondiente azúcar neutro.

El cromatograma correspondiente al polisacárido nativo y el correspondiente al polisacárido reducido son prácticamente idénticos, no observándose después de la reducción, ni la aparición de un nuevo monosacárido ni el aumento en la cantidad de algún

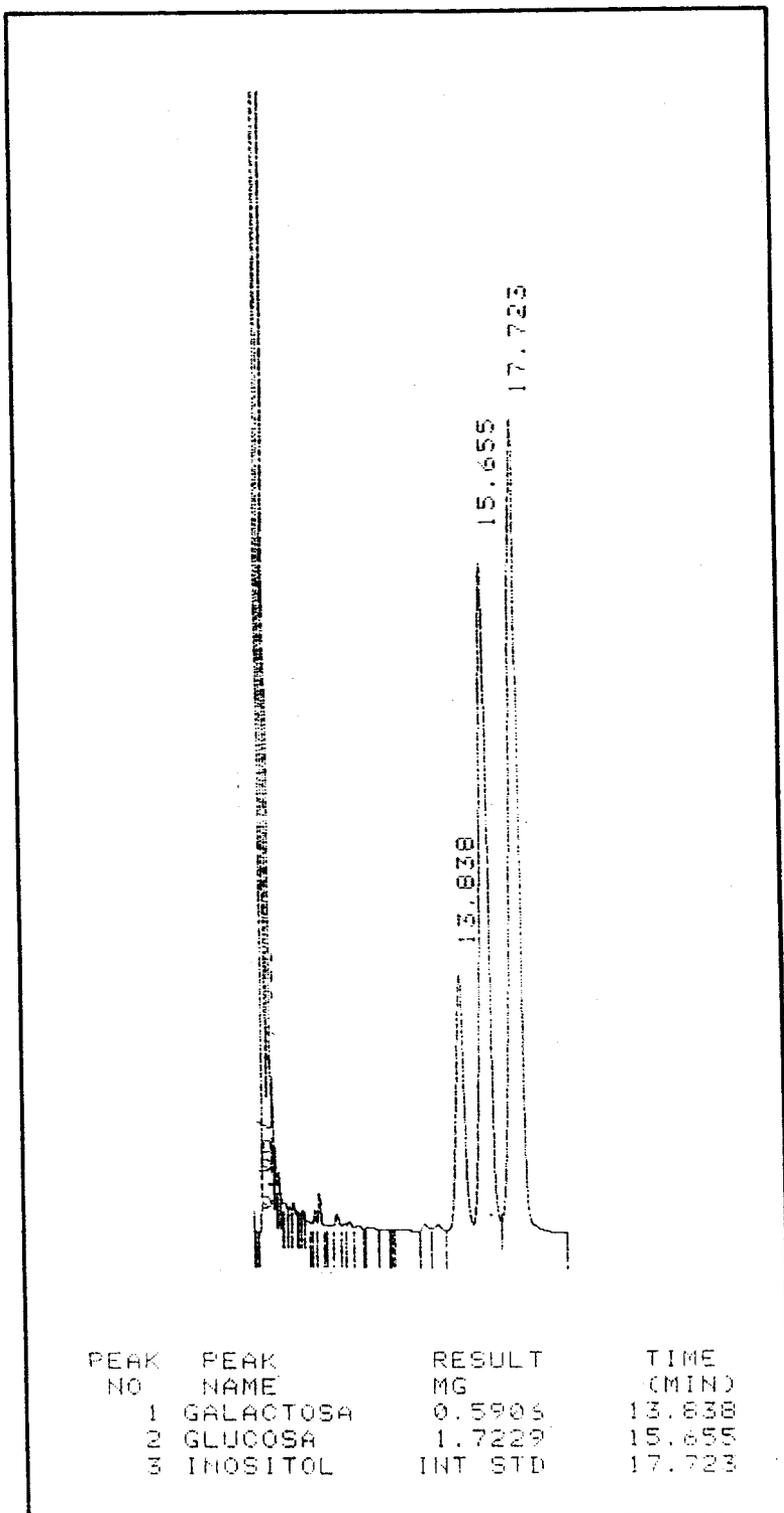


Figura 14.- c.g.l. de los acetatos de alditoles.
Hidrólisis del polisacárido. Columna SP-2340 3%.

monosacárido preexistente en el polisacárido. Este resultado confirma la ausencia de ácidos urónicos en el polisacárido estudiado.

4.2.4. Determinación cuantitativa de sustituyentes.

La determinación cuantitativa de los sustituyentes detectados por c.l.a.r. (piruvato y acetato) se realiza por métodos colorimétricos.

4.2.4.1. Determinación cuantitativa de acetato.

Se sigue el método de Downs y Pigman descrito en los métodos generales (apartado 3.1.3.2. 2.).

El procedimiento se lleva a cabo sobre las muestras de referencia y la muestra problema (1 mg de polisacárido en 1 ml de agua). Los resultados obtenidos muestran una concentración de 1 μmol de acetato por mg de polisacárido, según la recta de calibrado de la figura 7 (página 46).

4.2.4.2. Determinación cuantitativa de piruvato.

Se sigue el método de Sutherland descrito en el apartado 3.3.2.1.

El procedimiento se lleva a cabo sobre las muestras de referencia y la muestra problema (70 μg de polisacárido en 100 μl de agua). Los resultados obtenidos muestran una concentración de 101 μg de piruvato por mg de polisacárido, según la recta de calibrado de la figura 6 (página 43).

4.3. ^1H -r.m.n. a 200 MHz del polisacárido.

Se analiza el polisacárido (1 mg) por ^1H -r.m.n. tal como se describe en el apartado 3.2.

En la tabla IX se muestran los resultados obtenidos. Se confirma la existencia de piruvato y acetato por comparación de los desplazamientos químicos obtenidos con los descritos en la bibliografía (31). Observando el espectro de ^1H -r.m.n. (figura 15) se aprecia una relación aproximada en las señales correspondientes a acetato y piruvato del orden de

Tabla IX. Resultados obtenidos mediante ^1H -r.m.n. a 200 MHz del polisacárido nativo.

Señal	δ (ppm)	J (Hz)	Asignación
A	1.45	0	$\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H}$
B	2.10	0	CH_3CO_2^-
C	4.50	7	H_β (Gal)
D	4.80	7	H_β (Glc)

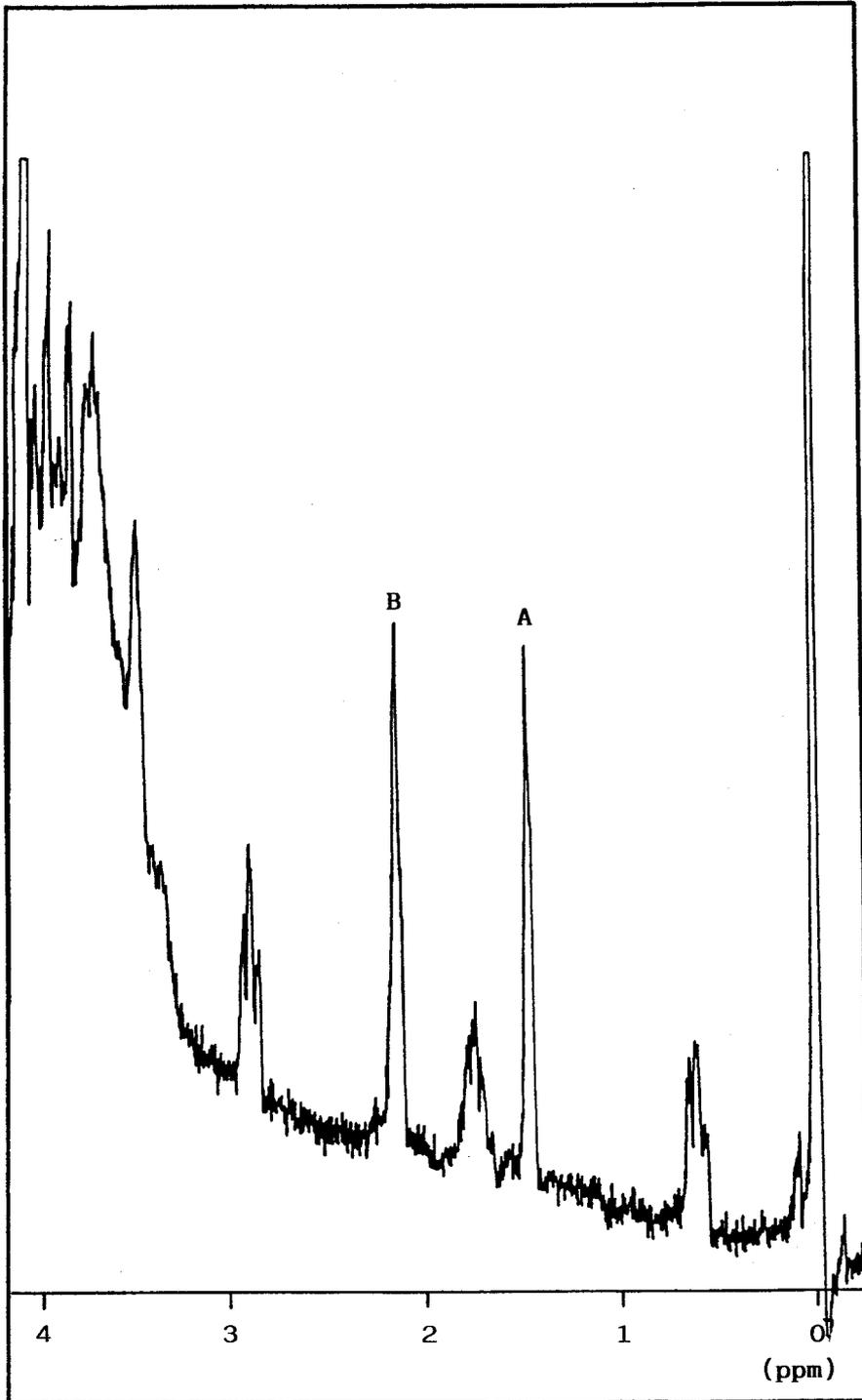


Figura 15.- ^1H -r.m.n. a 200 MHz del polisacárido.

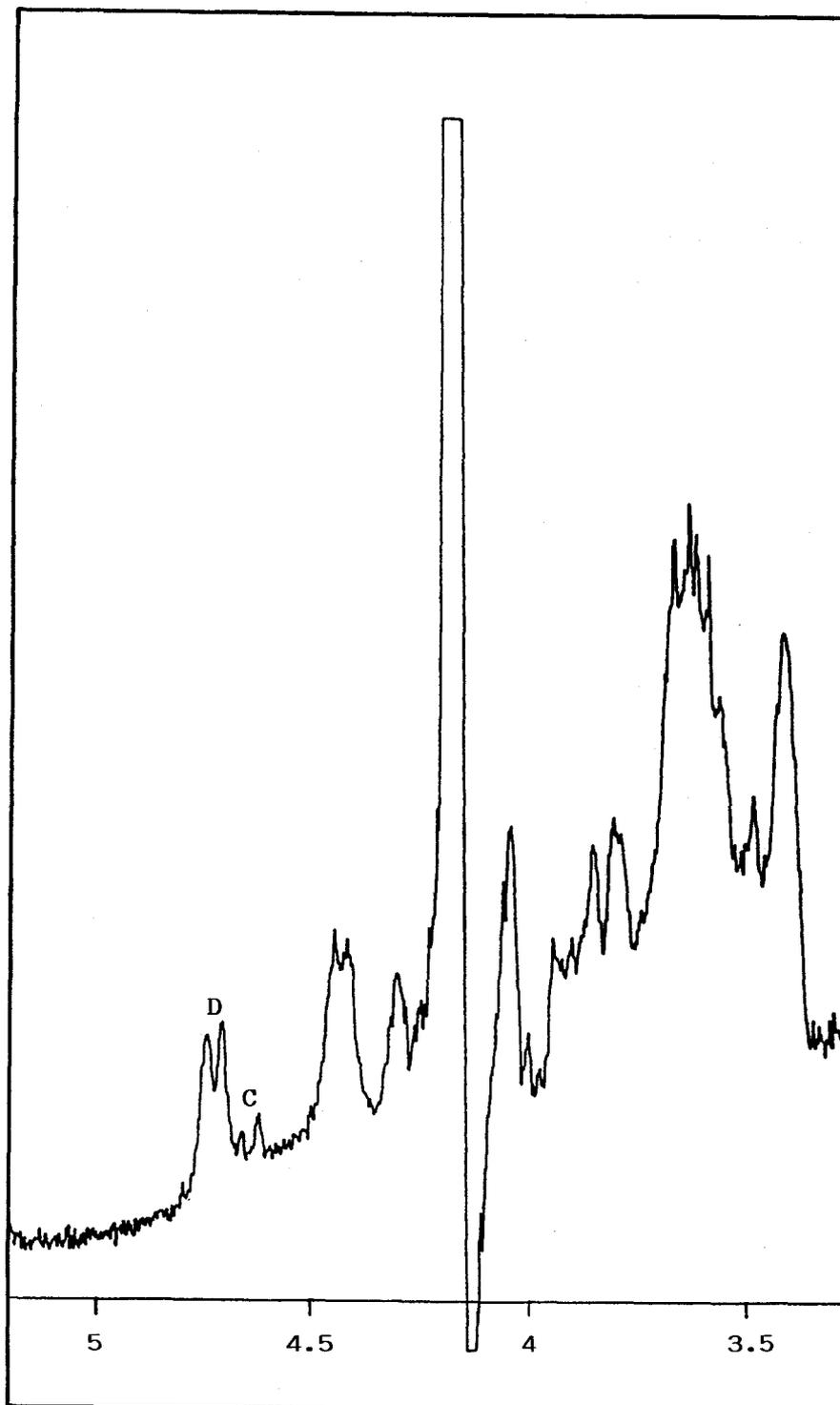


Figura 15 (continuación).- ^1H -r.m.n. a 200 MHz del poli
sacárido.

1:1, lo que supondría una relación equimolar entre ambos sustituyentes.

En la zona de los protones con anomería β ($\delta = 4,5-4,8$ ppm) se observan dos dobletes; se aprecia una relación de intensidades del orden de 3:1, asignándose a los protones anoméricos de residuos de β -D-glucosa y β -D-galactosa respectivamente, según resultados descritos en la bibliografía (70).

4.4. Metilación del polisacárido.

En la metilación del polisacárido se utiliza el método de Paz Parente y col. (37) modificado con respecto a la base de metilación empleada. En este trabajo se utiliza metilsulfinilmetanuro potásico por su facilidad de preparación.

4.4.1. Permetilación del polisacárido nativo.

La preparación de la base de metilación, reacción de metilación y despolimerización del polisacárido permetilado se describe en el apartado 3.3.1.

La permetilación del polisacárido nativo se alcanza realizando el proceso de metilación dos veces consecutivas.

4.4.1.1. Caracterización de los monosacáridos parcialmente metilados.

Los monosacáridos obtenidos por despolimerización del polisacárido permetilado son convertidos en sus correspondientes acetatos de alditoles parcialmente metilados según se describe en el apartado 3.3.2.

4.4.1.1.1. Análisis por c.g.l.

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados se cromatografían sobre una columna ECNSS-M a 170°C. La instrumentación y condiciones cromatográficas se detallan en el apartado 3.3.2.1. El cromatograma registrado se muestra en la figura 16. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla X.

Se identifican los acetatos de alditoles

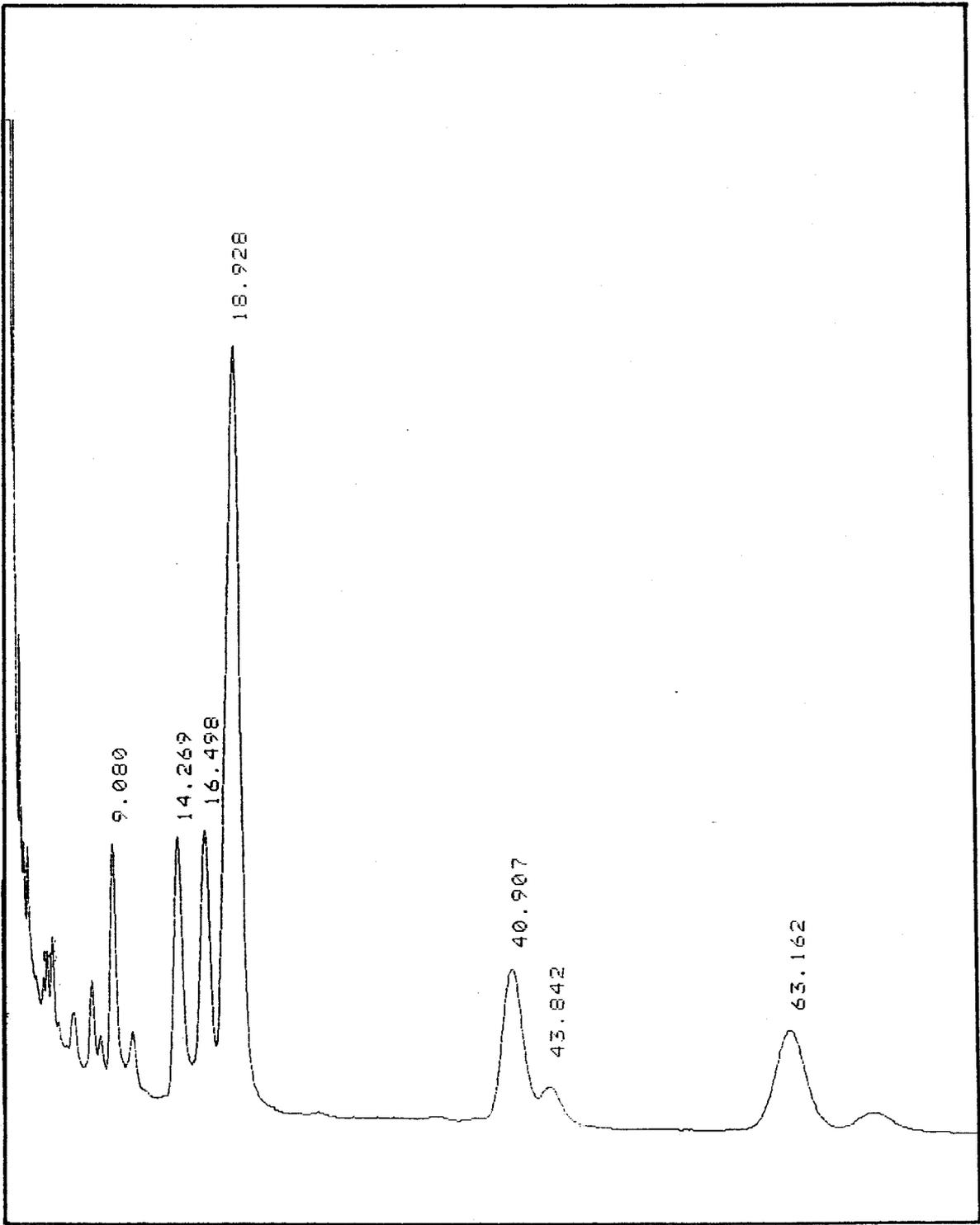


Figura 16.- c.g.l. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados, procedentes del polisacárido nativo. Columna ECNSS-M 3%.

Tabla X. Resultados obtenidos del análisis por c.g.l. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes del polisacárido nativo.

Acetatos de alditoles	t_R (min.)	t_{RR}^a (min.)
2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^b	9.080	1.24
2,4,6-Me ₃ -Glc	14.269	1.94
2,4,6-Me ₃ -Gal	16.498	2.24
2,3,6-Me ₃ -Glc	18.928	2.57
2,3,4-Me ₃ -Glc	18.928	2.57
2,3-Me ₂ -Glc	40.907	5.57
2,3-Me ₂ -Gal	43.842	5.97
2-Me -Glc	63.162	8.60

^a : Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (7.348 min.), en columna ECNSS-M 3%.

^b : 2,3,4,6-Me₄-Gal = 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol, etc.

parcialmente metilados por sus tiempos de retención relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol comparándolos con los descritos en la bibliografía.

4.4.1.1.2. Análisis por c.g.l.-e.m.

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados se cromatografían en un sistema c.g.l.-e.m. La instrumentación y condiciones cromatográficas se detallan en el apartado 3.3.2.1. Uno de los cromatogramas obtenidos se muestra en la figura 17. El cromatograma se ha registrado según el ión total. Los espectros de masas de los picos que aparecen en el cromatograma, se recogen en la figura 18. Los resultados se recogen en la tabla XI.

4.4.2. Discusión de los resultados.

La identificación de 0,4 moles de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol y de 0,6 moles de 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-galactitol permite afirmar la presencia de 1 mol de galactitol

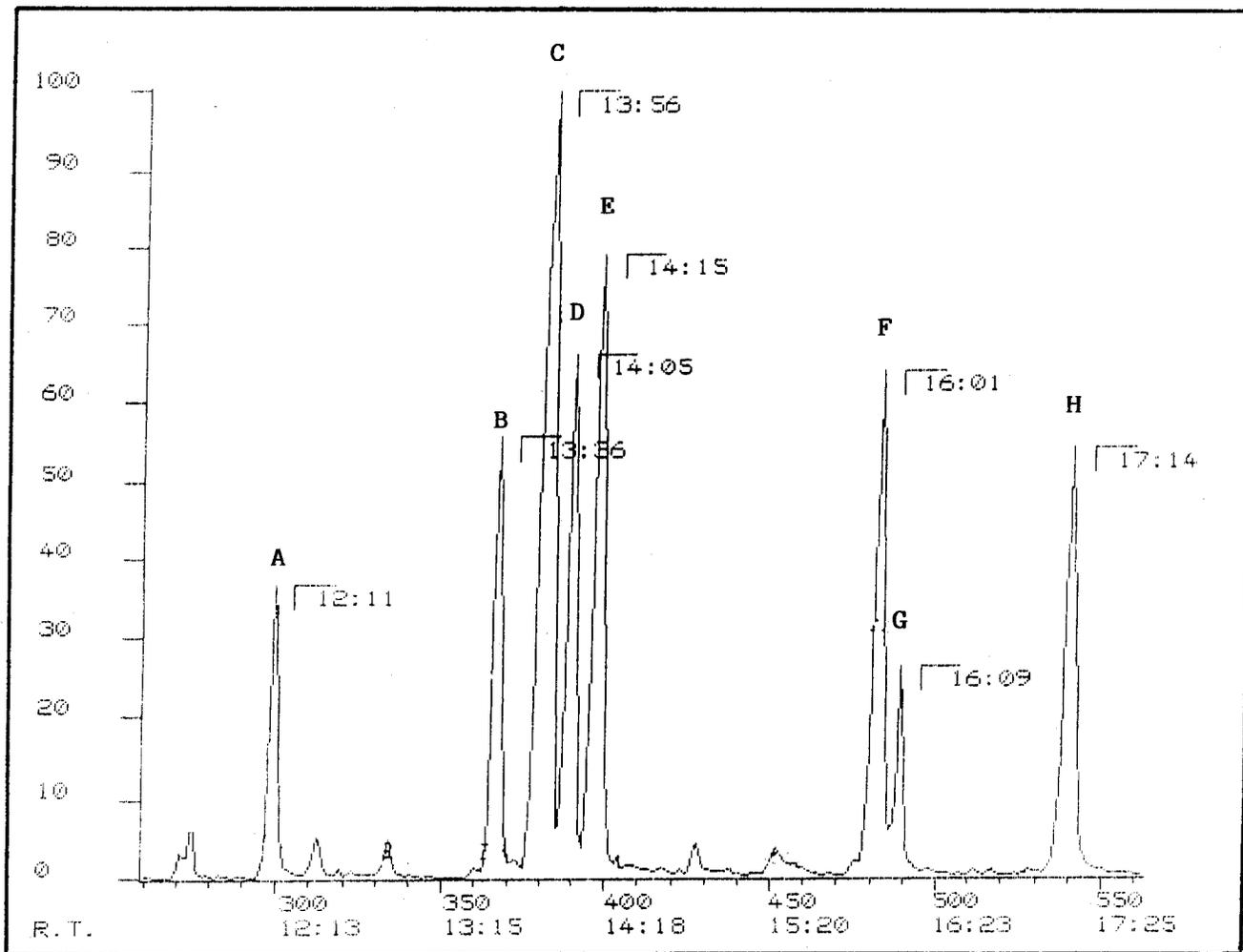
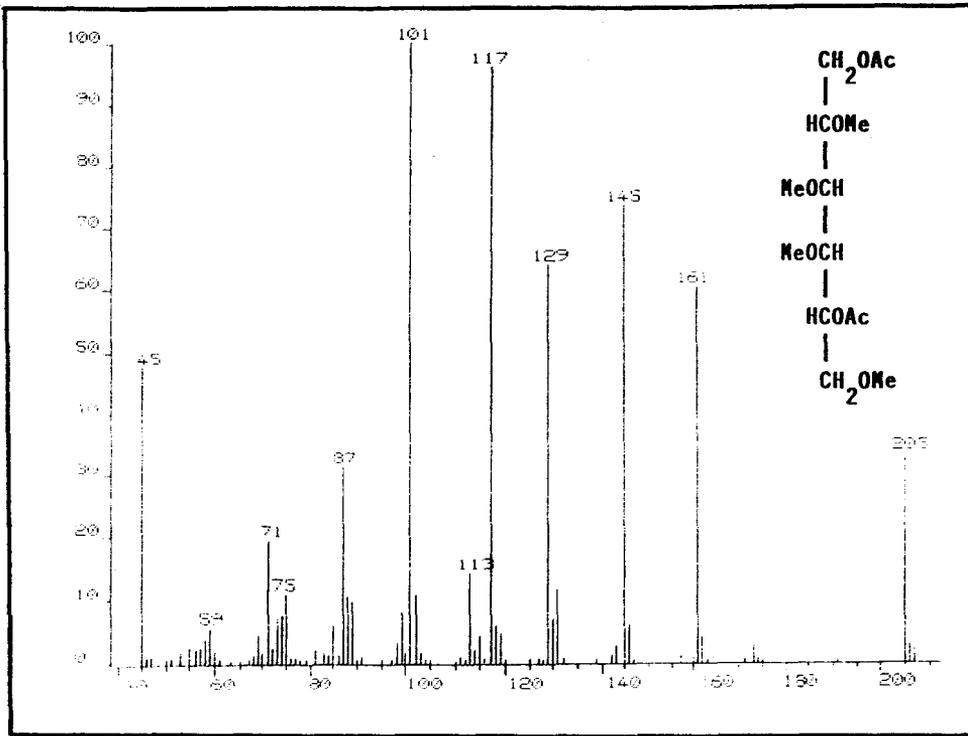
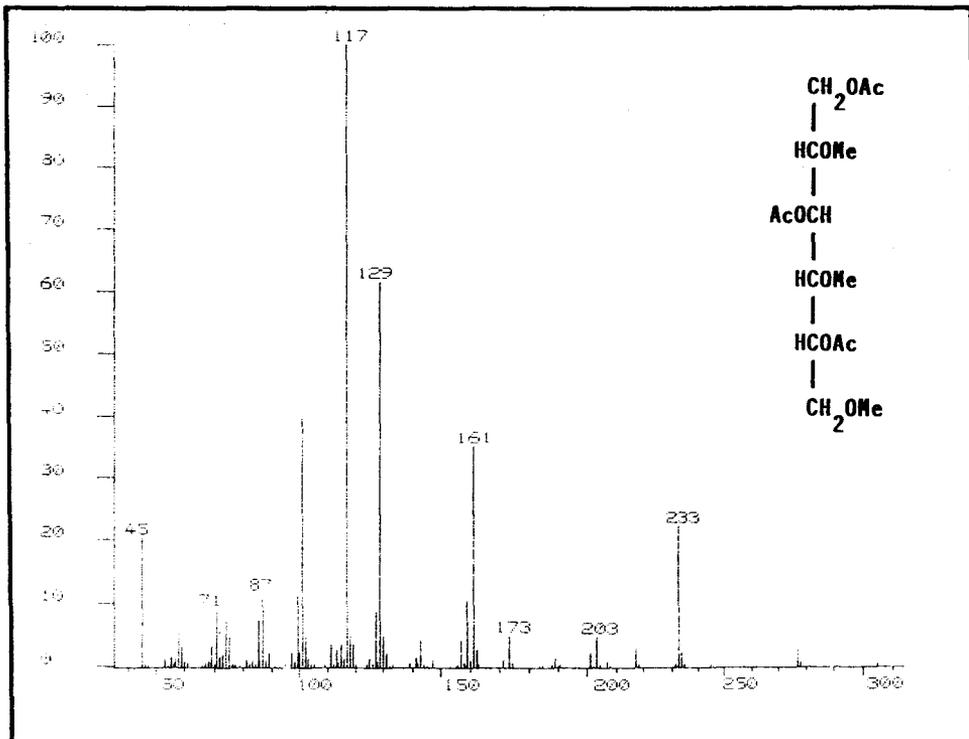


Figura 17.- c.g.l. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados, procedentes del polisacárido nativo. Columna CP-SIL 5 W.C.O.T.

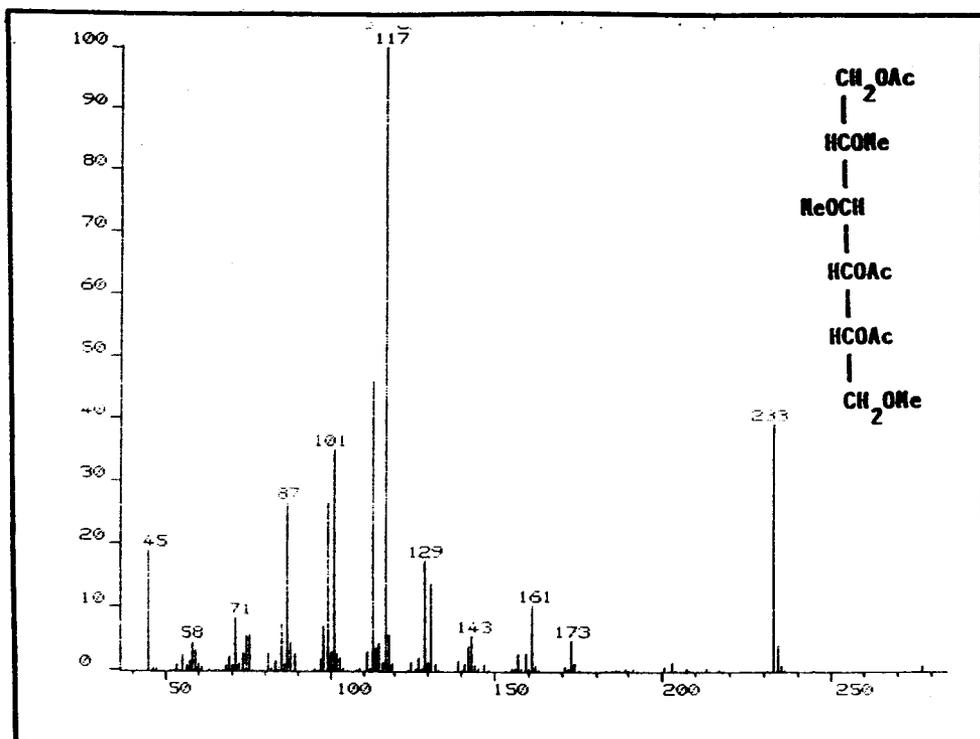


Pico A

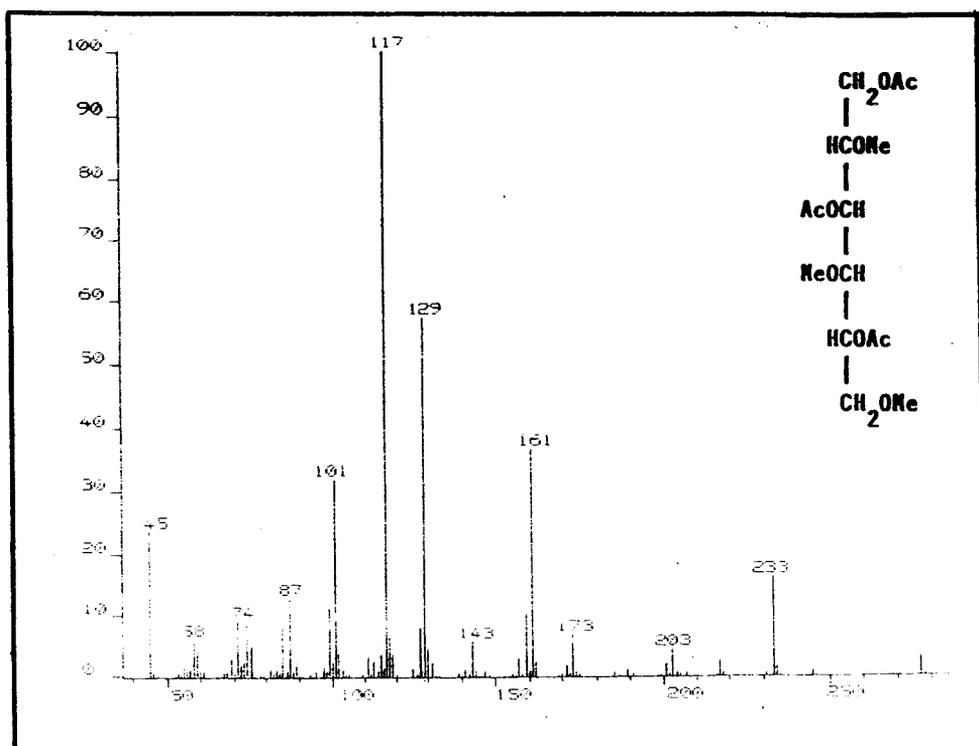


Pico B

Figura 18.- Espectros de masas de los acetatos de alditoles parcialmente metilados, procedentes del polisacárido nativo.

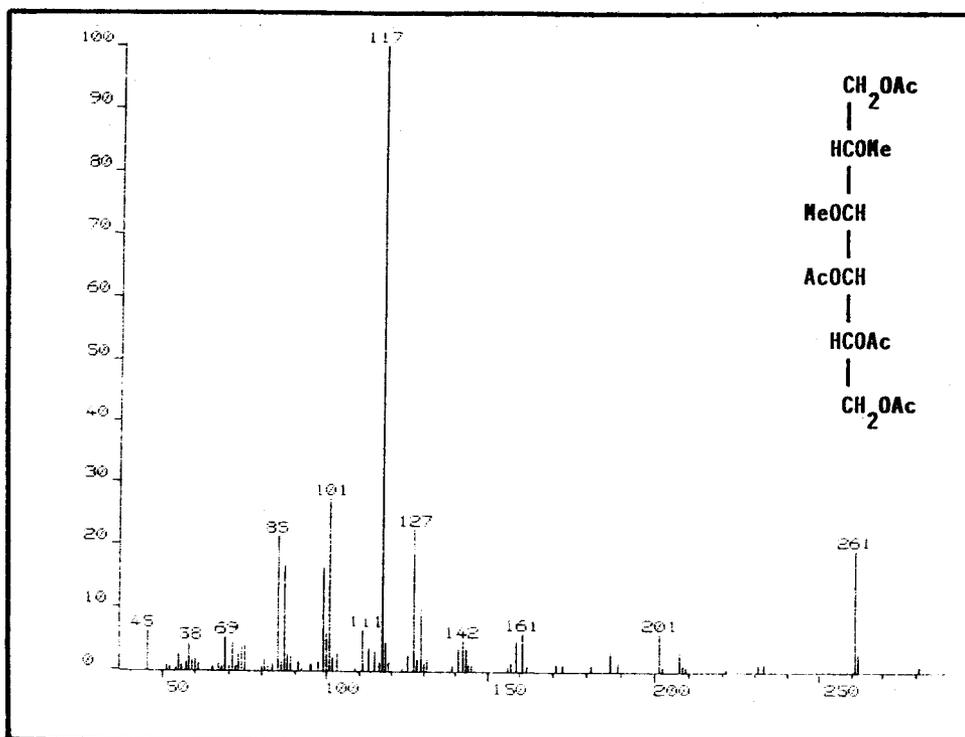


Pico C

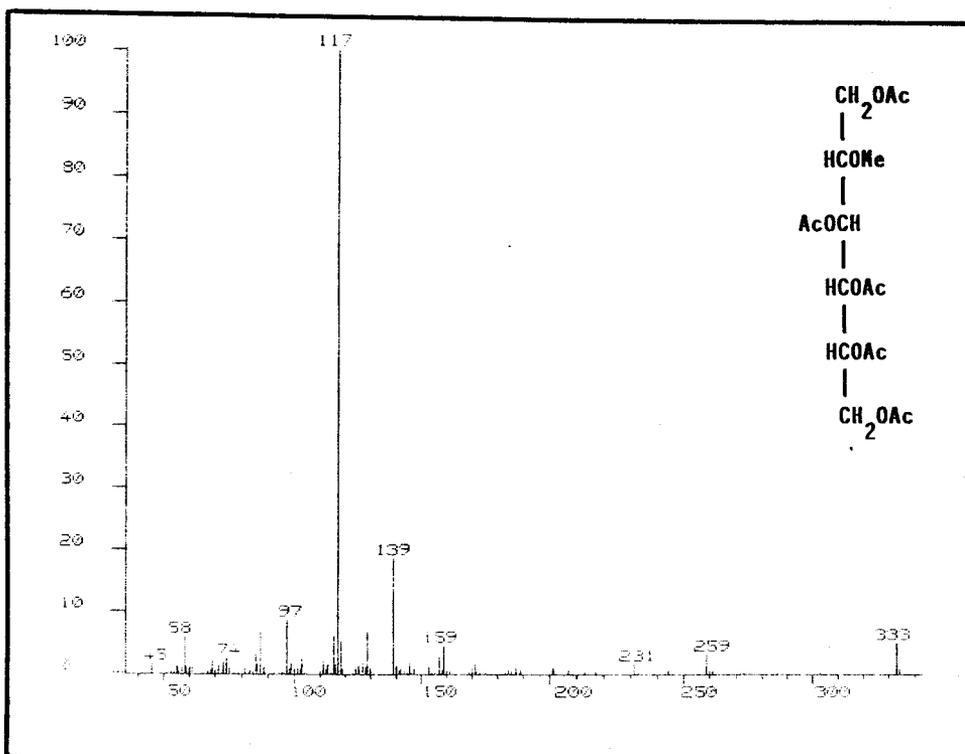


Pico D

Figura 18.- (continuación)



Pico G



Pico H

figura 18.- (continuación)

Tabla XI. Resultados obtenidos del análisis por c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes del polisacárido nativo.

Pico	Azúcar metilado	t_R (min.)	t_{RR}^a (min.)	Razón molar
A	2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^b	12,11	1.04	0.4
B	2,4,6-Me ₃ -Glc	13.36	1.17	0.7
C	2,3,6-Me ₃ -Glc	13.56	1.19	2.0
D	2,4,6-Me ₃ -Gal	14.05	1.20	0.9
E	2,3,4-Me ₃ -Glc	14.15	1.22	1.1
F	2,3-Me ₂ -Glc	16.01	1.38	0.9
G	2,3-Me ₂ -Gal	16.09	1.39	0.6
H	2-Me -Glc	17.14	1.48	0.7

^a : Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (11.39 min.), en columna CP-SIL5.

^b : 2,3,4,6-Me₄-Gal = 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol, etc.

sa terminal, la cual está sustituida al 50% en posiciones 4 y 6 por algún tipo de sustituyente.

Por otra parte, la relación molar entre la glucosa y la galactosa (6:2) coincide con la relación encontrada según el análisis cuantitativo del polisacárido (3:1) (apartado 4.2.3.).

Como la unidad de repetición del polisacárido está constituida por ocho azúcares, se pueden expresar las concentraciones de acetato y piruvato en moles por unidad de repetición del polisacárido:

101 μg de piruvato/mg de polisacárido corresponde con 1,51 moles de piruvato/unidad de repetición del polisacárido.

1,00 μmoles de acetato/mg de polisacárido corresponde con 1,31 moles de acetato/unidad de repetición del polisacárido.

4.5. Localización de sustituyentes.

La posición de los grupos 1-carboxietili

den derivados en el polisacárido se determina por comparación de los resultados de los análisis por metilación del polisacárido despiruvatado y del polisacárido nativo.

La localización de los grupos O-acetatos se realiza mediante la comparación de los resultados de los análisis por metilación del polisacárido nativo y del polisacárido metilado según el procedimiento de Prehm, resultados que se confirman por los resultados de la metilación del polisacárido según el procedimiento de Prehm seguida de una trideuterometilación convencional utilizando yoduro de trideuterometilo en medio básico.

4.5.1. Localización de ácido pirúvico.

Se realiza una despiruvatación del polisacárido según el método descrito en el apartado 3.4.1.

El posterior proceso de metilación y obtención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados se realiza de igual forma que con el polisacárido nativo. Estos se analizan por c.g.l. y c.g.l.-e.m.

4.5.1.1. Análisis por c.g.l.

La instrumentación y condiciones cromatográficas son idénticas a las aplicadas para el polisacárido nativo.

El cromatograma registrado se muestra en la figura 19. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla XII.

Se identifican los acetatos de alditoles parcialmente metilados por sus tiempos de retención relativos al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol comparándolos con los descritos en la bibliografía (45).

4.5.1.2. Análisis por c.g.l.-e.m.

La instrumentación y condiciones cromatográficas son idénticas a las aplicadas para el polisacárido nativo.

Uno de los cromatogramas obtenidos se muestra en la figura 20. El cromatograma se ha

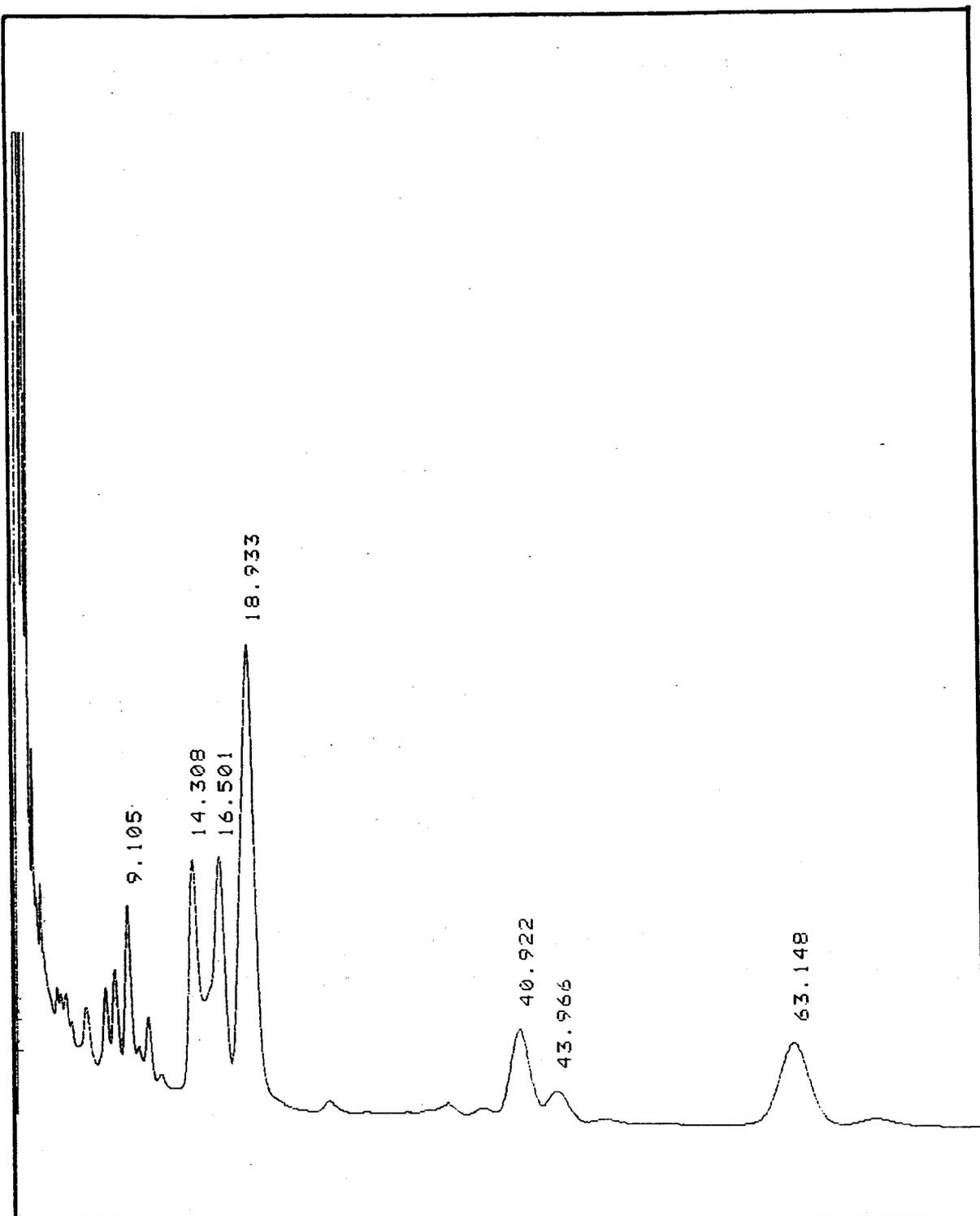


Figura 19.- c.g.l. de los acetatos de alditos parcialmente metilados, procedentes del polisacárido despiruvatado. Columna ECNSS-M 3%.

Tabla XII. Resultados obtenidos del análisis por c.g.l. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes del polisacárido despiruvatado.

Acetatos de alditoles	t_R (min.)	t_{RR}^a (min.)
2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^b	9.105	1.23
2,4,6-Me ₃ -Glc	14.308	1.94
2,4,6-Me ₃ -Gal	16.501	2.24
2,3,6-Me ₃ -Glc	18.933	2.57
2,3,4-Me ₃ -Glc	18.933	2.57
2,3-Me ₂ -Glc	40.922	5.55
2,3-Me ₂ -Gal	43.966	5.96
2-Me -Glc	63.148	8.60

^a : Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (7.375 min.), en columna ECNSS-M 3%.

^b : 2,3,4,6-Me₄-Gal = 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol, etc.

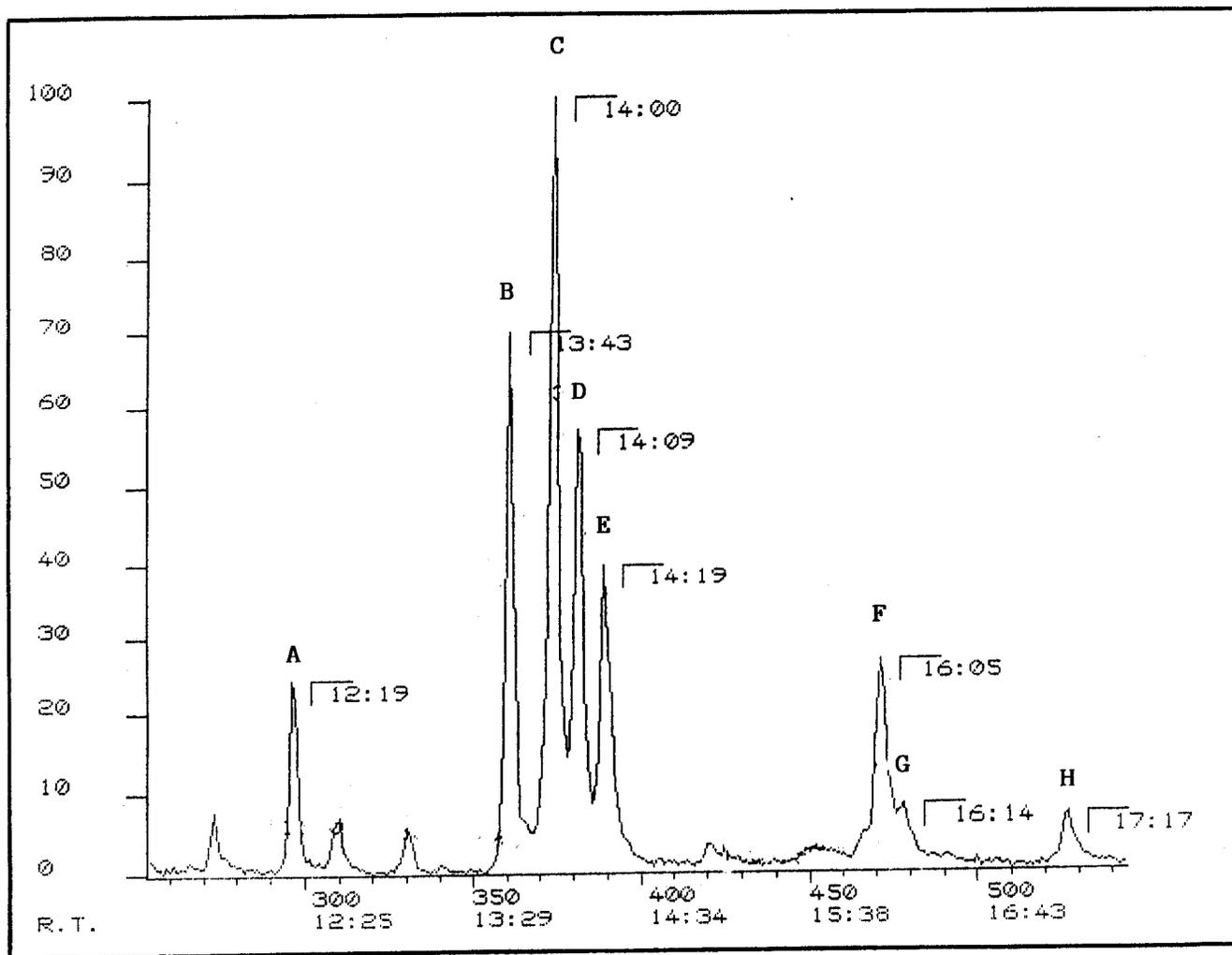


Figura 20.- c.g.l. de los acetatos de alditos parcialmente metilados, procedentes del polisacárido despiruvatado. Columna CP-SIL 5 W.C.O.T.

Tabla XIII. Resultados obtenidos del análisis por c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes del polisacárido despiruvatado.

Pico	Azúcar metilado	t_R (min.)	t_{RR}^a (min.)	Razón molar
A	2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^b	12,19	1.06	0.8
B	2,4,6-Me ₃ -Glc	13.43	1.18	1.2
C	2,3,6-Me ₃ -Glc	14.00	1.20	2.0
D	2,4,6-Me ₃ -Gal	14.09	1.21	1.0
E	2,3,4-Me ₃ -Glc	14.19	1.23	0.9
F	2,3-Me ₂ -Glc	16.05	1.38	0.7
G	2,3-Me ₂ -Gal	16.14	1.39	---
H	2-Me -Glc	17.17	1.48	0.1

^a : Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (11.39 min.), en columna CP-SIL5.

^b : 2,3,4,6-Me₄-Gal = 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol, etc.

registrado según el ión total. Los espectros de masas de los picos que aparecen en el cromatograma son idénticos a los obtenidos en el polisacárido nativo. Los resultados se recogen en la tabla XIII.

4.5.1.3. Discusión de los resultados.

Los resultados obtenidos del análisis por metilación del polisacárido despiruvatado muestran un incremento de 0,4 moles de la galactosa terminal (1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol) y de 0,5 moles del 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, y un descenso de 0,6 moles del 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-galactitol y de 0,6 moles del 1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-O-metil-D-glucitol.

Estos cambios indican que un 50% de los residuos de D-Galp-(1→ y uno de los dos residuos de →3)-D-Glcp-(1→ en el polisacárido están sustituidos por ácido pirúvico (unión cetal) en O-4 y O-6, lo que confirma los resultados obtenidos en el análisis por metilación del polisacárido nativo con respecto a la galactosa terminal (apartado 4.4.2.).

4.5.2. Localización de acetato.

Se realiza según dos procedimientos:

- metilación según el método de Prehm y comparación de los resultados obtenidos por c.g.l.-e.m. con los del polisacárido nativo metilado en medio básico;

- metilación según el método de Prehm seguida de trideuterometilación en medio básico empleando yoduro de trideuterometilo, y comparación de los resultados obtenidos por c.g.l.-e.m. con los del polisacárido nativo metilado en medio básico.

4.5.2.1. Metilación de Prehm y c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados

El polisacárido (5 mg) se metila según el método de Prehm descrito en el apartado 3.4.2. La hidrólisis del polisacárido metilado y obtención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados se

sigue de igual forma que con el polisacárido nativo (apartado 4.4.1.1.).

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados se analizan por c.g.l.-e.m. (apartado 3.3.2.1.).

Los resultados se recogen en la tabla XIV.

4.5.2.1.1. Discusión de los resultados.

Los resultados obtenidos del análisis por metilación según el método de Prehm del polisacárido muestran un incremento de 0,4 moles del 1,3,5-di-O-acetil-2,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol y de 1,2 moles del 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucitol, y un descenso de 0,4 moles del 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol y de 0,7 moles del 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

Estos cambios indican que el 50% de los residuos de D-Galp-(1→ que no están piruvatados y uno de los dos residuos de →4)-D-Glcp-(1→ en el polisacárido, están sustituidos por ácido acético (unión éster)

Tabla XIV. Resultados obtenidos por c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes del polisacárido metilado según el método de Prehm.

Pico	Azúcar metilado	t_R (min.)	t_{RR}^a (min.)	Razón molar
A	2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^b	11,52	1.06	---
B	2,4,6-Me ₃ -Glc	12.59	1.16	0.9
C	2,3,6-Me ₃ -Glc	13.18	1.19	1.3
D	2,4,6-Me ₃ -Gal	13.32	1.21	1.6
E	2,3,4-Me ₃ -Glc	13.40	1.22	1.0
F	2,3-Me ₂ -Glc	15.29	1.38	2.1
G	2,3-Me ₂ -Gal	15.37	1.39	0.5
H	2-Me -Glc	16.42	1.49	0.7

^a : Tiempo de retención relativo al 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (11.11 min.), en columna CP-SIL5.

^b : 2,3,4,6-Me₄-Gal = 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactitol, etc.

en 0-3 y 0-6, respectivamente.

4.5.2.2. Metilación de Prehm seguida de trideuterometilación, y c.g.l.-e.m de los acetatos de alditoles parcialmente metilados.

El polisacárido (5 mg) se metila según el método de Prehm descrito en el apartado 3.4.2. El polisacárido así metilado se vuelve a metilar como en el caso del polisacárido nativo pero utilizando yoduro de trideuterometilo como agente alquilante.

La hidrólisis del polisacárido metilado y obtención de los acetatos de alditoles parcialmente metilados se sigue de igual forma que con el polisacárido nativo.

Los acetatos de alditoles parcialmente metilados se analizan por c.g.l.-e.m. (apartado 3.3.2.1.).

Uno de los cromatogramas obtenidos se muestra en la figura 21. El cromatograma se ha registrado según el ión total.

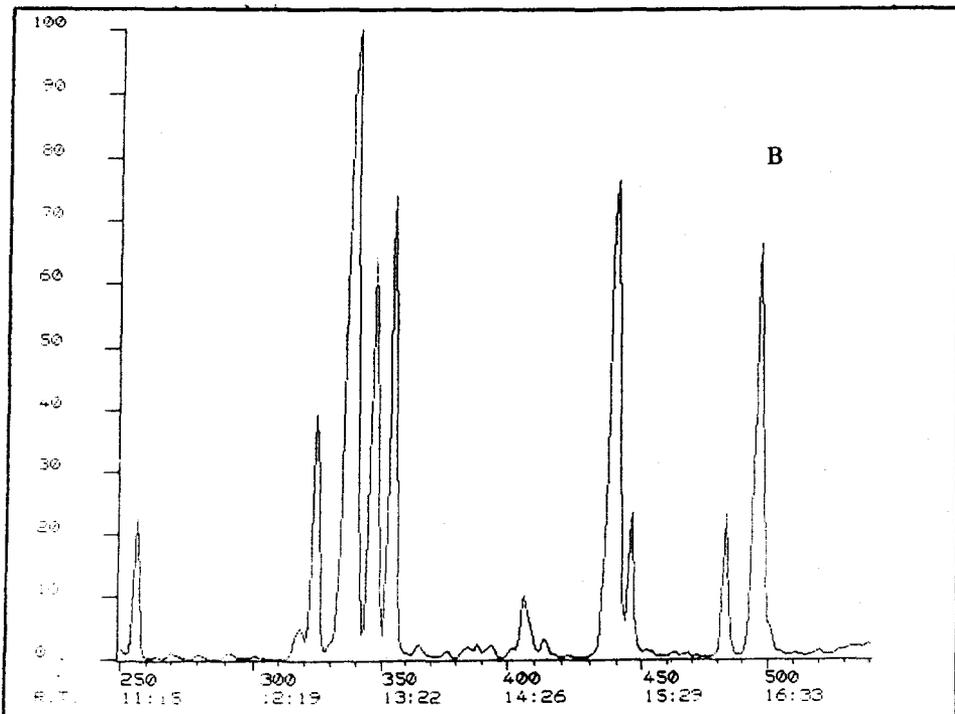
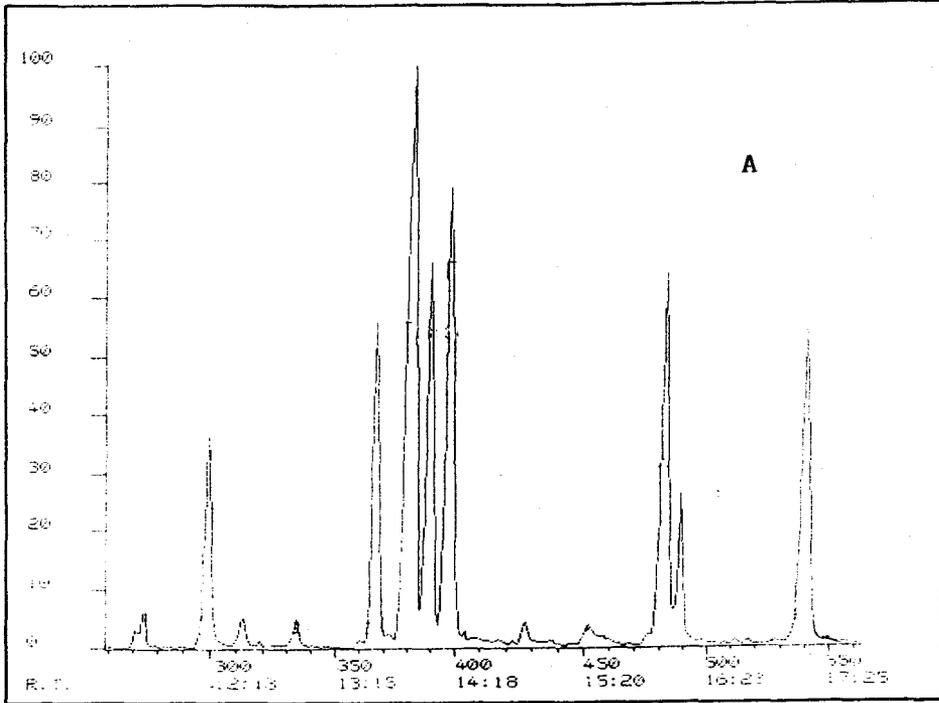


Figura 21.- (continuación) Cromatogramas c.g.l.-e.m. realizados sobre el polisacárido nativo (A), y sobre el polisacárido metilado según el método de Prehm y remetilado utilizando ICD_3 (B).

Los resultados obtenidos del análisis por c.g.l.-e.m. son prácticamente idénticos a los obtenidos para el polisacárido nativo. Los espectros de masas de los picos correspondientes a los azúcares en los cuales se ha introducido un grupo trideuterio metoxilo, se recogen en la figura 22.

4.5.2.2.1. Discusión de los resultados.

Los resultados discutidos en el apartado 4.5.2.1.1. se confirman con los obtenidos en este segundo experimento.

El cromatograma y los espectros de masas para cada pico cromatográfico son idénticos a los obtenidos para el polisacárido nativo, excepto para el residuo de galactosa terminal (m/e : 45, 71, 74, 87, 101, 104, 117, 129, 148, 161, 164 y 208) y para una de las glucosas con enlace (1→4) (m/e : 45, 48, 87, 99, 101, 113, 117, 233 y 236). El espectro de masas para el pico cromatográfico correspondiente a la galactosa terminal está de acuerdo con un esquema de fragmentación correspondiente al 1,5-di-O-acetil-2,4,6-tri-O-metil-3-O-trideuterometilhexitol. El espectro de masas del pico cromatográfico correspondiente a la

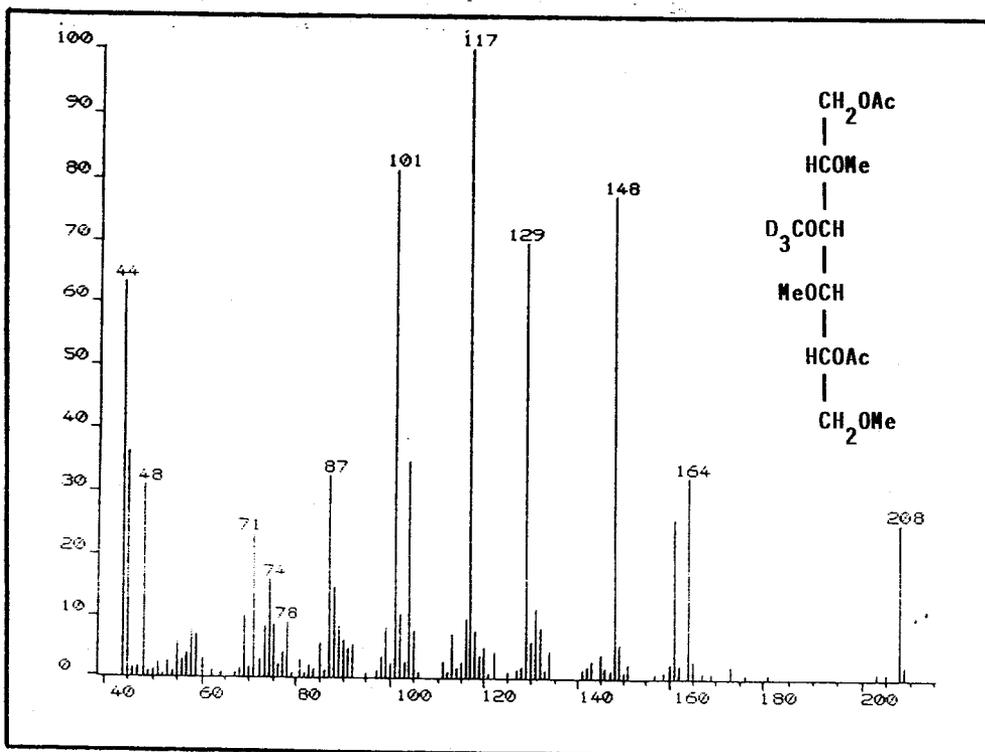
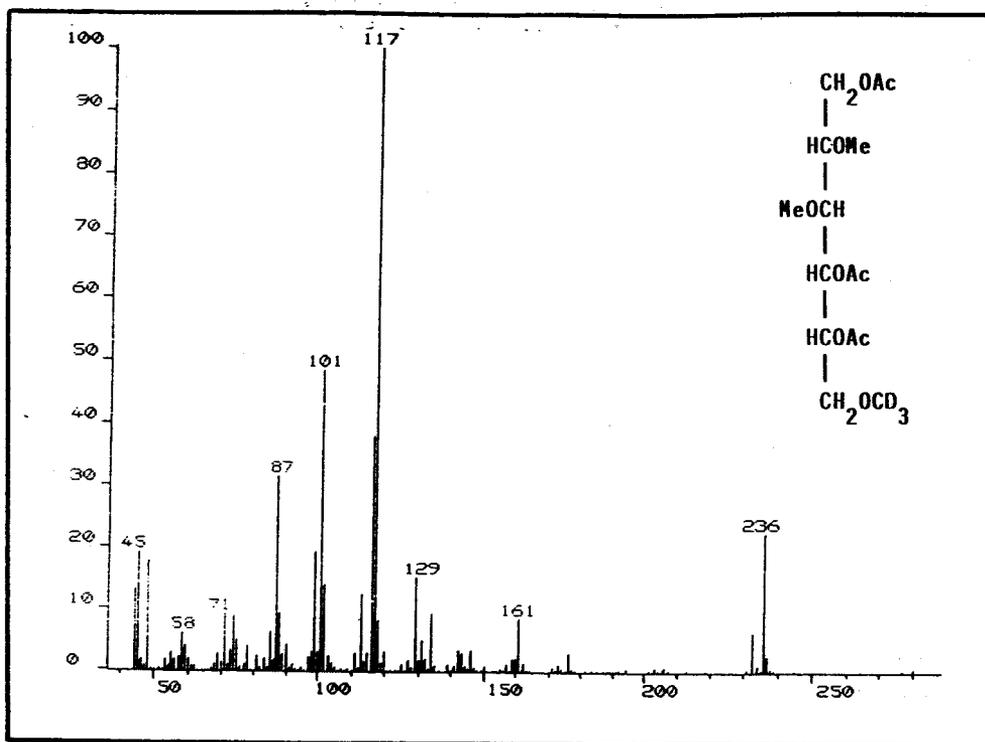


Figura 22

glucosa con enlace (1→4) consiste en una mezcla de 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilhexitol y de 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil-6-O-trideuterometilhexitol.

Los esquemas de fragmentación de estos dos acetatos de alditoles parcialmente metilados se detallan en la figura 23.

De los datos expuestos hasta ahora se deduce que el polisacárido está compuesto por glucosa, galactosa, piruvato y acetato en relación molar 6:2:1,5:1,5 por unidad de repetición. Las razones molares correspondientes a los sustituyentes no-carbohidratos confirman los valores obtenidos en las determinaciones colorimétricas (apartados 4.2.4.1. y 4.2.4.2.).

Se puede concluir que en el polisacárido se encuentran las unidades estructurales que se muestran en la figura 24.

4.6. Caracterización de oligosacáridos.

Los oligosacáridos se obtienen del polisa

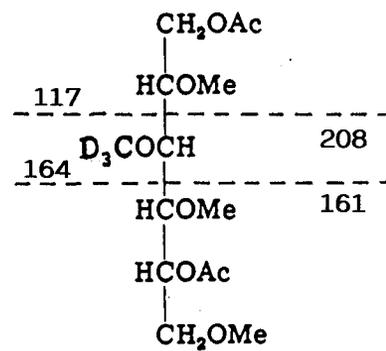
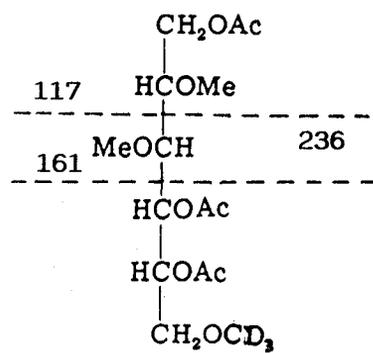


Figura 23

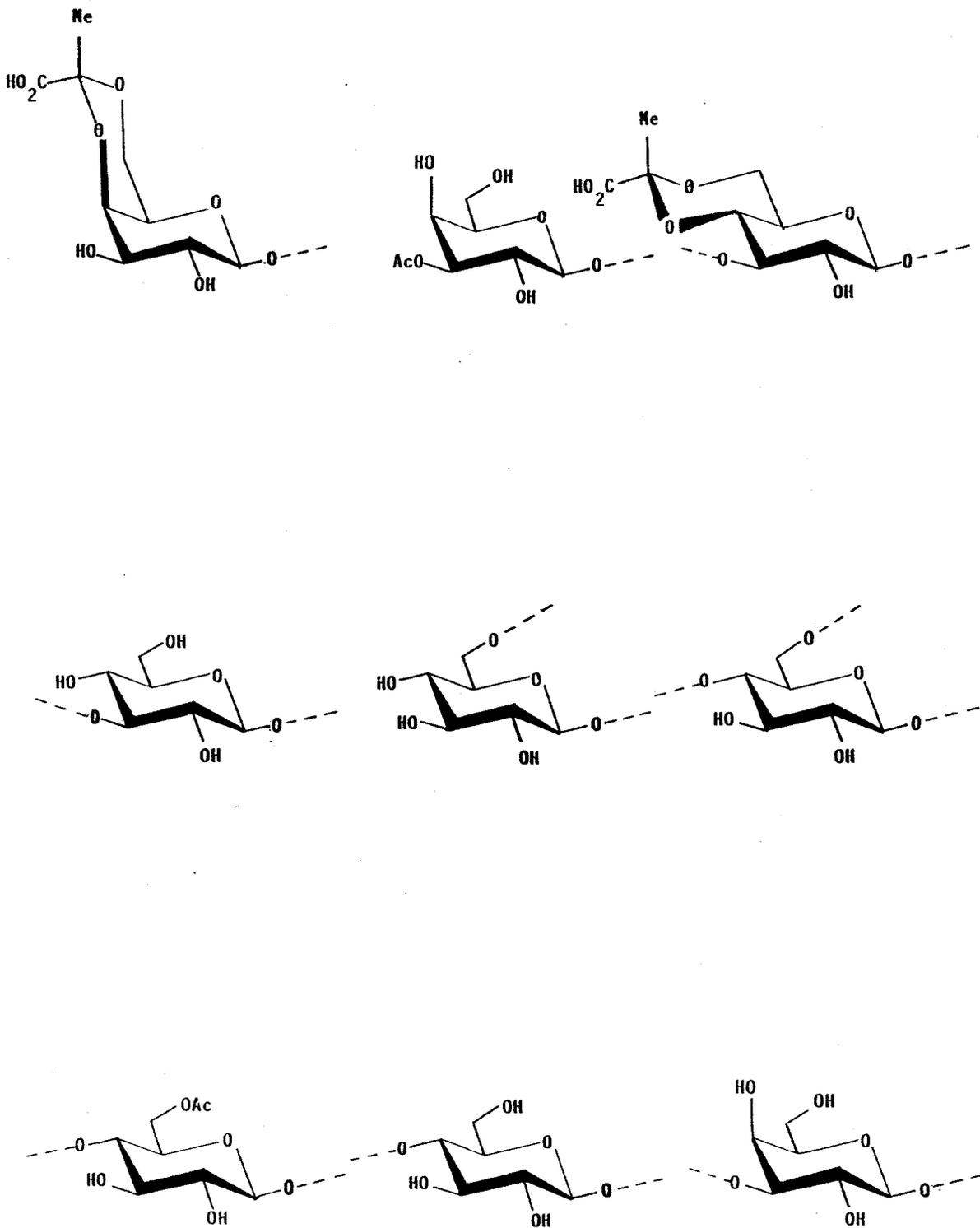


Figura 24

cárido por despolimerización parcial. El fraccionamiento se realiza por cromatografía de filtración sobre gel y el aislamiento por cromatografía sobre papel preparativa. La determinación de las estructuras se realiza por análisis por c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados obtenidos de los oligosacáridos nativos y de los oligosacáridos prerreducidos. Se deduce finalmente la estructura del polisacárido.

4.6.1. Despolimerización parcial.

La despolimerización parcial se lleva a cabo por hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético como se describe en el apartado 3.5.1.

En estas condiciones se hidroliza el polisacárido (210 mg) durante 1 hora a 100°C. A la fracción dializable se le denomina FD1. La fracción no dializable liofilizada (105 mg) se hidroliza en las mismas condiciones que la hidrólisis parcial anterior. A la fracción dializable se le denomina FD2. La fracción no dializable liofilizada (53 mg) se hidroliza en las mismas condiciones pero aumentando el tiempo de reacción a 2 horas. A la fracción dializable

se le denomina FD3. Al final del proceso de despolimerización parcial quedan 19,5 mg de fracción no dializable.

4.6.2. Cromatografía de filtración sobre gel de las fracciones dializables.

Las fracciones dializables FD1, FD2 y FD3 (2 ml cada una) se cromatografían en columna de filtración sobre gel de Biogel P-2 (según la instrumentación descrita en el apartado 3.5.2.1.1.) en las siguientes condiciones cromatográficas:

- Fracción FD1: 8 ml/hora; 2 ml/tubo.
- Fracción FD2: 20 ml/hora; 3,3 ml/tubo.
- Fracción FD3: 20 ml/hora; 3,3 ml/tubo.

El seguimiento de la columna se efectúa con el método del orcinol-sulfúrico descrito en los métodos generales (apartado 3.5.2.1.1.). Se realiza una cromatografía sobre capa fina en las condiciones descritas en el mismo apartado de cada uno de los eluatos. Se toman alícuotas entre 15 y 25 μ l de cada eluato y 5 μ l de glucosa y 5 μ l de lactosa como disoluciones de referencia en cada placa.

Los eluatos de la columna se agrupan en diferentes fracciones atendiendo a la movilidad que presentan en la cromatografía. En la figura 25 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos. Las fracciones resultantes son las siguientes:

Fracción FD1	{	FD1-A: desde 166 ml hasta 196 ml
		FD1-B: desde 198 ml hasta 338 ml
		FD1-C: desde 340 ml hasta 386 ml
Fracción FD2	{	FD2-A: desde 168,3 ml hasta 224,4 ml
		FD2-B: desde 227,7 ml hasta 287,1 ml
		FD2-C: desde 290,4 ml hasta 363 ml
		FD2-D: desde 366,3 ml hasta 409,2 ml
Fracción FD3	{	FD3-A: desde 168,3 ml hasta 264 ml
		FD3-B: desde 267,3 ml hasta 330 ml
		FD3-C: desde 333,3 ml hasta 425,7 ml

Está comprobado que existe una relación entre el grado de polimerización de un oligosacárido y su movilidad o desplazamiento en cromatografía sobre capa fina. A medida que aumenta el grado de polimerización disminuye el desplazamiento cromatográfico, como puede observarse en el cromatograma de la figura 25.

Atendiendo a este hecho se escoge la fracción FD3-B por su mayor contenido en oligosacáridos

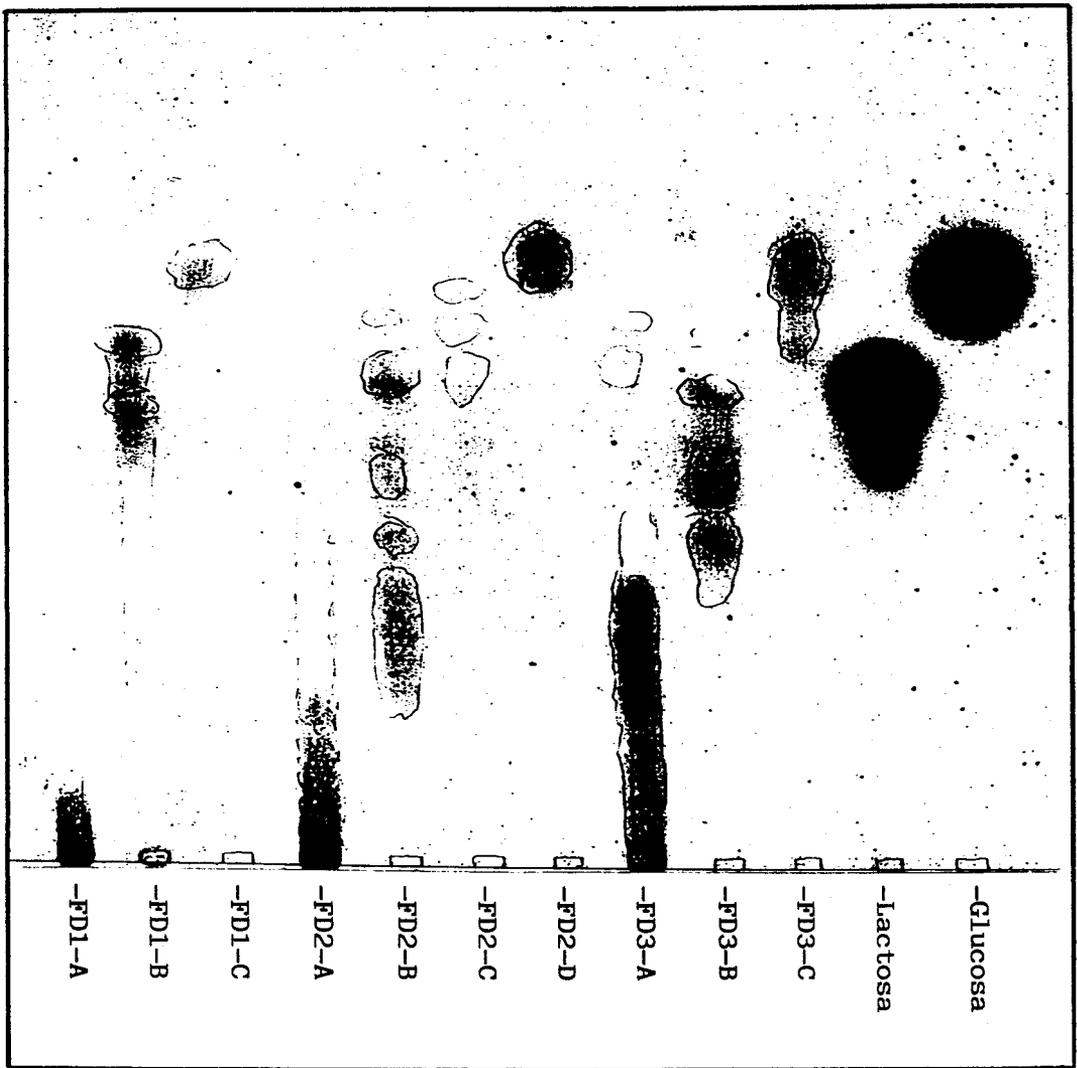


Figura 25

dos de grado de polimerización intermedio (desde tetrasacáridos a disacáridos aproximadamente) en comparación con las demás fracciones que contienen oligosacáridos de elevado grado de polimerización (fracciones FD1-A, FD2-A, FD2-B y FD3-A) y monosacáridos (fracciones FD1-C, FD2-D y FD3-C).

La fracción FD3-B se vuelve a fraccionar en cromatografía de filtración sobre gel de Biogel P-2. El flujo de la bomba peristáltica se ajusta a 12 ml/hora y se recolectan fracciones de 2 ml/tubo. El seguimiento de la columna se realiza de la forma usual y se agrupan las siguientes fracciones:

FD3-B₁: desde 242 ml hasta 250 ml

FD3-B₂: desde 252 ml hasta 256 ml

FD3-B₃: desde 258 ml hasta 270 ml

FD3-B₄: desde 272 ml hasta 280 ml

FD3-B₅: desde 282 ml hasta 290 ml

FD3-B₆: desde 292 ml hasta 300 ml

FD3-B₇: desde 302 ml hasta 332 ml

En las fracciones FD3-B₂, FD3-B₄ y FD3-B₆ la separación cromatográfica no es tan buena, presentan mezclas de oligosacáridos pertenecientes a las fracciones inmediatamente anteriores y/o posteriores.

Se eligen las fracciones FD3-B₅ y FD3-B₇, por su pureza y alta concentración en oligosacáridos (principalmente la FD3-B₇ con un volumen de 30 ml), para el posterior aislamiento de sus oligosacáridos por cromatografía sobre papel preparativa.

4.6.3. Cromatografía sobre papel preparativa de las fracciones FD3-B₅ y FD3-B₇.

La cromatografía sobre papel preparativa de las fracciones FD3-B₅ y FD3-B₇ se lleva a cabo según las técnicas y condiciones descritas en el apartado 3.5.2.2.

Cada fracción se lleva a sequedad. Se añade agua destilada (250 μ l a cada una) y se cromatografían.

El desplazamiento cromatográfico de cada oligosacárido en el papel se expresa en función de sus R_G obtenidos al dividir el desplazamiento en cm de cada oligosacárido por el desplazamiento alcanzado por la glucosa de referencia.

En cada fracción se detectan los si

güientes oligosacáridos:

Fracción FD3-B₅ {
Oligosacárido 0-1 → R_G = 0,26
Oligosacárido 0-2 → R_G = 0,22
Oligosacárido 0-3 → R_G = 0,17
Oligosacárido 0-4 → R_G = 0,11

Fracción FD3-B₇ {
Oligosacárido 0-5 → R_G = 0,57
Oligosacárido 0-6 → R_G = 0,34
Oligosacárido 0-7 → R_G = 0,26

Los oligosacáridos se eluyen tal como se describe en los métodos generales y se liofilizan, se obtienen las siguientes cantidades:

- 0-1: 1,1 mg/500 mg de polisacárido
- 0-2: 0,8 mg/500 mg de polisacárido
- 0-3: 0.9 mg/500 mg de polisacárido
- 0-4: 1,4 mg/500 mg de polisacárido
- 0-5: 1,4 mg/500 mg de polisacárido
- 0-6: 1,2 mg/500 mg de polisacárido
- 0-7: 0,5 mg/500 mg de polisacárido

El esquema de despolimerización parcial del polisacárido descrito en este apartado se muestra en la figura 26.

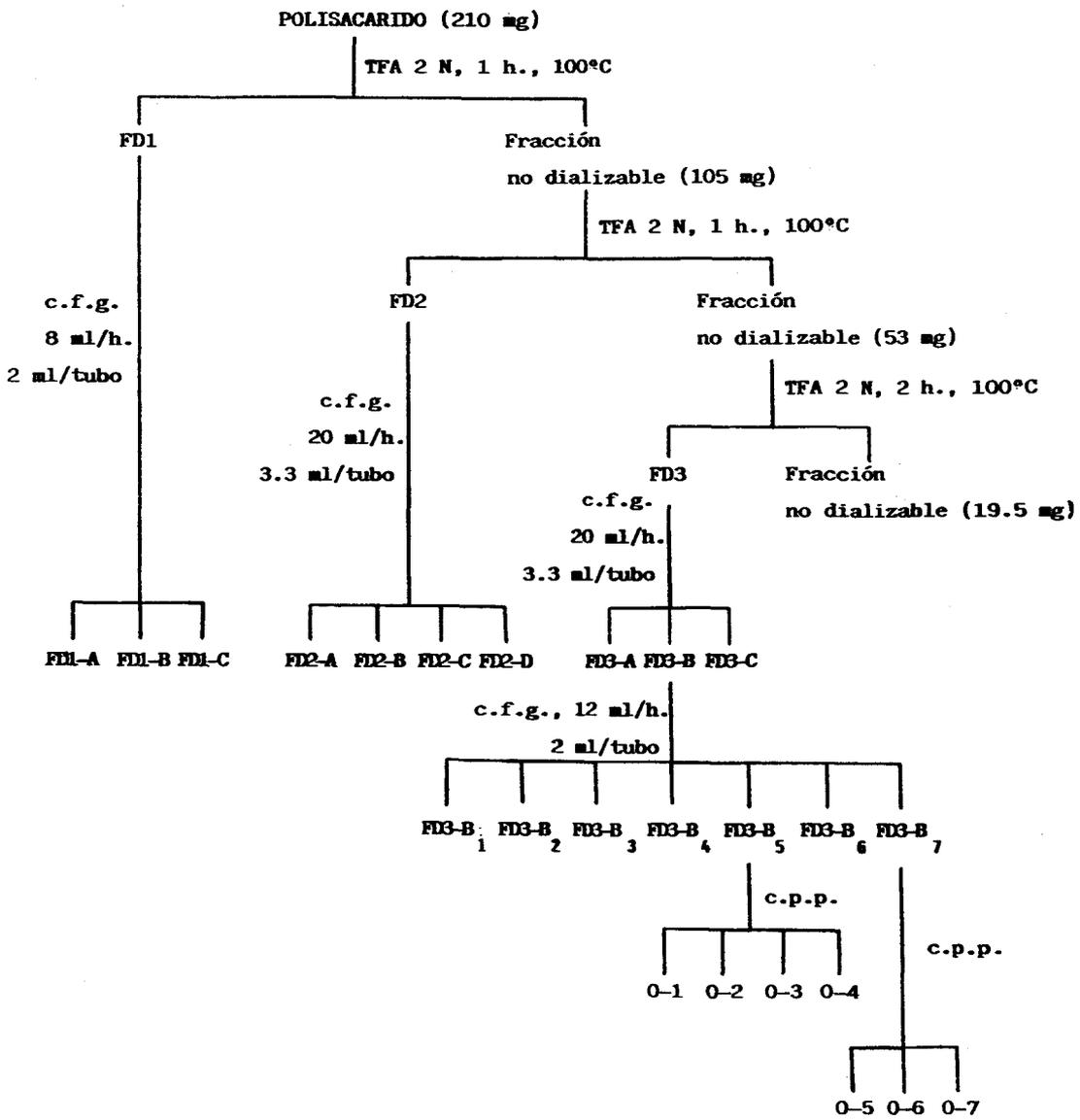


Figura 26

4.6.4. Análisis estructural de los oligosacáridos.

La determinación de las estructuras de los oligosacáridos aislados se realiza por comparación de los resultados de los análisis por metilación de los oligosacáridos nativos y de los oligosacáridos prerreducidos.

4.6.4.1. Metilación de los oligosacáridos y análisis por c.g.l.-e.m. de sus acetatos de alditoles parcialmente metilados.

A los oligosacáridos O-1, O-2, O-3 y O-7 se les añade agua destilada (0,5 ml), se toman 250 μ l y se liofilizan para su metilación.

A los oligosacáridos O-4, O-5 y O-6 se les añade agua destilada (1 ml), se toman 500 μ l y se liofilizan para su metilación.

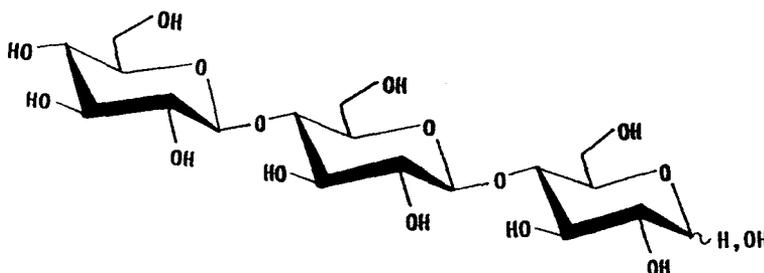
La metilación de los oligosacáridos y el análisis estructural de sus acetatos de alditoles parcialmente metilados se realiza según se describe en

el apartado 3.5.3.1. Los resultados se recogen en la tabla XV.

4.6.4.1.1. Discusión de los resultados.

De los resultados mostrados en la tabla XV, pueden deducirse inequívocamente las estructuras de los siguientes oligosacáridos:

Oligosacárido O-1: presenta un residuo de glucosa terminal y dos unidades de glucosa con enlace (1→4), por tanto se trata de un trisacárido con una única posibilidad para su estructura:



O-1

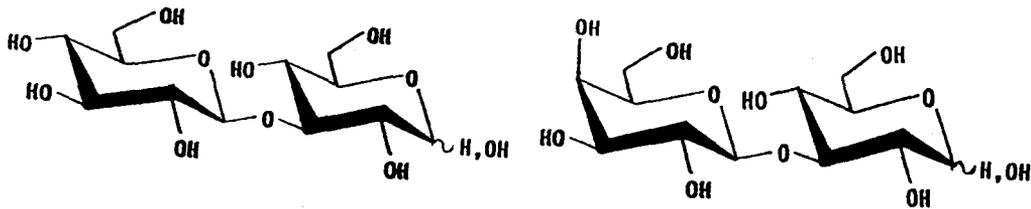
Oligosacárido O-5: presenta dos residuos de azúcares terminales distintos (glucosa y galactosa) y una glucosa con enlace (1→3), se deduce que se trata

Tabla XV. Resultados obtenidos por c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados procedentes de los oligosacáridos nativos aislados.

Azúcar metilado	Razón molar					
	O-1	O-2	O-3	O-4	O-5	O-6
2,3,4,6-Me ₄ -Glc ^a	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	-	-	-	-	1.0	-
2,4,6-Me ₃ -Glc	-	-	-	0.8	2.0	-
2,3,6-Me ₃ -Glc	2.0	2.2	0.8	1.1	-	0.9
2,3,4-Me ₃ -Glc	-	0.8	1.6	1.7	-	0.7

^a : 2,3,4,6-Me₄-Glc = 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, etc.

de una mezcla de dos disacáridos con las siguientes estructuras:



O-5

Finalmente, se observa que los datos recogidos en la tabla para el oligosacárido O-7 son prácticamente idénticos que para el oligosacárido O-1. Hay que tener en cuenta además que sus R_G respectivos observados (apartado 4.6.3.) son idénticos. Podemos afirmar que se trata del mismo oligosacárido.

Para el resto de los oligosacáridos las posibilidades de enlazar sus azúcares son múltiples.

4.6.4.2. Metilación de los oligosacáridos prerreducidos y análisis por c.g.l.-e.m. de sus acetatos de alditoles parcialmente metilados.

Con este procedimiento se consigue determinar el tipo de enlace que une la cadena de un oligosacárido a su azúcar terminal reductor.

Se realiza sobre el oligosacárido O-3 ya que no se ha podido disponer de cantidad suficiente de los otros oligosacáridos.

La reducción del oligosacárido O-3 previa a su metilación se sigue según el procedimiento descrito en los métodos generales (apartado 3.5.3.2.). El posterior proceso de metilación y análisis de sus acetatos de alditoles parcialmente metilados se realiza de igual forma que en el apartado anterior (4.6.4.1.).

En la figura 27 se muestra el cromatograma correspondiente al oligosacárido nativo y el correspondiente al oligosacárido prerreducido.

4.6.4.2.1. Discusión de los resultados.

Comparando el cromatograma con el obtenido para el oligosacárido O-3 en la metilación sin prerreducción, se observa la desaparición del pico

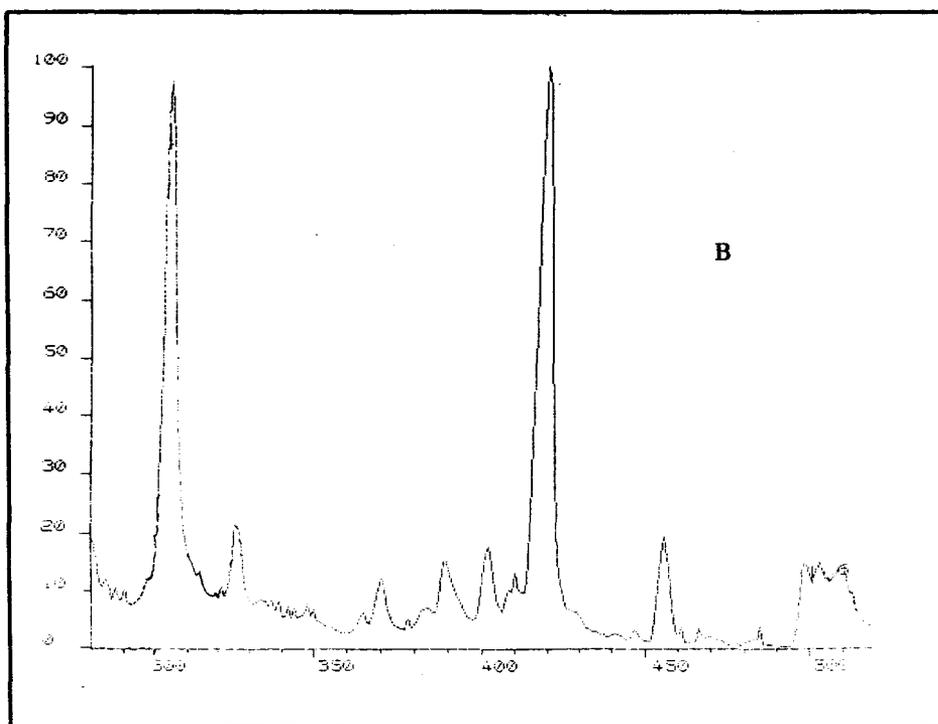
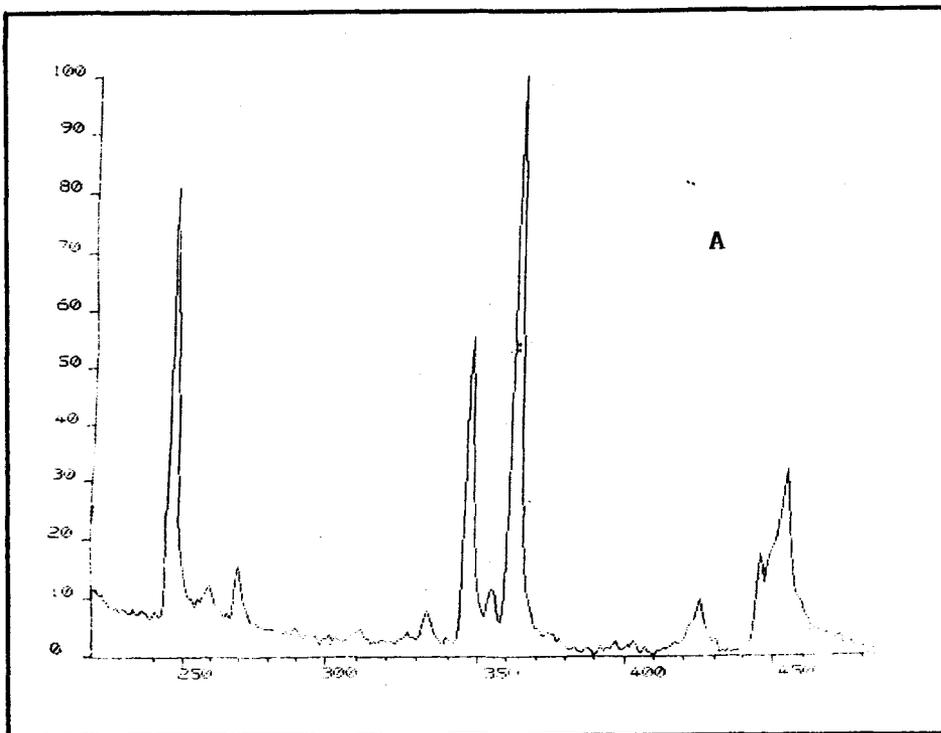
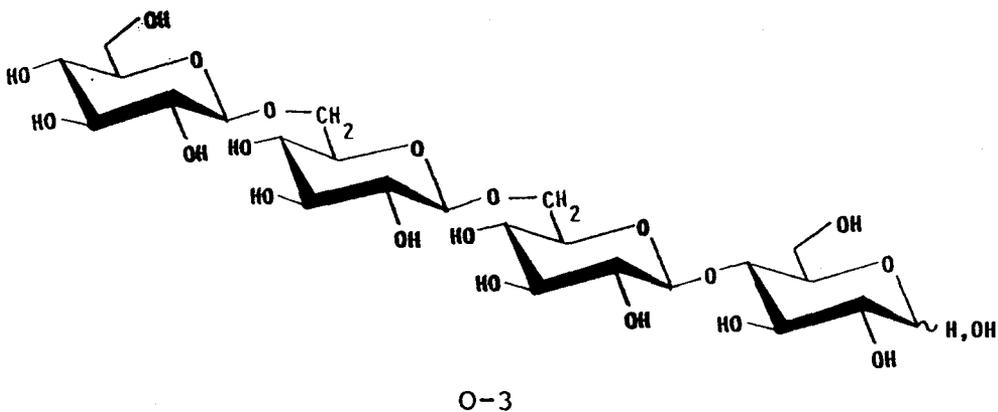


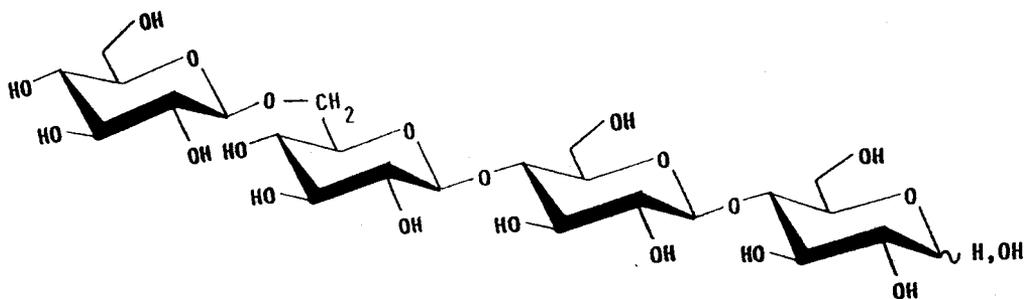
Figura 27.- c.g.l. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados, procedentes del oligosacárido O-3 nativo (A) y del oligosacárido O-3 prerreducido (B). Columna CP-SIL 5.

cromatográfico correspondiente al 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol. Este resultado permite afirmar que el enlace que une el último residuo de glucosa en O-3 con los otros dos azúcares es del tipo (1→4). La estructura del tetrasacárido O-3 es por tanto:

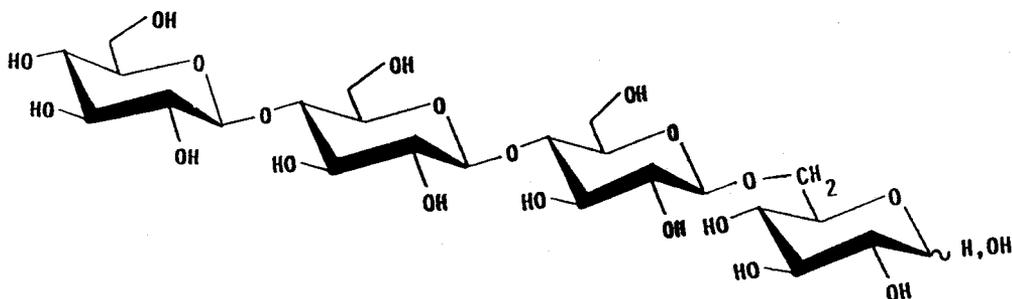


La identificación estructural de este oligosacárido marca la pauta para la asignación de las estructuras de los restantes.

Como acabamos de ver, las dos únicas unidades de glucosa con enlace (1→6) en el polisacárido tienen que estar situadas de forma consecutiva. Por tanto, las estructuras posibles del oligosacárido O-2 son las siguientes:



(I)



(II)

Teniendo en cuenta que en el polisacárido existe sólo dos unidades de glucosa con enlace (1→4), los oligosacáridos O-3 y O-2 estarían necesariamente localizados en el polisacárido de la forma que se muestra en la figura 28. Por tanto, el oligosacárido O-2 posee la estructura (I) anteriormente indicada.

A partir de esta estructura se deduce la

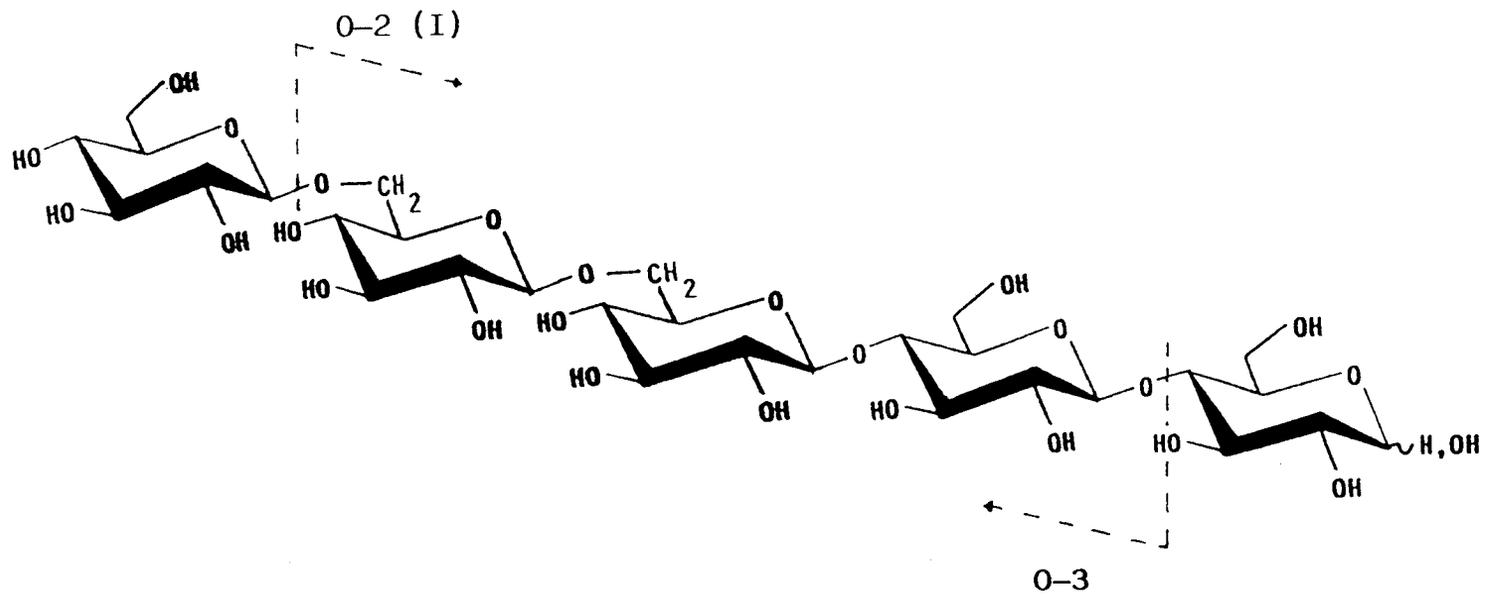
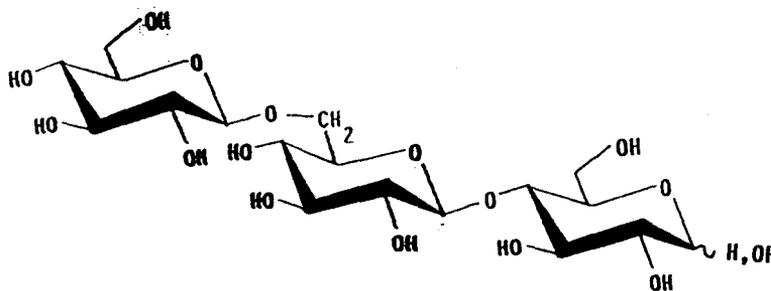


Figura 28

del oligosacárido O-6:



O-6

Localizando los oligosacáridos O-1, O-2, O-3 y O-6 en la unidad de repetición del polisacárido, queda establecida para el pentasacárido O-4 la estructura indicada en la figura 29.

4.7. Estructura del polisacárido.

De la discusión de los resultados mostrados en el apartado anterior, y de los resultados obtenidos de los análisis por metilación realizados sobre el polisacárido nativo y sobre el polisacárido despiruvatado, y del análisis por metilación según el método de Prehm, se proponen las dos estructuras isómeras para el octasacárido unidad de repetición, que se detallan en la figura 30.

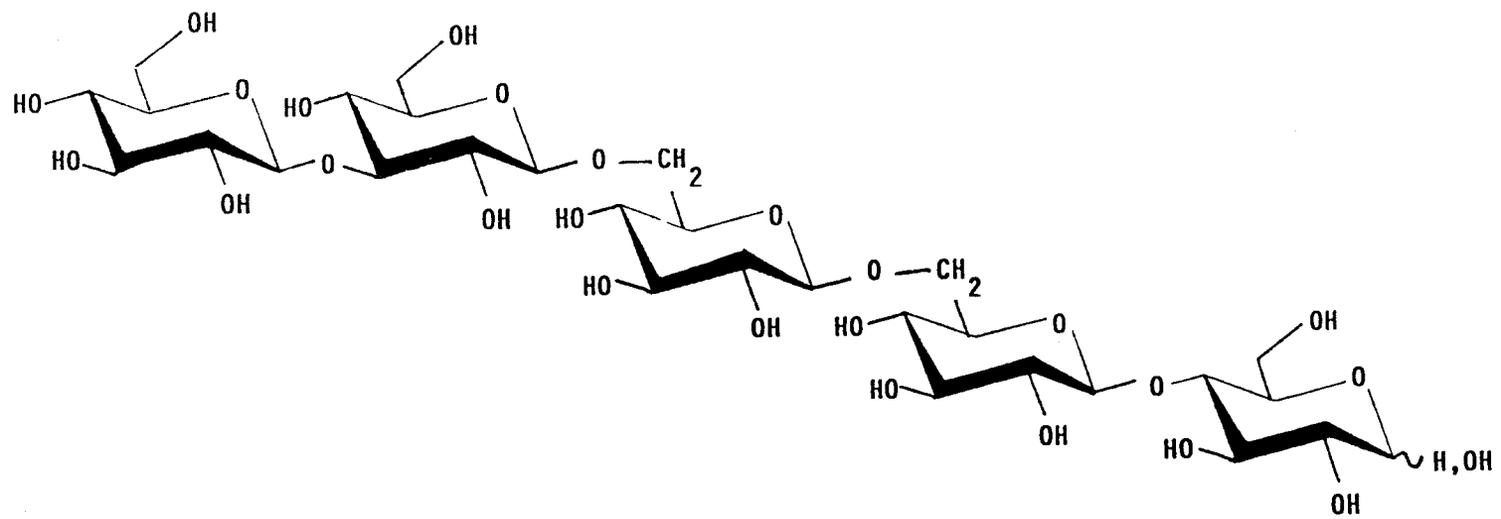


Figura 29

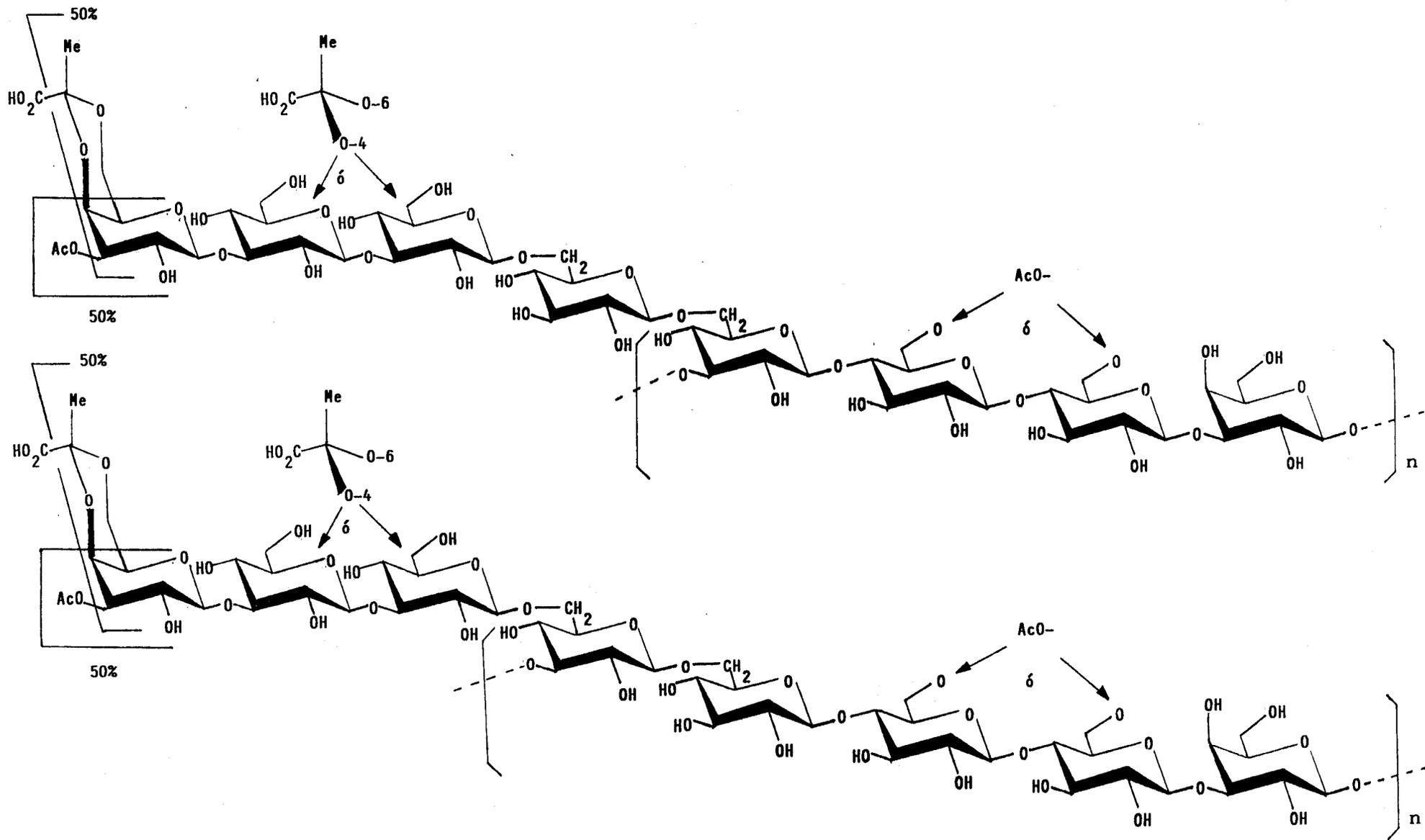


Figura 30

La posición del grupo piruvato que porta una de las dos unidades de $\rightarrow 3)-\text{Glc}-(1\rightarrow$, es más frecuente localizarla en la glucosa más próxima al extremo de la cadena lateral, según hechos experimentales descritos en la bibliografía (70).

Una alternativa posible a estas dos estructuras consiste en situar la unidad de $\rightarrow 3)-\text{Gal}-(1\rightarrow$, a continuación de la galactosa terminal. Esta estructura no es muy frecuente en los exopolisacáridos del género *Rhizobium*.

Aceptamos la estructura superior de la figura 30 por ser prácticamente idéntica a la estructura de un exopolisacárido descrito por Amemura y Harada (figura 2, página 15).

5.

CONCLUSIONES

1. En el desarrollo experimental de esta Tesis de Licenciatura, se han puesto a punto las siguientes metodologías y técnicas instrumentales:

a) determinación cualitativa simultánea por c.l.a.r. en columna de intercambio iónico, de los azúcares y sustituyentes de tipo no-carbohidrato componentes del polisacárido;

b) determinación cuantitativa por métodos fotolorimétricos del acetato y ácido pirúvico (como cetal) que existen en el polisacárido;

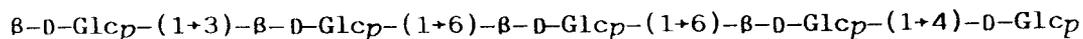
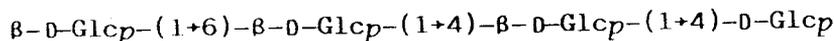
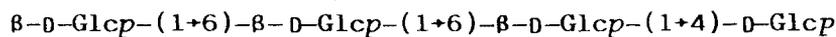
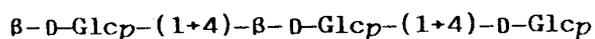
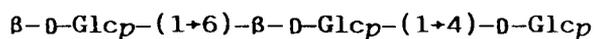
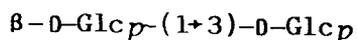
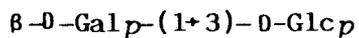
c) metilación del polisacárido y oligosacáridos, siguiendo una modificación del método de Hakomori propuesto por Finne y col., en el cual la base de metilación se genera por reacción del dimetilsulfóxido y terc-butóxido potásico;

d) localización de los sustituyentes piruvato y acetato mediante la comparación de los resultados de los análisis por metilación del polisacárido nativo y del polisacárido despiruvatado, en el primer caso, y del polisacárido nativo y metilado según el método de Prehm, en el segundo.

2. Se propone un método para localizar los hidroxilos

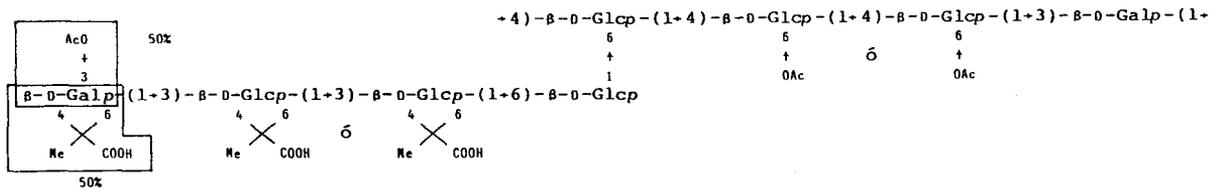
esterificados por grupos O-acetilos en la unidad de repetición del polisacárido. Este método consiste en la metilación del polisacárido mediante el método de Prehm, y la trideuterometilación en medio básico con yoduro de trideuteriometilo, y posterior análisis por c.g.l.-e.m.

3. En la hidrólisis parcial del polisacárido, se han aislado siete oligosacáridos, cuyas estructuras se han determinado por: a) metilación, hidrólisis, reducción, acetilación y análisis por c.g.l.-e.m., y; b) reducción, metilación, hidrólisis, reducción, acetilación y análisis por c.g.l.-e.m. Las estructuras propuestas para los oligosacáridos son las siguientes:



4. Como conclusión final, se propone que el polisacárido excretado por *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899, está formado por la repetición

de un octasacárido con la estructura siguiente:



BIBLIOGRAFIA

1. Sandford, P.A. y Baird, J.; "The polysaccharides", editado por G. O. Aspinall, Academic Press, New York, vol. 2, 411 (1983).
2. Bishop, C.T. y Jennings, H.J.; "The polysaccharides", editado por G. O. Aspinall, Academic Press, New York, vol. 1, 291 (1982).
3. Kenne, L. y Linberg, B.; "The polysaccharides", editado por G. O. Aspinall, Academic Press, New York, vol. 2, 287 (1983).
4. Dudman, W.F.; *Carbohydr. Res.*, **46**, 97 (1976).
5. Dudman, W.F.; *Carbohydr. Res.*, **66**, 9 (1978).
6. Dudman, W.F.; Franzén, L.-E.; Darvill, J.E.; McNeil, M.; Darvill, A.G. y Albersheim, P.; *Carbohydr. Res.*, **117**, 141 (1983).
7. McNeil, M.; Darvill, J.; Darvill, A.G.; Albersheim P.; Van Veen, R.; Hooykaas, P.; Schilperoort, R. y Dell, A.; *Carbohydr. Res.*, **146**, 307 (1986).
8. Sloneker, J.H. y Orentas, D.G.; *Nature (London)*, **194**, 478 (1962).

9. Zevenhuizen, L.P.T.M.; *Carbohydr. Res.*, **26**, 409 (1973).
10. Kuo, M.-S. y Mort, A.J.; *Carbohydr. Res.*, **145**, 247 (1986).
11. Dudman, W.F. y Heidelberger, W.F.; *Science*, **164**, 954 (1969).
12. Mort, A.J. y Bauer, W.D., *Plant Physiol.*, **66**, 158 (1980).
13. Beijerinck, M.; *Botan. Ztg.*, **46**, 726 (1888).
14. Vance, C.P.; *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 399 (1983).
15. Bauer, W.D.; *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 407 (1981).
16. Dudman, W.F.; Franzén, L.-E.; McNeil, M.; Darvill, A.G. y Albersheim, P.; *Carbohydr. Res.*, **117**, 169 (1983).
17. Stoloff, L.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **13**, 265 (1958).
18. Yin, E.T.; Galanos, C.; Kinsky, S.; Bradshaw,

- R.A.; Wessler, S.; Lüderitz, O. y Sarmiento, M.E.;
Biochim. Biophys. Acta, 261, 284 (1972).
19. Steiner, A.E.; McLaren, D.A. y Forster, C.F.;
Water Res., 10, 25 (1976).
20. Mejías Risoto, M. C.; "Estudio del polisacárido
extracelular de *Rhizobium leguminosarum* var.
trifolii RS1051 y *Rhizobium leguminosarum* var.
phaseoli CFN42 y CIAT899". Tesis Doctoral (1989).
21. Dutton, G.G.S.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*,
28, 11 (1973).
22. Biermann, C.J.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*,
46, 251 (1988).
23. Cardon, P.; Tesis Doctoral, Universidad de Lille.
24. Hicks, K.B.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 46,
17 (1988).
25. Blake, J.D. y Richards, G.N.; *Carbohydr. Res.*, 14,
375 (1970).
26. Blakeney, A.B., Harris, P.J.; Henry, R.J. y Stone,
B.A.; *Carbohydr. Res.*, 113, 291 (1983).

27. Albersheim, P.; Nevins, D.J.; English, P.D. y Karr, A.; *Carbohydr. Res.*, 5, 340 (1967).
28. Sutherland, I.W.; *Biochem. J.*, 115, 936 (1969).
29. Hestrin, S.; *J. Biol. Chem.*, 180, 249 (1949).
30. Downs, F. y Pigman, W.; *Methods in Carbohydr. Chem.*, 7, 241 (1976).
31. Perlin, A.S. y Casu, B.; "The polysaccharides", editado por G. O. Aspinall, Academic Press, New York, vol. 1, 133 (1982).
32. Hirst, E.L. y Percival, E.; *Methods in Carbohydr. Chem.*, 2, 145 (1963).
33. Haworth, W.N.; *J. Chem. Soc.*, 107, 8 (1915).
34. Purdie, T. e Irvine, J.C.; *J. Chem. Soc.*, 83, 1021 (1903).
35. Kuhn, R.; Trischmann, H. y Low, I.; *Angew. Chem.*, Int. Ed. Engl., 67, 32 (1955).
36. Hakomori, S.I.; *J. Biochem.*, 55, 205 (1964).
37. Paz Parente, J.; Cardon, P.; Leroy, Y.; Montreuil,

- J.; Fournet, B. y Ricart, G.; *Carbohydr. Res.*, **141**, 41 (1985).
38. Brauman, J.I.; Bryson, J.A.; Kahl, D.C. y Nelson, N.J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6679 (1970).
39. Finne, J.; Krusius, T. y Rauvala, H.; *Carbohydr. Res.*, **80**, 336 (1980).
40. Rauvala, H., *Carbohydr. Res.*, **72**, 257 (1979).
41. Hellerquist, C.G.; Rodén, U. y Mäkelä, P.H.; *Zur. J. Biochem.*, **25**, 96 (1972).
42. Bouveng, H.O. y Lindberg, B.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **15**, 53 (1960).0).
43. Aspinall, G.O., "The polysaccharides", editado por G. O. Aspinall, Academic Press, New York, vol. 1, 51 (1982).
44. Lönngren, J. y Svensson, S.; *Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.*, **29**, 41 (1974).
45. Churms, S.C.; "Handbook of Chromatography", C.R.C. Press, Florida, (1982).

46. Axberg, K.; Björndal, H.; Pilotti, Å. y Svensson, S.; *Acta Chem. Scand.*, 26, 1319 (1972).2).
47. Björndal, H.; Lindberg, B.; Pilotti, Å. y Svensson S.; *Carbohydr. Res.*, 15, 339 (1970).
48. Borén, H.B.; Garegg, P.J. y Svensson, S.; *Acta Chem. Scand.*, 25, 3299 (1971).
49. Björndal, H.; Lindberg, B. y Svensson, S.; *Carbohydr. Res.*, 5, 433 (1967).
50. Sweet, D.P.; Shapiro, R.M. y Albersheim, P.; *Carbohydr. Res.*, 40, 217 (1975).
51. Lew, J.Y. y Heidelberger, M.; *Carbohydr. Res.*, 52, 255 (1976).
52. Prehm, P.; *Carbohydr. Res.*, 78, 372 (1980).
53. Bailey, R.W. y Pridham, J. B.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 17, 121 (1962).
54. Churms, S.C.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 25, 13 (1970).
55. Aspinall, G.O.; "The polysaccharides", editado por

- G. O. Aspinall, Academic Press, New York, vol. 1, 62 (1982).
56. Wolfson, M.L. y Franks, N.E.; *Methods in Carbohydr. Chem.*, 5, 276 (1965).
57. Bemiller, J.N.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 22, 25 (1967).
58. Lindberg, B.; Lönngren, J. y Svensson, S.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 31, 185 (1975).
59. Hough, L. y Jones, J.K.N.; Wickberg, B.; Thompson, A.; Whistler, R.L. y Bemiller, J.N.; Lemieux, R.U.; Foster, A.B.; *Methods in Carbohydr. Chem.*, 1, 21 (1962).
60. Pontis, H.G.; *Anal. Biochem.*, 23, 331 (1968).
61. François, C.; Marshall, R.D. y Neuberger, A.; *Biochem. J.*, 83, 335 (1962).
62. Smith, I.; "Chromatographic and electrophoretic techniques", vol. I, editado por W. Heinemann, Medical books, LTD, Londres, (1969).
63. Lederer, E. y Lederer, M.; "Chromatography", Else

vier Publishing Company, New York, (1957).

64. Trevelyan, N.E.; Procter, D.P. y Harrison, J. S.;
Nature, 166, 444 (1950).
65. Kärkkäinen, J.; *Carbohydr. Res.*, 14, 27 (1970).
66. Waeghe, T.J.; Darvill, A.G.; McNeil, M. y Albersheim, P.; *Carbohydr. Res.*, 123, 281 (1983).
67. Scott, J.E.; *Methods in Carbohydr. Chem.*, 5, 38 (1965).
68. Valent, B.S.; Darvill, A.G.; McNeil, M.; Robertsen B.K. y Albersheim, P.; *Carbohydr. Res.*, 79, 165 (1980).
69. Taylor, R.L. y Conrad, H.E.; *Biochemistry*, 11, 1383 (1972).
70. Amemura, A. y Harada, T.; *Carbohydr. Res.*, 112, 85 (1983).

INDICE

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	CONCEPTOS GENERALES Y ANTECEDENTES.....	4
2.1.	Polisacáridos bacterianos.....	5
2.1.1.	Género <i>Rhizobium</i>	7
2.2.	Polisacáridos del género <i>Rhizobium</i>	12
2.2.1.	Papel de los polisacáridos de <i>Rhizo</i> <i>bium</i> en la interacción bacteria-plan ta.....	18
2.3.	Utilización industrial de polisacári dos bacterianos.....	21
2.3.1.	Campos de aplicación.....	24
2.3.2.	Perspectivas.....	25
3.	METODOS GENERALES.....	29
3.1.	Análisis de los componentes del poli sacárido.....	30
3.1.1.	Despolimerización total del polisacá rido.....	30
3.1.2.	Análisis cualitativo por cromatogra fía líquida de alta resolución.....	32
3.1.2.1.	Instrumentación y condiciones cromato gráficas.....	32
3.1.3.	Análisis cuantitativo.....	33
3.1.3.1.	Determinación cuantitativa de azúca res por cromatografía gas-líquido.....	35
3.1.3.1.1.	Preparación de los acetatos de aldito les.....	36
3.1.3.1.2.	Instrumentación y condiciones cromato	

	gráficas.....	37
3.1.3.2.	Determinación cuantitativa de sustituyentes.....	40
3.1.3.2.1.	Análisis cuantitativo de ácido pirúvico.....	40
3.1.3.2.2.	Análisis cuantitativo de acetato.....	42
3.2.	Resonancia magnética nuclear de protón.	45
3.3.	Estudio por metilación del polisacárido.....	47
3.3.1.	Metilación del polisacárido.....	47
3.3.2.	Caracterización de los monosacáridos parcialmente metilados.....	50
3.3.2.1.	Instrumentación.....	53
3.4.	Localización de sustituyentes.....	55
3.4.1.	Localización de ácido pirúvico.....	56
3.4.2.	Localización de acetato.....	58
3.5.	Caracterización de oligosacáridos.....	61
3.5.1.	Despolimerización parcial.....	61
3.5.2.	Separación de los oligosacáridos.....	63
3.5.2.1.	Cromatografía de filtración sobre gel..	64
3.5.2.1.1.	Instrumentación y condiciones cromatográficas.....	65
3.5.2.2.	Cromatografía sobre capa fina.....	66
3.5.2.3.	Cromatografía sobre papel.....	67
3.5.2.3.1.	Materiales.....	67
3.5.2.3.2.	Cromatografía sobre papel preparativa..	68
3.5.3.	Análisis estructural de los oligosacá	

	ridos.....	69
3.5.3.1.	Prerreducción de los oligosacáridos....	70
3.5.3.2.	Metilación de oligosacáridos.....	72
4.	RESULTADOS.....	73
4.1.	Cultivos de bacterias y aislamiento del exopolisacárido.....	74
4.1.1.	Materiales y métodos.....	75
4.1.1.1.	Producción del polisacárido.....	76
4.1.1.2.	Extracción.....	76
4.1.1.3.	Purificación.....	77
4.2.	Análisis de los componentes del poli sacárido.....	78
4.2.1.	Análisis cualitativo por c.l.a.r.....	78
4.2.2.	Determinación cuantitativa de azúca res por c.g.l.....	78
4.2.3.	Determinación cuantitativa de sustit <u>u</u> yentes.....	82
4.2.3.1.	Determinación cuantitativa de acetato..	82
4.2.3.2.	Determinación cuantitativa de piruva to.....	83
4.3.	¹ H-r.m.n. a 200 MHz del polisacárido...	83
4.4.	Metilación del polisacárido.....	87
4.4.1.	Permetilación del polisacárido nativo..	87
4.4.1.1.	Caracterización de los monosacáridos parcialmente metilados.....	88
4.4.1.1.1.	Análisis por c.g.l.....	88
4.4.1.1.2.	Análisis por c.g.l.-e.m.....	91

4.4.2.	Discusión de los resultados.....	91
4.5.	Localización de sustituyentes.....	98
4.5.1.	Localización de ácido pirúvico.....	99
4.5.1.1.	Análisis por c.g.l.....	100
4.5.1.2.	Análisis por c.g.l.-e.m.....	100
4.5.1.3.	Discusión de los resultados.....	105
4.5.2.	Localización de acetato.....	106
4.5.2.1.	Metilación de Prehm y c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados.....	106
4.5.2.1.1.	Discusión de los resultados.....	107
4.5.2.2.	Metilación de Prehm seguida de trideuterometilación y c.g.l.-e.m. de los acetatos de alditoles parcialmente metilados.....	109
4.5.2.2.1.	Discusión de los resultados.....	112
4.6.	Caracterización de oligosacáridos.....	114
4.6.1.	Despolimerización parcial.....	117
4.6.2.	Cromatografía de filtración sobre gel de las fracciones dializables.....	118
4.6.3.	Cromatografía sobre papel preparativa de las fracciones FD3-B ₅ y FD3-B ₇	122
4.6.4.	Análisis estructural de los oligosacáridos.....	125
4.6.4.1.	Metilación de los oligosacáridos y análisis por c.g.l.-e.m. de sus acetatos de alditoles parcialmente metilados.....	

	dos.....	125
4.6.4.1.1.	Discusión de los resultados.....	126
4.6.4.2.	Metilación de los oligosacáridos pre rreducidos y análisis por c.g.l.-e.m. de sus acetatos de alditoles parcial mente metilados.....	128
4.6.4.2.1.	Discusión de los resultados.....	129
4.7.	Estructura del polisacárido.....	134
5.	CONCLUSIONES.....	138
	BIBLIOGRAFIA.....	142
	INDICE.....	151