



+ / 1041

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Análisis Estructural de Factores de  
Nodulación Producidos por Bacterias del  
Género *Rhizobium***

María Eugenia Soria Díaz

Sevilla, Octubre de 2004

173

134

Dpto. Química Org.  
Fac. de Química  
24 de sept de 2004  
7 de septiembre 2004  
Dpto.

Alma Kapfke



[Signature]

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

# **Análisis Estructural de Factores de Nodulación Producidos por Bacterias del Género *Rhizobium***

Memoria presentada por la Licenciada  
María Eugenia Soria Díaz para  
optar al grado de Doctor en Química

[Signature]

Sevilla, Octubre de 2004



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Análisis Estructural de Factores de  
Nodulación Producidos por Bacterias del  
Género *Rhizobium***

Vº Bº de los Directores de la Tesis

Fdo. Dr. Antonio M. Gil Serrano.  
Profesor Titular del Departamento de  
Química Orgánica de la Facultad de  
Química de la Universidad de Sevilla

Fdo. Dra. Pilar Tejero Mateo.  
Profesora Titular del Departamento 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, interés y dedicación en la realización de esta Tesis.*

*A los Profesores Dr. Manuel Megías Guijo y Dra. Carolina Sousa Martin, y en especial, a la Lcda. Belén Morón Flores, del Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, por proporcionarnos los cultivos de Rhizobium y realizar los experimentos de cromatografía en capa fina de los factores de nodulación marcados radiactivamente.*

*Al Profesor Dr. José Luis Espartero Sánchez, del Dpto. de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, por su inestimable ayuda en la realización e interpretación de los experimentos de resonancia magnética nuclear*

*A la Profesora Dra. Jane Thomas-Oates y a su grupo de investigación de la Universidad de York (Inglaterra), anteriormente en el Michael Barber Center for Mass Spectrometry, University of Manchester Institute of Science and Technology (Inglaterra) por la realización de los experimentos de ES Q-o-TOF, MALDI Q-o-TOF y CID Q-o-TOF y por la estancia de un mes que me permitió realizar en su grupo de investigación.*

*A la Junta de Andalucía por la concesión de una beca de Formación de Personal Docente e Investigador.*

*Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL2002-04188-C06-02) y a la Comunidad Europea INCO-DC (proyecto IC18-CT98-0321) por la ayuda económica prestada.*

*A los Servicios de Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear 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 de sus sistemas de purificación de agua.*

*A mis padres y a mis hermanos porque han estado siempre a mi lado y me han animado cuando lo he necesitado. Gracias por el cariño y apoyo que me habéis dado durante todos estos años.*

*A mi compañero de laboratorio, Miguel Ángel, gracias por los consejos, y por supuesto, la ayuda que me has prestado desde el comienzo de esta Tesis.*

*A todos mis compañeros y amigos que están o han estado en el Departamento, en especial a los del laboratorio 1 (aunque de los del 4 tampoco me olvido), con los que he compartido muy buenos momentos desde que empecé en esto de la investigación.*

*A todos mis amigos, ya sea de fuera o dentro de la facultad, con los que he pasado gran parte de mi tiempo y que han estado siempre ahí. Gracias por todo.*

*A mis padres.*

## *Símbolos y Abreviaturas*

BSTFA	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
CPS	Polisacárido capsular
DANTE	<i>Delays alternating with nutations for tailored excitation</i>
DBF	<i>Double-band filter</i>
DHB	Ácido 3,5-dihidroxibenzóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQF	<i>Double-quantum filter</i>
EPP	Espacio periplasmático
EPS	Exopolisacárido
ES	Electrospray
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
GlcNAc-ol	<i>N</i> -acetilglucosaminitol
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	Cromatografía líquida del alta resolución
HSQC	<i><sup>1</sup>H-detection mode hetero single-quantum correlation</i>
LCO	Lipoquitinolígosacárido
LPS	Lipopolisacárido
LSIMS	<i>Liquid Secondary Ionisation Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Relación masa/carga en Espectrometría de Masas
MALDI	Desorción/ionización con láser asistida por matriz
MC	Membrana celular
ME	Membrana externa
NOE	<i>Nuclear Overhauser enhancement</i>

Q-o-TOF	<i>Analizadores Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo en disposición ortogonal</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TFA	Ácido trifluoroacético
Th	Thompson: Unidad de la relación $m/z$
TMSC	Clorotrimetilsilano
TOCSY	<i>Totally correlated spectroscopy</i>
TOF	Analizador tiempo de vuelo
$t_R$	Tiempo de retención
$t_{RR}$	Tiempo de retención relativo $t_R/t_R^0$

ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. SIMBIOSIS <i>RHIZOBIACEAE</i> -LEGUMINOSA.	3
1.2. PROCESO DE INFECCIÓN.	5
1.3. GLICOCONJUGADOS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE INFECCIÓN.	7
1.3.1. Cicloglucanas.	8
1.3.2. Exopolisacárido (EPS).	9
1.3.3. Polisacárido capsular (CPS).	9
1.3.4. Lipopolisacárido (LPS).	9
1.3.5. Factores de nodulación.	10
1.4. OBJETIVOS DE LA TESIS.	17
<b>2. MÉTODOS GENERALES</b>	<b>19</b>
2.1. CULTIVO DE BACTERIAS Y CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN.	21
2.1.1. Cultivo de bacterias.	21
2.1.2. Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.	22
2.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN.	22
2.2.1. Aislamiento de los factores de nodulación.	22
2.2.2. Purificación de los factores de nodulación.	22
2.2.2.1. Extracción en fase sólida (SPE).	22
2.2.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	23
2.3. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN.	24
2.3.1. Análisis de azúcares.	24
2.3.1.1. Formación de <i>O</i> -trimetilsilderivados de los metil glicósidos.	24
A) Metanólisis seguida de <i>N</i> -acetilación.	25
B) Trimetilsililación.	25
2.3.1.2. Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas (CGL-EM).	25
2.3.1.3. Instrumentación y condiciones cromatográficas.	29
2.3.2. Determinación de la configuración absoluta de los azúcares.	30
2.3.2.1. Formación de los 2-butil glicósidos.	31
Metanólisis seguida de butanólisis.	31
2.3.2.2. Instrumentación y condiciones cromatográficas (CGL-EM).	31
2.3.3. Determinación del tipo de sustitución. Análisis por metilación.	33
2.3.3.1. Metilación del azúcar.	33
2.3.3.2. Preparación de los acetatos de alditoles parcialmente metilados.	35

---

A) Hidrólisis y reducción del azúcar permetilado.	35
B) Acetilación.	35
2.3.3.3. Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas de los monosacáridos parcialmente metilados	36
2.3.3.4. Instrumentación y condiciones cromatográficas.	39
2.3.4. Sustituyentes presentes en el azúcar: Ácidos grasos.	39
2.3.4.1. Identificación de los ácidos grasos saturados.	39
2.3.4.2. Identificación de los ácidos grasos insaturados.	40
2.3.4.3. Identificación de los ácidos grasos hidroxilados.	41
2.3.4.4. Instrumentación y condiciones cromatográficas.	42
2.3.5. Determinación del peso molecular. Espectrometría de Masas.	42
2.3.5.1. Fuentes de Ionización.	43
2.3.5.1.1. Bombardeo por átomos rápidos. FAB y LSIMS.	43
Aplicación de las muestras e instrumentación.	45
2.3.5.1.2. Electrospray.	46
Aplicación de las muestras e instrumentación.	49
2.3.5.1.3. MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption).	50
Aplicación de las muestras e instrumentación.	51
2.3.5.2. Analizadores de masas.	51
2.3.5.2.1. Analizador magnético.	52
2.3.5.2.2. Analizador cuadrupolar.	53
2.3.5.2.3. Analizador de tiempo de vuelo (TOF).	55
2.3.5.3. Espectrometría de Masas en tándem. Disociación Inducida por Colisión (CID).	56
2.3.5.4. Análisis estructural de oligosacáridos.	58
2.3.6 Resonancia Magnética Nuclear.	60
2.3.6.1. Espectro monodimensional de $^1\text{H}$ -RMN.	60
2.3.6.2. Experimentos de excitación selectiva.	60
2.3.6.3. Experimentos COSY ( <i>Correlated Spectroscopy</i> )	61
2.3.6.4. Experimento TOCSY ( <i>Total Correlation Spectroscopy</i> ).	62
2.3.6.5. NOE y 2D-NOESY.	62
2.3.6.6. Espectro monodimensional de $^{13}\text{C}$ .	63
2.3.6.7. Correlación heteronuclear $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .	63
2.3.6.8. HMBC ( <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> ).	63
2.3.6.9. Instrumentación	64

---

<b>3. FACTORES DE NODULACIÓN DE <i>R. giardinii</i> bv. <i>giardinii</i> H152</b>	<b>67</b>
3.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN AISLADOS DE <i>R. giardinii</i> bv. <i>giardinii</i> H152.	69
3.1.1. Cultivo de bacterias y cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.	69
3.1.1.1. Cultivo de bacterias.	69
3.1.1.2. Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.	69
3.1.2. Aislamiento y purificación de los factores de nodulación.	70
3.1.3. Análisis de azúcares.	72
3.1.4. Determinación de la configuración absoluta.	73
3.1.5. Estudio de los factores de nodulación mediante Espectrometría de Masas.	74
3.1.5.1. Estudio por LSIMS Y FAB.	75
Fracción F1	75
Fracción F2	78
Fracción F3	79
Fracción F4	81
Fracción F5	82
Fracción F6	84
3.1.5.2. Estudio por ES Q-o-TOF y CID ES Q-o-TOF.	87
Fracción F1	87
Fracción F3	90
Fracción F6	94
3.1.5.3. Localización del grupo <i>O</i> -carbamoilo.	97
3.1.6. Análisis por metilación.	98
3.1.7. Análisis e identificación de los ácidos grasos.	102
Fracción F2	103
Fracción F3	103
Fracción F4	106
3.1.8. Estudio por RMN de la fracción F3.	107
<b>4. FACTORES DE NODULACIÓN DE <i>R. gallicum</i> bv. <i>gallicum</i> R602</b>	<b>121</b>
4.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN AISLADOS DE <i>R. gallicum</i> bv. <i>gallicum</i> R602.	123
4.1.1. Cultivo de bacterias y cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.	123
4.1.1.1. Cultivo de bacterias.	123
4.1.1.2. Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.	123

4.1.2. Aislamiento y purificación de los factores de nodulación.	124
4.1.3. Análisis de azúcares.	126
4.1.4. Determinación de la configuración absoluta.	128
4.1.5. Estudio de los factores de nodulación mediante Espectrometría de Masas.	129
4.1.5.1. Estudio por FAB.	129
Fracción F1	129
Fracción F2	131
Fracción F3	132
Fracción F4	134
4.1.5.2. Estudio por MALDI Q-o-TOF, ES Q-o-TOF y CID MALDI Q-o-TOF.	136
Fracción F1	136
Fracción F2	139
Fracción F3	141
Fracción F4	144
4.1.6. Análisis por metilación.	147
4.1.7. Análisis e identificación de los ácidos grasos.	151
Fracción F1	151
Fracción F2	152
Fracción F3 y F4	153
4.1.8. Estudio por RMN de la fracción F2.	154
<b>5. INFLUENCIA DEL pH ÁCIDO EN LOS FACTORES DE NODULACIÓN DE <i>R. tropici</i> CIAT899</b>	<b>163</b>
5.1. INFLUENCIA DEL pH ÁCIDO EN LA PRODUCCIÓN DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN DE <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.	165
5.1.1. Cultivo de bacterias y cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.	165
5.1.1.1. Cultivo de bacterias.	165
5.1.1.2. Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.	166
5.1.2. Aislamiento y purificación de los factores de nodulación.	167
5.1.3. Análisis estructural de los factores de nodulación por Espectrometría de Masas.	168
1) Factores de nodulación sin sustituir.	175
2) Factores de nodulación sulfatados.	178
3) Factores de nodulación conteniendo <i>N</i> -Me.	181

---

4) Factores de nodulación con una unidad de manosa como terminal reductor.	185
5) Factores de nodulación carbamoilados.	187
6) Factor de nodulación disulfatado.	190
5.1.4. Análisis de azúcares.	192
5.1.5. Determinación de la configuración absoluta.	194
5.1.6. Análisis por metilación.	195
5.1.7. Análisis e identificación de los ácidos grasos.	198
1) Ácidos grasos hidroxilados.	198
2) Ácidos grasos saturados e insaturados.	201
5.1.8. Efecto de la acidez en los factores de nodulación. Conclusiones.	203
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>205</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>209</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la simbiosis entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas leguminosas es un tema de enorme interés: por un lado, se intenta reducir el uso de fertilizantes nitrogenados, que plantea una serie de problemas como son su elevado coste de producción y la contaminación debida a su uso indiscriminado; por otro lado, la simbiosis Rhizobiaceae-leguminosa permite el estudio de los procesos de reconocimiento celular entre la bacteria y la planta hospedadora y, por tanto, proporciona un sistema atractivo para elucidar las bases moleculares de las interacciones que los microorganismos (patógenos y simbióticos) establecen con las plantas.

### 1.1. SIMBIOSIS RHIZOBIACEAE-LEGUMINOSA.

La primera explicación sobre la fijación biológica de nitrógeno fue dada en 1888 por Hellriegel y Wilfarth.<sup>1</sup> A partir de entonces, este proceso adquirió gran importancia por sus aplicaciones prácticas, así como por las perspectivas futuras que presentaba para la investigación. De hecho, ya en la primera década de su descubrimiento se constituyó en Inglaterra la primera empresa productora de inoculantes microbianos (Nitragin).

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso natural exclusivo de los microorganismos procariotas que consiste en la reducción de nitrógeno atmosférico a ion amonio. La inmensa mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno pertenecen al grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias, dentro del cuál se encuentran la familia *Rhizobiaceae*, donde existen seis géneros capaces de establecer simbiosis con plantas leguminosas: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*. Todas ellas son bacterias Gram-negativas presentes en el suelo, capaces de establecer una relación simbiótica con leguminosas a través de la formación de un órgano especializado llamado nódulo, donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno. El amonio producido durante este proceso es asimilado por la planta. Por su parte, la bacteria recibe fuentes de carbono, producto de la biosíntesis vegetal, en un nicho ecológico (el nódulo) que no es accesible para otras bacterias y, por tanto, favorable para su multiplicación y supervivencia.

La especificidad en la relación simbiótica varía considerablemente entre los distintos rizobios. Así, por ejemplo, *Rhizobium* sp. NGR234 es capaz de nodular en más de ciento doce especies distintas de leguminosas y en la no leguminosa *Parasponia*,<sup>2</sup> mientras que otros rizobios tiene un rango hospedador mucho más reducido, discriminando incluso entre genotipos dentro de una misma especie de leguminosa. En la Tabla 1.1 se muestra diferentes especies bacterianas junto con sus plantas hospedadoras.

Especies Bacterianas	Plantas Hospedadoras
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago</i> (alfalfa), <i>Melilotus</i> y <i>Trigonella</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum</i> (guisante), <i>Vicia</i> (arveja), <i>Lathyrus</i> y <i>Lens</i> (lenteja)
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trébol)
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (judía, frijol)
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> , <i>Anthyllis</i>
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Leguminosas tropicales, <i>Parasponia</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> (leucena), <i>Macroptilium</i> (siratro), <i>Medicago</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i> (soja), <i>Vigna</i> ("cowpea")
<i>Rhizobium galeae</i>	<i>Galega Officinalis</i> , <i>G. orientalis</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (judía, frijol)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i> (soja), <i>Vigna</i> ("cowpea"), <i>Macroptilium</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i>
<i>Rhizobium giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>

**Tabla 1.1.** Simbiosis *Rhizobiaceae*-leguminosa

## 1.2. PROCESO DE INFECCIÓN.

El proceso de infección es complejo y comprende varias etapas en las que se encuentran implicados un gran número de genes, tanto de la planta como de la bacteria.

La interacción simbiótica está controlada por señales de intercambio entre la planta y los rizobios (Figura 1.1). La emisión por parte de la leguminosa de ciertos flavonoides provoca la multiplicación de los rizobios en la rizosfera y en la superficie de las raíces de la planta. Dichos flavonoides, si son reconocidos por la bacteria, interactúan con la proteína NodD y activan la transcripción de los llamados genes de nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*): estos genes de nodulación, entre otras funciones, actúan en la biosíntesis, regulación y excreción de los factores de nodulación que son esenciales para el comienzo del proceso de infección.

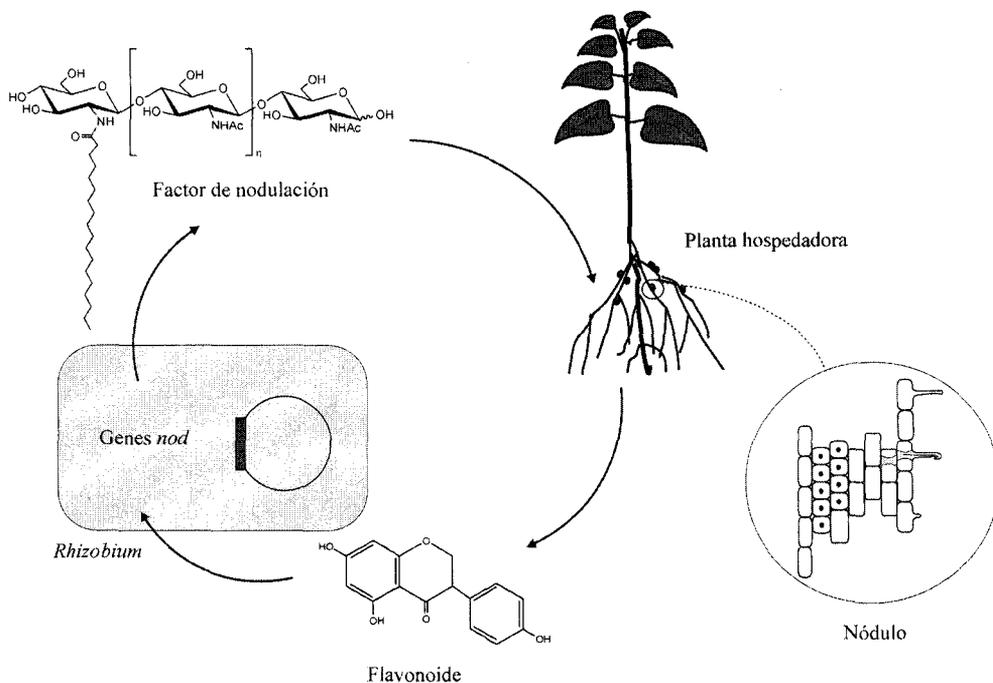


Figura 1.1. Intercambio de señales entre la planta y la bacteria.

El modo de infección de los rizobios depende de la planta hospedadora.<sup>3</sup> En la mayoría de las leguminosas, por ejemplo, *Pisum*, *Trifolium*, *Medicago*, etc, los factores de nodulación provocan la deformación del pelo radical seguido por la formación del

hilo de infección en el pelo radical. Una de las primeras fases del reconocimiento entre la bacteria y la leguminosa es la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta (Figura 1.2, 1 y 2). El proceso de adhesión ocurre en dos etapas: inicialmente, los rizobios se unen débilmente a la raíz, produciéndose a continuación una adherencia firme y la acumulación de células bacterianas en la superficie del pelo radical. Se postula que las interacciones entre las lectinas de la planta y los polisacáridos (EPS, LPS o CPS) de la superficie de la bacteria son los responsables de las uniones de tipo débil, mientras que en las uniones posteriores, de tipo fuerte, participan microfibrillas de celulosa. A continuación, se produce la curvatura del pelo radical, donde la bacteria queda atrapada, y se inicia la formación del tubo de infección por invaginación de la pared del pelo radical (Figura 1.2, 3-5).

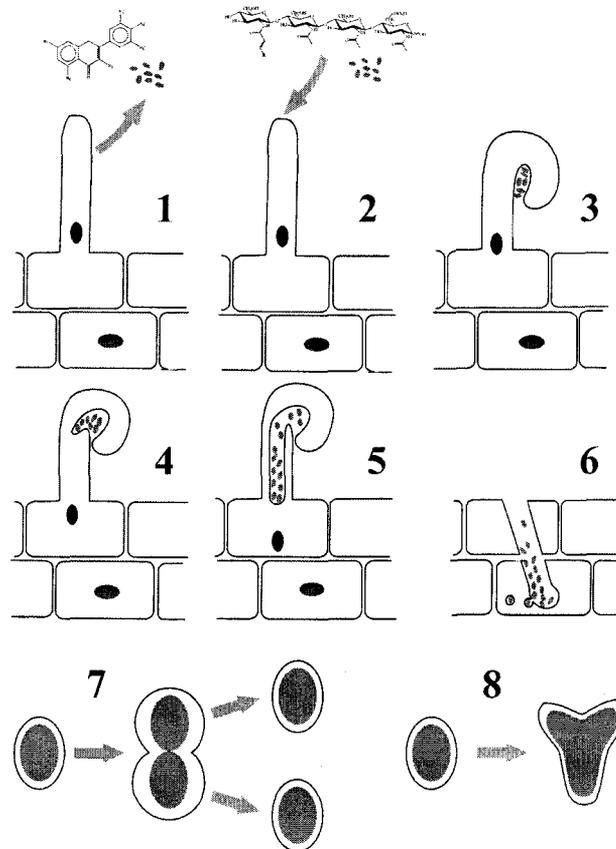


Figura 1.2. Esquema del proceso de infección.

Paralelamente al desarrollo del tubo de infección, se induce la división y diferenciación de las células del córtex, formándose el llamado *primordio nodular*, a

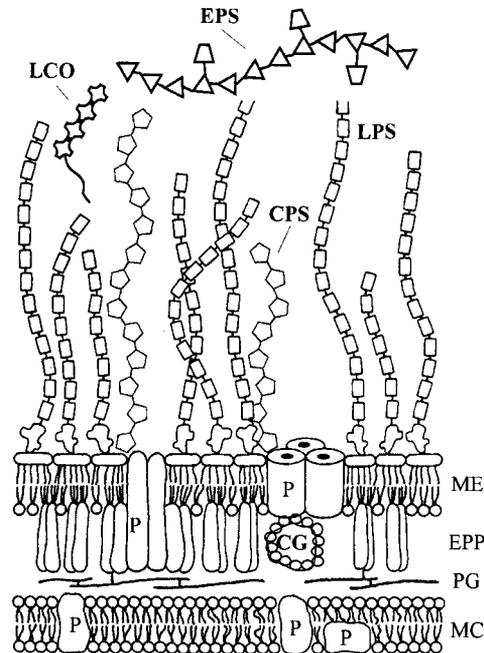
partir del cual se va a originar el nódulo maduro para la fijación de nitrógeno. Mediante el crecimiento del tubo de infección, la invasión bacteriana puede atravesar las células de la corteza de la raíz y llegar al nódulo incipiente. En él, las bacterias son liberadas mediante la extrusión de la pared del tubo de infección, quedando rodeadas de la membrana peribacterioide (Figura 1.2, 6). El conjunto formado por la membrana peribacterioide y la bacteria se denomina *simbiosoma*. A medida que la bacteria se divide en el simbiosoma, también lo hace la membrana (Figura 1.2, 7). Por último, se produce la diferenciación de las bacterias, alcanzándose la “forma simbiótica” denominada *bacterioide*, y que es en la que se desarrolla la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Esta diferenciación suele estar acompañada de un aumento del volumen de la bacteria, así como de un cambio de su morfología de bacilo corto a formas más o menos distorsionadas (Figura 1.2, 8). Con la formación del nódulo se concluye el proceso de infección.

### 1.3. GLICOCONJUGADOS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE INFECCIÓN.

En el proceso de simbiosis bacteria-planta juegan un papel importante un conjunto de carbohidratos, tanto polisacáridos como oligosacáridos. Todos ellos están implicados de una u otra forma en el mecanismo molecular de la interacción simbiótica. Éstos son:

- Cicloglucanas periplasmáticas.
- Polisacáridos superficiales: Exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (CPS) y lipopolisacáridos (LPS).
- Factores de nodulación

La Figura 1.3 representa la organización molecular de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Los carbohidratos implicados en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* se encuentran también representados. La membrana citoplasmática (MC) está compuesta por una bicapa de fosfolípidos en las que se hayan incluídas diversas proteínas (P). La membrana externa (ME) está compuesta por una capa lipídica asimétrica; la capa interna la forman fosfolípidos y lipoproteínas, mientras que la externa está formada por el lípido A de los lipopolisacáridos. El polisacárido capsular se encuentra asociado a dicha membrana externa. La dos membranas están separadas por una capa de peptidoglicana (PG) y el espacio periplasmático (EPP), donde se encuentran las cicloglucanas.



**Figura 1.3.** Pared celular de las bacterias Gram-negativas. La membrana citoplasmática (MC) está compuesta por una bicapa de fosfolípidos en las que se hayan incluidas proteínas (P). La membrana externa (ME) está compuesta por una capa lipídica asimétrica; la capa interna la forman fosfolípidos y lipoproteínas, mientras que la externa está formada por el lípido A de los lipopolisacáridos. El polisacárido capsular se encuentra asociado a dicha membrana externa. Las dos membranas están separadas por una capa de peptidoglicano (PG) y el espacio periplasmático (EPP), donde se encuentran las cicloglucanas (CG).

### 1.3.1. Cicloglucanas.

Las cicloglucanas son moléculas producidas por las bacterias Gram-negativas que se encuentran en el espacio periplasmático existente entre la pared celular y la membrana citoplasmática (Figura 1.3). Durante el proceso simbiótico se ha detectado la presencia de cicloglucana extracelular,<sup>4</sup> que desempeña varias funciones durante la interacción bacteria-planta: participan en el anclaje de la bacteria a la planta hospedadora, mantienen el potencial osmótico del periplasma bacteriano, actúan como agente de transporte de la molécula señal planta-bacteria (factores Nod y flavonoides) al tener la capacidad de formar complejos con moléculas hidrofóbicas y finalmente actúan

como supresores específicos a la respuesta defensiva de la planta en el proceso simbiótico.<sup>5-7</sup>

Son oligosacáridos cíclicos de glucosa, en los que el enlace glicosídico es  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) (en *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) y el grado de polimerización puede variar de 17 a 25 unidades en *R. leguminosarum*, o hasta 40 unidades en *S. meliloti*. Las cicloglucanas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) pueden ser aniónicas al contener como sustituyente fosfoglicerol en O-6 de algunos monosacáridos. También se han encontrado cicloglucanas con enlace glicosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), pero sólo en *Bradyrhizobium*, su grado de polimerización puede variar de 10 a 13 glucosas.

### 1.3.2. Exopolisacárido (EPS).

Los exopolisacáridos pueden ser tanto homo- como heteropolisacáridos, lineales o ramificados. Los azúcares componentes de estos polisacáridos son principalmente monosacáridos comunes como D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico. Entre los sustituyentes se encuentran frecuentemente los grupos acetilo, piruvato (como acetal), succinato e hidroxibutanoato. Además de los ácidos urónicos, estos sustituyentes son los responsables del carácter ácido de la mayoría de los EPS de los rizobios. Sus principales funciones son de defensa contra agentes externos y reguladores de los mecanismos de transporte de iones.

### 1.3.3. Polisacárido capsular (CPS).

En contraste con los exopolisacáridos que son excretados al medio de cultivo, los polisacáridos capsulares están asociados a las células bacterianas, aunque no hay ninguna evidencia hasta ahora de que los polisacáridos capsulares de los rizobios se encuentren unidos a la membrana a través de un grupo análogo al Lípido A, como en los lipopolisacáridos, o a través del ácido fosfatídico, tal como sucede en otros polisacáridos capsulares. Además, estructuralmente son también diferentes a los lipopolisacáridos, ya que contienen una mayor proporción de Kdo o algún derivado de éste, y tienen una mayor densidad de carga, con cargas negativas en cada unidad de repetición o incluso en cada azúcar.

### 1.3.4. Lipopolisacárido (LPS).

Los lipopolisacáridos son componentes característicos de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas, así como de algunas cianobacterias. Se encuentran en la capa más externa de la membrana exterior de la célula, tienen capacidad antigénica,

contribuyen a la integridad de dicha membrana y protegen a la célula frente a la fagocitosis y la lisis. En su estructura se diferencian claramente tres partes (Figura 1.6):

- **Lípido A:** Es la parte hidrofóbica del lipopolisacárido y es la que se une a la membrana exterior, mientras que la parte polisacáridica se proyecta hacia el exterior de la célula. Está compuesto por ácidos grasos, aminoazúcares y ácidos urónicos.
- **O-antígeno:** En la mayoría de los casos está formado por oligosacáridos de naturaleza muy variable tanto en composición, como en la secuencia o la anomera del enlace. Es el que le da el carácter antigénico al lipopolisacárido.
- **Oligosacárido interno (core):** Esta región está compuesta por un tri- o tetrasacárido que se une al O-antígeno y al Lípido A a través de residuos de Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico). La diversidad estructural de esta región es pequeña.

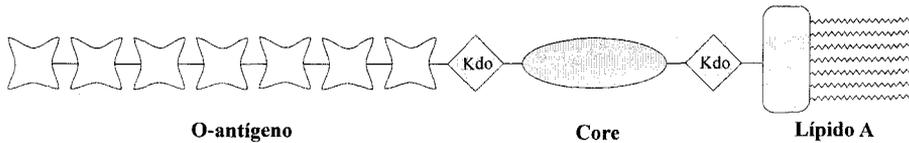


Figura 1.6. Esquema de la estructura del lipopolisacárido (LPS).

### 1.3.5. Factores de nodulación.

La bacteria produce los factores de nodulación en respuesta a ciertas sustancias (inductores) segregadas por las raíces de las plantas. El más potente de estos inductores pertenece al grupo de los flavonoides,<sup>8</sup> pero también, otras moléculas, tales como algunas betaínas y ácidos aldónicos, pueden actuar como inductores para algunos rizobios pero sólo a muy altas concentraciones.<sup>8,9</sup> La inducción de la producción de los factores Nod es específica para la estructura del flavonoide.

Los factores de nodulación inician la formación del nódulo y otros procesos relacionados con el proceso de infección en la planta.<sup>3,10,11</sup> En algunos casos se ha podido inducir la formación de un nódulo completo en plantas de alfalfa crecidas en ausencia de microorganismos, con sólo añadir estos compuestos a muy bajas concentraciones.<sup>12</sup>

Igualmente, pueden inducir la deformación, ramificación y curvatura de los pelos radicales a concentraciones pico o nanomolares.<sup>12-14</sup>

Los factores de nodulación también llamados moléculas señal, factores Nod o LCO (*lipochitin oligosaccharide*) son oligosacáridos de D-glucosamina (de 3 a 5 unidades) enlazada por uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), *N*-acetilada en todas las unidades excepto en el terminal no reductor que se encuentra *N*-acilado por un ácido graso de naturaleza variable, tales como el ácido vacénico (C<sub>18:1</sub>) o el ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>), o por otros ácidos menos usuales como C<sub>20:1</sub> u otros poliinsaturados como C<sub>18:4</sub> o hidroxilados. Estas moléculas suelen presentar sustituyentes de naturaleza diversa en el extremo reductor y en el no reductor del oligosacárido: grupos *N*-metilo, *O*-acetilo y *O*-carbamoilo suelen estar localizados en el extremo no reductor y grupos *O*-fucosilo, *O*-(2-*O*-metil fucosilo), *O*-(4-*O*-acetil fucosilo), *O*-acetilo o sulfato en el extremo reductor (Tabla 1.2).

Excepcionalmente, algunos factores de nodulación pueden presentar variaciones tanto en la longitud como en la composición de la cadena. Por ejemplo, algunos de los LCOs que produce *M. loti* NZP2213 son oligosacáridos compuestos por dos unidades de glucosamina<sup>15</sup> y otros, como en el caso de *Rhizobium* sp. GRH2, poseen hasta seis unidades en su esqueleto.<sup>16</sup> *Sinorhizobium fredii* USDA191 sintetiza pentasacáridos pero en la mitad de la cadena presenta una unidad de D-glucosa.<sup>17</sup> Algunos factores de nodulación presentan sustituyentes en *O*-1 de la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) reductora terminal, por ejemplo, *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 y *Rhizobium tropici* CIAT899 sintetizan LCOs con glicerol o manosa en esa posición, respectivamente.<sup>14,18,19</sup> Recientemente, se han aislados factores de nodulación procedentes de *Rhizobium* sp. BR816 donde la unidad de GlcNAc que forma el terminal reductor del oligosacárido se ha transformado en una unidad de *N*-acetil glucosaminitol (GlcNAc-ol).<sup>20</sup>

Los factores de nodulación son sintetizados por la bacteria mediante la acción de las proteínas codificadas por los genes de nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*), cuya expresión está regulada por compuestos producidos por la planta (flavonoides). Estos genes de nodulación se clasifican en tres grupos:

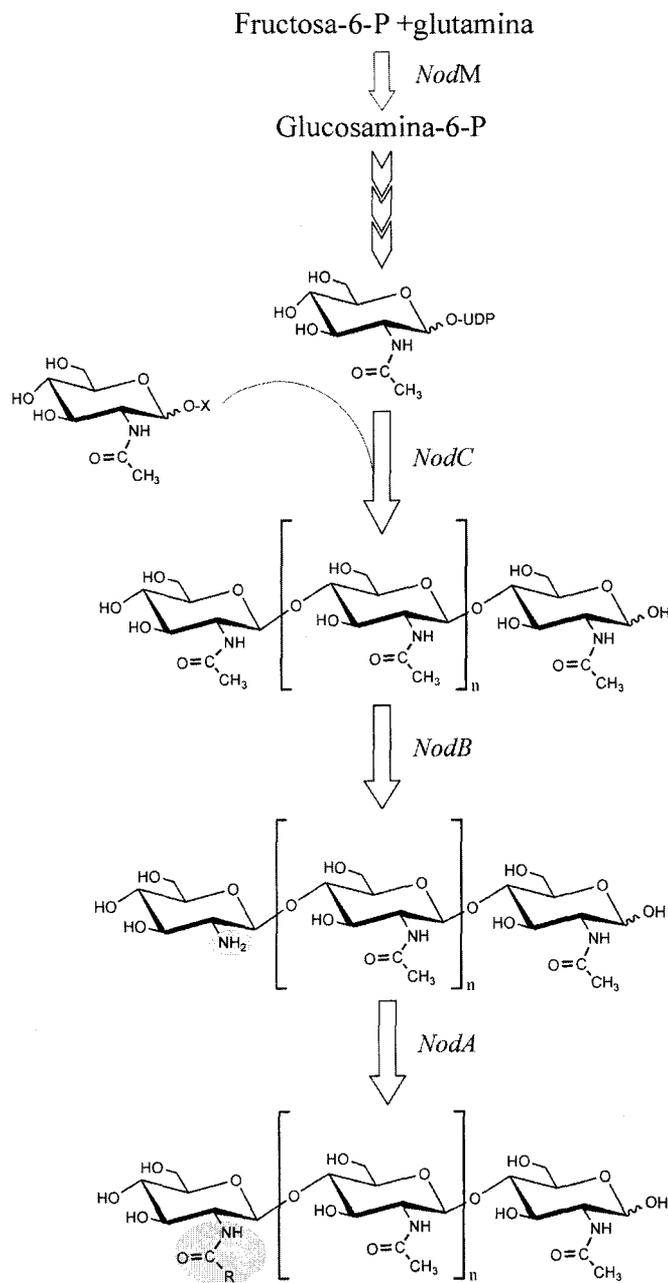
- gen *nodD*: activa la transcripción del resto de los genes *nod*.
- genes *nod* comunes, *nodA*, *nodB* y *nodC*: Se han encontrado en todos los rizobios estudiados hasta la fecha y son los responsables de sintetizar el esqueleto general de los factores de nodulación, es decir, de la unión de las moléculas de *N*-acetil- D-glucosamina y de la *N*-acilación por un ácido graso

del terminal no reductor. La Figura 1.4 muestra un esquema de la biosíntesis del esqueleto de estas moléculas.

- genes *nod* específicos: Su función es la de introducir los distintos sustituyentes en este esqueleto básico, regulando la entrada de los mismos tanto en el terminal reductor como en el terminal no reductor. También determina la naturaleza del ácido graso (Figura 1.5).

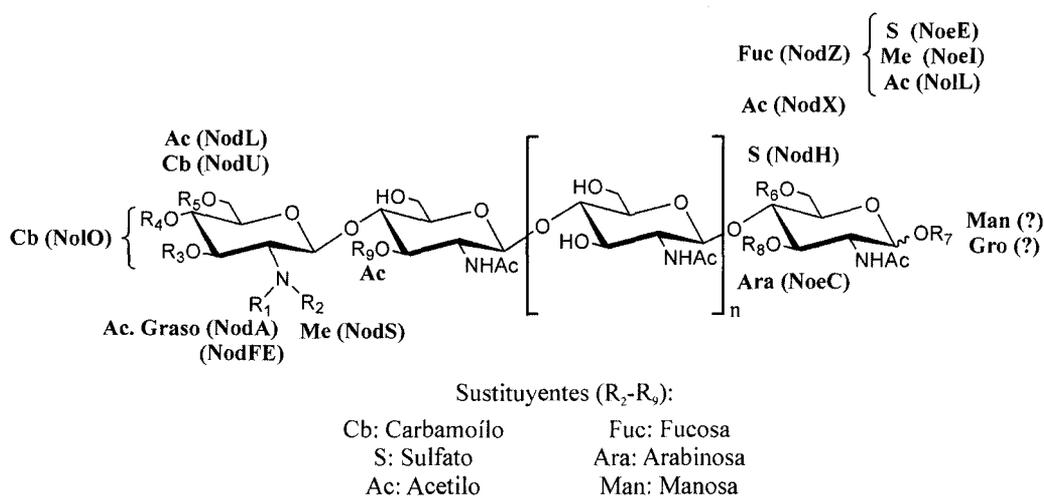
Dependiendo de las especies bacterianas, los factores de nodulación están modificados por diferentes sustituyentes en su esqueleto. Cada cepa de *Rhizobium* produce un conjunto característico de moléculas-síñal que parece reflejar la adaptación de la bacteria a la planta hospedadora. Así, rizobios que pertenecen a grupos taxonómicamente diferentes producen LCOs de estructura similar cuando son aislados de la misma planta.<sup>21</sup> Este razonamiento no se puede aplicar a todas las modificaciones encontradas, ya que en parte éstas pueden ser el resultado de condiciones de cultivo artificiales que permiten la sobreproducción de los factores de nodulación para su análisis estructural.<sup>22</sup> Sin embargo, en muchos casos es muy claro que muchas de las modificaciones encontradas en las estructuras de los factores de nodulación son muy importantes en la especificidad.

Muchos genes diferentes están implicados en la modificación específica de la estructura básica de los factores de nodulación. Por ejemplo, *nodH* codifica una sulfotransferasa que transfiere el grupo sulfato al terminal no reductor de los LCOs que produce *Sinorhizobium meliloti*. El grupo sulfato es indispensable para que *S. meliloti* nodule *Medicago sativa* (alfalfa).<sup>12,23</sup> Un mutante en *nodH* pierde la capacidad para hacerlo.<sup>13</sup> Algo similar ocurre con la fucosa, que es necesaria para que *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 nodule *Macroptilium atropurpureum* (siratro). En la fucosilación interviene el gen *nodZ*. El gen *nodZ* codifica una 6-*O*-fucosiltransferasa que transfiere una fucosa al *O*-6 del terminal reductor. La mutación en este gen hace que sea incapaz de nodular en siratro al producir factores de nodulación sin fucosa.<sup>24</sup> Lo mismo sucede con la presencia de un grupo *N*-Me (*nodS*) en el terminal no reductor, que parece ser indispensable para que una bacteria nodule *Phaseolus vulgaris*.<sup>25</sup> Además de los genes implicados en la funcionalización de los factores de nodulación, existen otros que regulan la biosíntesis de metabolitos implicados en la exportación de estas moléculas



**Figura 1.4.** Biosíntesis de los factores de nodulación. Acción del genes *nod* comunes.

Un esquema general de los factores de nodulación, tipos de sustituyentes y su relación con los genes de nodulación específicos se representa en la Figura 1.5:



**Figura 1.5.** Esquema general de un factor de nodulación y su relación con los genes de nodulación específicos.

La estructura de los factores de nodulación, incluyendo las sustituciones en el terminal reductor como en el no reductor, la cadena del ácido graso, el grado de polimerización y *N*-acetilación pueden contribuir también a la estabilidad del oligosacárido frente a las degradaciones provocadas por enzimas segregadas por la planta,<sup>26</sup> por ejemplo el grupo sulfato en el terminal reductor de los factores de nodulación producidos por *Rhizobium meliloti* protege el enlace glicosídico β-(1→4) más cercano a este grupo frente la quitinasa tipo I de *M. sativa*.<sup>27</sup>

Especie	Sustituyentes										Ref.
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	n	
<i>R. sp.</i> BR816	C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>	Me	H	H	Cb	S	GlcNAc-ol H	H	H	1	20
<i>R. sp.</i> GRH2	C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:0</sub> C <sub>18:1</sub> , C <sub>20:1</sub>	Me, H	H	H	H	S, H	H	H	H	1,2,3	16
<i>R. sp.</i> ORS1001	C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>	Me	Cb, H	Cb, H	Cb, H	S, H	H	H	H	2	28
<i>R. etli</i> CE3	C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub>	Me	H	Cb	H	4- <i>O</i> -AcFuc	H	H	H	2	29
<i>R. etli</i> CFN42	C <sub>18:1</sub>	Me	Cb, H	Cb, H	Cb, H	4- <i>O</i> -AcFuc	H	H	H	2	30
<i>R. galegae</i> HAMBI1207	C <sub>14:0</sub> , C <sub>16:0</sub> C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:2</sub> C <sub>18:3</sub> , C <sub>18:4</sub> C <sub>20:2</sub> , C <sub>20:3</sub> C <sub>18:0/3-OH</sub> C <sub>20:1/3-OH</sub>	H	H	H	Cb, H	H	H	H	Ac H	1,2	31

**Tabla 1.2.** Estructuras de los factores de nodulación de cepas pertenecientes al género *Rhizobium*. El esquema general y los sustituyentes R<sub>n</sub> se muestran en la Figura 1.5.

Especie	Sustituyentes										n	Ref.
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>			
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ANU843	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> C <sub>18:1</sub> , C <sub>16:0/3OH</sub> C <sub>14:0/3OH</sub> , C <sub>18:2</sub> C <sub>18:0/3OH</sub>	H	Ac, H	Ac, H	Ac, H	H	H	H	H	0,1,2	32-34	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> LPR5045	C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:3</sub> C <sub>20:1</sub> , C <sub>20:2</sub> , C <sub>20:3</sub> C <sub>20:4</sub> , C <sub>18:0-OH</sub>	H	H	H	Ac	H	H	H	H	0,1,2	35,36	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> A1	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:2</sub> , C <sub>18:3</sub> C <sub>18:4</sub> , C <sub>18:1-OH</sub>	H	H	H	Ac, H	Ac, H	H	H	H	0,1,2	37	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> RBL5560	C <sub>18:4</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:0</sub> C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub>	H	H	H	Ac	H	H	H	H	1,2	35,38	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> TOM	C <sub>18:4</sub> , C <sub>18:1</sub>	H	H	H	Ac, H	Ac, H	H	H	H	1,2	39	
<i>R. tropici</i> CFN299	C <sub>18:1</sub>	Me	H	H	H	S, H	H	H	H	2	40	
<i>R. tropici</i> CIAT899	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:0</sub> C <sub>18:1</sub> , C <sub>20:0</sub> , C <sub>20:1</sub>	Me, H	H	H	H	S, H	H, Man	H	H	1,2	19	

**Tabla 2.1 (continuación).** Estructuras de los factores de nodulación de cepas pertenecientes al género *Rhizobium*. El esquema general y los sustituyentes R<sub>n</sub> se muestran en la Figura 1.5.

#### 1.4. OBJETIVO DE LA TESIS.

En esta tesis se ha investigado las estructuras de los factores de nodulación aislados de *Rhizobium giardinii* bv. *giardinii* H152 y de *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602, así como las modificaciones producidas en los factores de nodulación aislados de *Rhizobium tropici* CIAT899 cuando la bacteria se somete a estrés ácido.

La presente tesis está dividida en seis capítulos. En el primero se presenta la introducción. El segundo corresponde a los métodos generales utilizados. En el tercero se describe la determinación estructural de los factores de nodulación producidos por *R. giardinii* bv. *giardinii* H152. El cuarto describe la determinación estructural de los factores de nodulación de *R. gallicum* bv. *gallicum* R602. En el quinto capítulo se discute la influencia del pH en el número y estructura de los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899, y finalmente, en el sexto capítulo, se recogen las conclusiones.

## 2. MÉTODOS GENERALES

## 2.1. CULTIVO DE BACTERIAS Y CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN.

### 2.1.1. Cultivo de bacterias.

El medio de cultivo que se emplea para el crecimiento de las diferentes cepas estudiadas en esta tesis es el medio mínimo B<sup>-</sup>.<sup>41</sup> La composición de este medio es:

Manitol.....	10 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,55 g
KNO <sub>3</sub> .....	0,55 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O .....	1,3 g
Fe(III)-NaAEDT.....	33 mg
Micronutrientes.....	2,5 ml
H <sub>2</sub> O.....	1 l

Se ajusta el pH del medio a 5,0. Una vez estéril y frío, se añade KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hasta pH 7,2, biotina y tiamina hasta una concentración final de 1 mM, 0,2 mg/l y 5,0 mg/l, respectivamente.

La composición de los micronutrientes es:

MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O .....	0,462 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O.....	97,4 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1,269 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .....	33,9 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O .....	35,4 mg
H <sub>2</sub> O .....	1 l

La bacteria se siembra en tubos con 5 ml de medio de cultivo mínimo B<sup>-</sup> manteniéndola a 28 °C hasta que la densidad óptica, empleada como medida de la concentración de las células, alcanza valores entre 0,6-0,8 ( $\lambda = 600$  nm), llegado a este punto se trasvasa a matraces con 100 ml del mismo medio de cultivo, incubándolos a 28 °C hasta que la densidad óptica alcanza nuevamente valores entre 0,6-0,8. Finalmente, se diluye hasta un 1 l con el mismo medio de cultivo. La producción de factores de nodulación requiere la presencia de un flavonoide como inductor en el medio de cultivo. El flavonoide se añade al medio de cultivo hasta una concentración final de 1  $\mu$ M. Estos cultivos se incuban a 28 °C con agitación hasta fase exponencial retardada. Paralelamente, se hace otro cultivo sin añadir flavonoide (empleado como control negativo).

### 2.1.2. Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.

Los análisis por cromatografía en capa fina (c.c.f.) de los factores de nodulación se llevan a cabo de acuerdo con el método propuesto por Spaink y col.<sup>41</sup> Para ello, es necesario preparar un cultivo a pequeña escala marcado radiactivamente. Se prepara un cultivo en medio mínimo B<sup>-</sup> a una D.O.= 0,2 medida a 600 nm, el cuál se diluye 1:10 en 1 ml del mismo medio adicionando el flavonoide inductor correspondiente, salvo para el control negativo, hasta una concentración final de 1 µg/ml. El marcaje radiactivo se efectúa con 0,5 µCi de clorhidrato de <sup>14</sup>C-glucosamina (actividad específica de 52 mCi) o con 3 µCi de Mg<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>. Después de 16 horas de cultivo, se añade *n*-butanol saturado con agua (0,5 ml) al sobrenadante, dejándose la mezcla 12 horas con agitación. Una vez centrifugado, la fase butanólica se concentra en un evaporador de vacío Speed-Vac<sup>TM</sup> Savant. El sólido resultante se resuspende en *n*-butanol saturado con agua (40 µl), aplicándose esta disolución (5-10 µl) a la placa de c.c.f. de sílica RP-18F<sup>254S</sup> de 10 cm x 10 cm. La separación de los factores de nodulación se lleva a cabo empleando una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1) como eluyente. Las placas de c.c.f. se exponen sobre una película de autorradiografía Kodak BioMax MR-2 durante 15-30 días, al cabo de los cuales se procede a su revelado con soluciones de revelador y fijador igualmente suministradas por Kodak.

## 2.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN.

### 2.2.1. Aislamiento de los factores de nodulación.

Los factores de nodulación se aíslan del cultivo bacteriano mediante extracción con *n*-butanol. Al cultivo se añade *n*-butanol (500 ml/l de cultivo), se deja en agitación durante 12 horas y se extrae. Éste es el método más general y el usado en esta tesis.<sup>38</sup>

### 2.2.2. Purificación de los factores de nodulación.

El extracto butanólico, que contiene los factores de nodulación, se purifica por extracción en fase sólida (SPE) seguida de fraccionamiento por HPLC.

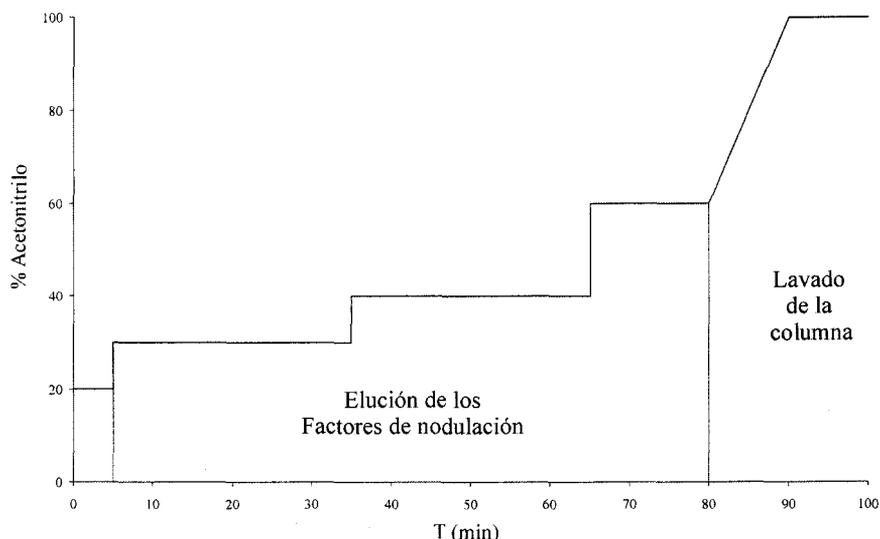
#### 2.2.2.1. Extracción en fase sólida (SPE).

La muestra se somete a una extracción en fase reversa y se hace pasar a través de una columna que contiene un relleno que retiene la muestra en función de la polaridad,

eluyendo selectivamente los factores de nodulación con diversas mezclas de acetonitrilo:agua. Se utiliza una columna rellena de C18 (octadecilsilano) (SPE 6 ml, 1g, Resprep). En primer lugar, la columna se acondiciona pasando acetonitrilo (2 ml) seguida de una disolución de acetonitrilo al 20% en agua (2 ml). La muestra se hace pasar a través del relleno a un flujo aproximado de 5 ml /min. Los factores de nodulación se eluyen con disoluciones acuosas de acetonitrilo al 20% (5 ml), acetonitrilo al 45% (5 ml) y acetonitrilo al 60% (5 ml). Se obtienen tres fracciones que se concentran y se liofilizan.

### 2.2.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La separación se basa en la diferencia de polaridad de los factores de nodulación. La muestra procedente de la extracción en fase sólida se cromatografía en una columna semipreparativa en fase reversa (C18, 250 x 7.5 mm, Spherisorb ODS2, 5  $\mu$ m, Tracer). La elución se lleva a cabo usando diferente mezclas de acetonitrilo-agua con el siguiente gradiente de elución: al 20% (5 min), 30% (30 min), 40% (30 min) y 60% (15 min) y un gradiente lineal desde 60 hasta 100% de acetonitrilo (10 min). El flujo utilizado es de 2.5 ml/min. El seguimiento se realiza por un detector UV-V Photodiode Array (Waters) monotorizando a 206 nm. Se recogen las fracciones cada minuto (2,5 ml) utilizando un colector automático Wilson FC 203B. Posteriormente, las fracciones correspondientes a un mismo pico cromatográfico se unen, se concentran y se liofilizan.



**Figura 2.1.** Perfil del gradiente de elución empleado en el fraccionamiento de los factores de nodulación mediante HPLC.

### 2.3. ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN.

El estudio estructural de estas moléculas incluye:

- Análisis de los monosacáridos que constituyen el oligosacárido y determinación de la configuración absoluta (serie D o L).
- Determinación del tipo de enlace glicosídico entre estos monosacáridos (posiciones de enlace y anomería).
- Determinación de la secuencia de dichos enlaces, es decir, el orden en que se unen las unidades identificadas.
- Identificación de los posibles sustituyentes y la determinación de las posiciones que ocupan.
- Determinación del peso molecular.

#### 2.3.1. Análisis de azúcares.

La identificación de los monosacáridos que componen un polisacárido o un oligosacárido requiere previamente una despolimerización total del mismo. Esta se lleva a cabo mediante hidrólisis, metanólisis o acetólisis. La posterior determinación cuantitativa de los monosacáridos constituyentes, se realiza principalmente mediante Cromatografía Gas-Líquido seguida de Espectrometría de Masas (CGL-EM).

La aplicación de la CGL-EM en el análisis de azúcares está ampliamente extendida ya que se necesita poca cantidad de muestra y su preparación es relativamente sencilla. Esta técnica requiere transformar los monosacáridos procedentes de la despolimerización total, en derivados volátiles tales como los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, acetatos de alditoles, trifluoroacetatos, etc. En esta tesis, se utilizan los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos obtenidos en la metanólisis de los oligosacáridos.<sup>42</sup>

##### 2.3.1.1. Formación de *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos.

La preparación de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, tiene la ventaja de que permite la identificación simultánea de azúcares neutros, aminoazúcares y ácidos urónicos. Durante este proceso se produce la desacetilación parcial de los

aminoazúcares, por lo después de la metanólisis, es necesario proceder a la reacetilación de la glucosamina (Figura 2.2).

#### *A) Metanólisis seguida de N-acetilación.*

La fracción procedente de HPLC se despolimeriza mediante metanólisis obteniéndose los metil glicósidos. A la muestra (30-80 µg) disuelta en acetonitrilo:agua al 45%, se le añade *myo*-inositol (patrón interno) (3-6 µg) y se liofiliza. Al liofilizado se añade HCl/MeOH 0,625 M (0,5 ml), se calienta a 80 °C durante 16 h y se seca bajo corriente de nitrógeno.

Al residuo seco procedente de la metanólisis se le añade metanol (750 µl), piridina (75 µl) y anhídrido acético (75 µl) y se agita. Se mantiene 15 min a temperatura ambiente y se seca bajo corriente de nitrógeno.

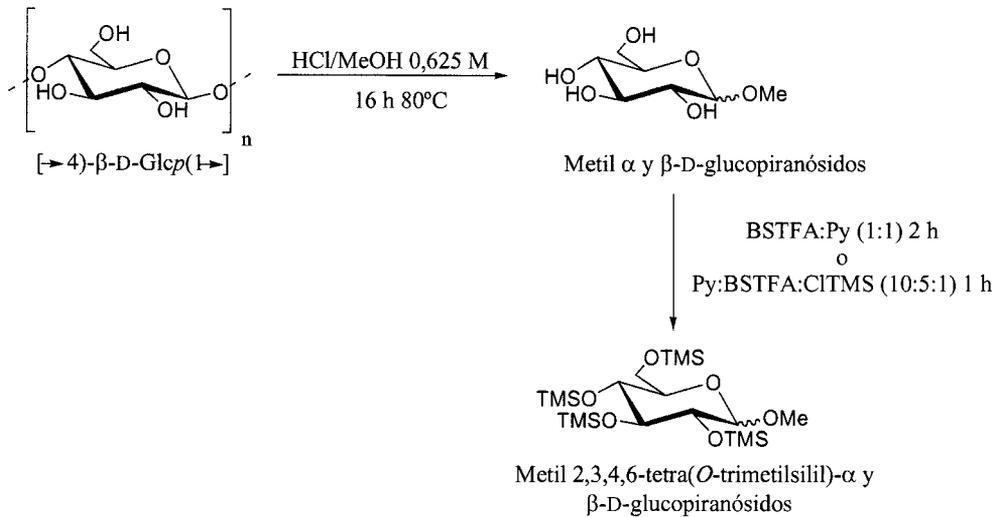
#### *B) Trimetilsililación.*

Durante el transcurso de esta tesis se han empleado indistintamente dos procedimientos. El primero es el descrito por Chaplin.<sup>42</sup> Según este método, se añade al residuo seco obtenido, bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (400 µl, BSTFA, Supelco, Inc.) y piridina (1:1) (400 µl) y se mantiene 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Se seca bajo corriente de nitrógeno, se disuelve en hexano y se inyecta en el cromatógrafo de gases.

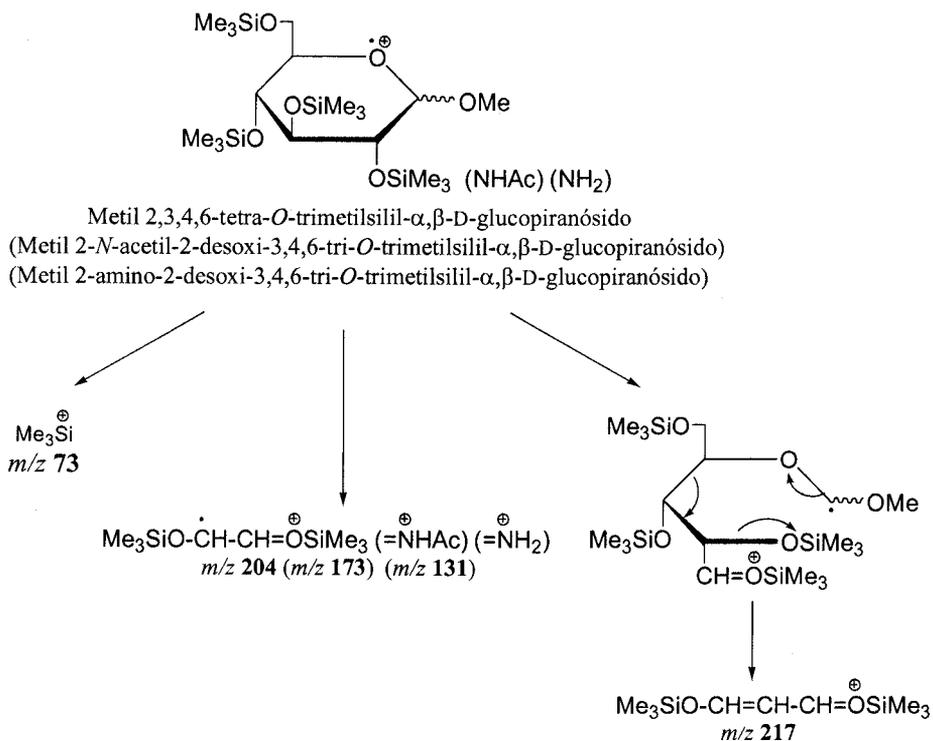
El segundo es una modificación del método anterior, que tiene como ventaja un tiempo de preparación más corto. Consiste en añadir al residuo seco procedente de la metanólisis o de la reacetilación una disolución de Py:BSTFA:TMSCl (10:5:1) (100 µl). La mezcla se deja, al menos, una hora en la oscuridad. Por último, se seca bajo corriente de nitrógeno, se disuelve en hexano y se inyecta en el cromatógrafo de gases.

### **2.3.1.2. Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas (CGL-EM).**

Los derivados sililados de los metil glicósidos se analizan por cromatografía de gases seguida de Espectrometría de Masas.<sup>43,44</sup> Los espectros de masas de estos compuestos son muy característicos, dando fundamentalmente los iones de *m/z* 204 y *m/z* 217 para los azúcares neutros. En el caso de aminoazúcares, los fragmentos más característicos son los de *m/z* 131, ó *m/z* 173 si se ha reacetilado después de la metanólisis.<sup>45</sup> El esquema de fragmentación se muestra en la Figura 2.3.



**Figura 2.2.** Formación de los *O*-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos procedentes de un polisacárido.



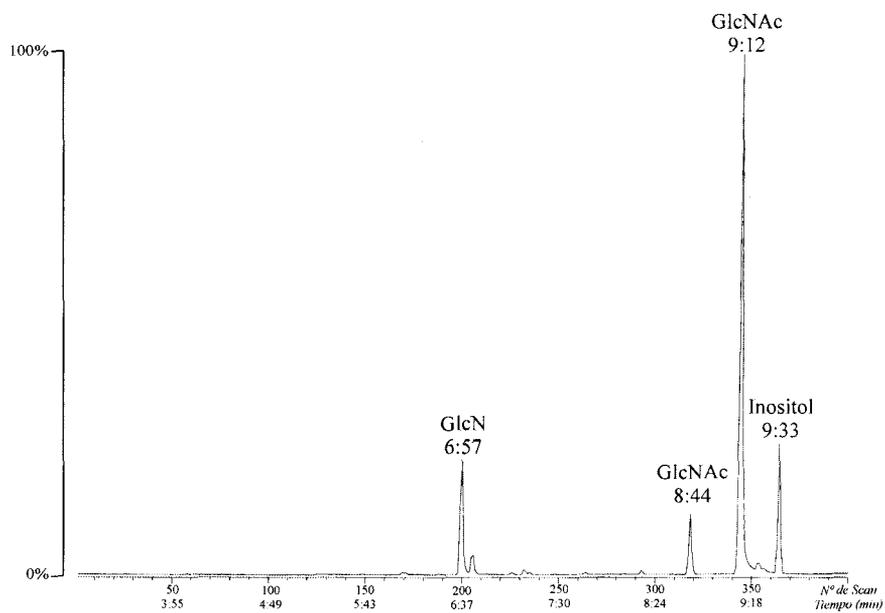
**Figura 2.3.** Fragmentaciones características de los *O*-trimetilsilil derivados de los metil glicósidos de la D-glucosa, *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina.

La identificación se realiza por comparación con los cromatogramas obtenidos para muestras patrones. Los patrones utilizados y sus tiempos de retención se detallan en la Tabla 2.1.

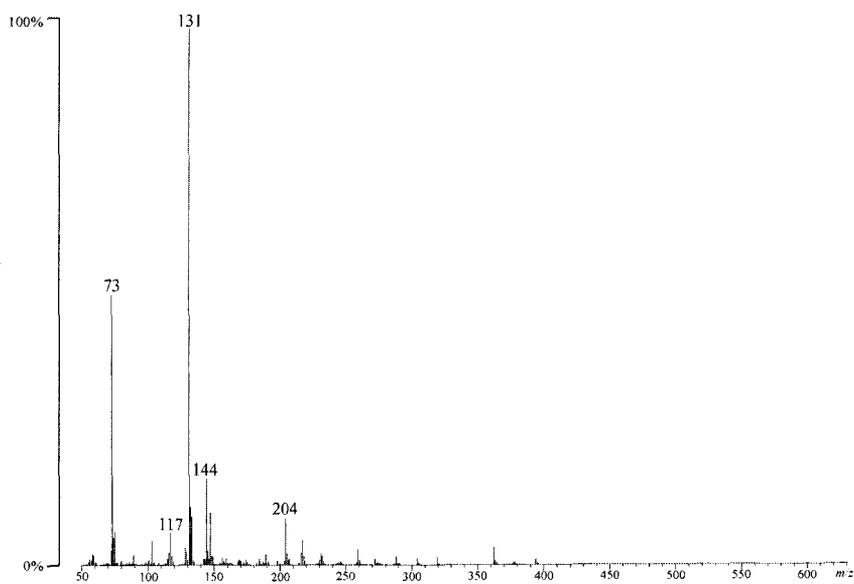
Azúcar	Nº de barrido	$t_R$	$t_{RR}^a$	Áreas relativas
D-Ribosa	53	3:57	0,413	0,86
	60	4:05	0,427	0,12
	107	4:56	0,516	0,02
D-Manosa	181	6:15	0,653	-
D-Glucosa	237	7:16	0,760	0,72
	250	7:30	0,784	0,28
Ácido D-galacturónico	155	5:47	0,605	0,25
	178	6:12	0,648	0,06
	215	6:52	0,718	0,53
	220	6:58	0,728	0,16
L-Fucosa	61	4:06	0,429	0,06
	74	4:20	0,453	0,61
	86	4:33	0,476	0,33
D-Galactosa	184	6:19	0,660	0,07
	204	6:40	0,697	0,73
	223	7:01	0,733	0,20
Ácido D-glucurónico	147	5:39	0,591	0,23
	241	7:20	0,767	0,13
	245	7:25	0,775	0,64
N-Acetil-D-glucosamina	381	8:47	0,918	0,12
	410	9:15	0,969	0,88

<sup>a</sup> tiempo de retención relativo ( $t_R/t_R^0$ ) al 1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-trimetilsilil *myo*-inositol ( $t_R^0=9:34$  min).

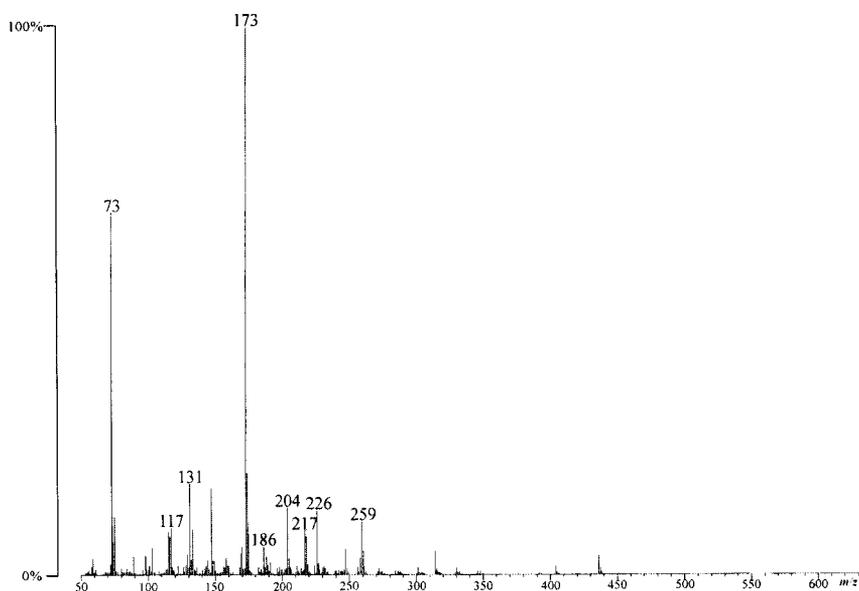
**Tabla 2.1.** Datos de CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos de algunos monosacáridos.



**Figura 2.4.** Cromatograma CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos de D-acetilglucosamina parcialmente acetilada.



**Figura 2.5.** Espectro de masas del pico a  $t_R = 6:57$  min perteneciente a la D-glucosamina



**Figura 2.6.** Espectro de masas del pico de  $t_R = 9:12$  min perteneciente a la *N*-acetilglucosamina.

### 2.3.1.3. Instrumentación y condiciones cromatográficas

Se utiliza un cromatógrafo de gases FISIONS GC-8000 Series equipado con una columna OV-1 (25 m x 0,25 mm) y conectado a un espectrómetro de masas Micromass AutoSpec-Q. Se utiliza un gradiente de temperatura de 10 °C/min desde una temperatura inicial de 150°C (2min) hasta una temperatura final de 250 °C (30 min). El potencial de ionización en todos los casos es de 70 eV.

### 2.3.2. Determinación de la configuración absoluta de los azúcares.

En el estudio estructural de polisacáridos u oligosacáridos, las configuraciones absolutas de los monosacáridos constituyentes eran determinadas normalmente por la medida de poder rotatorio o mediante la acción de enzimas específicas.

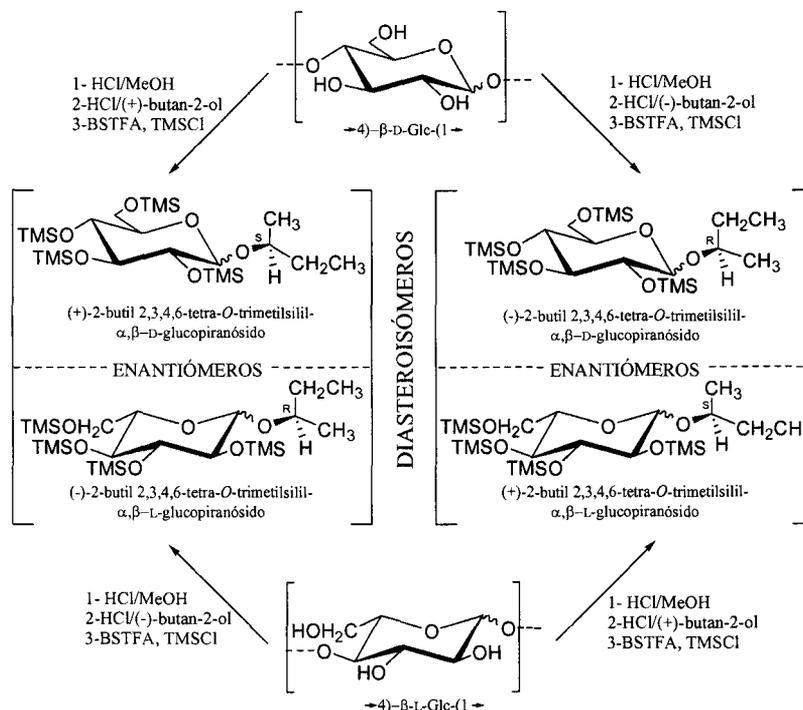
El primer método requiere el aislamiento de monosacáridos muy puros y en una cantidad mínima que oscila entre 10-20 mg. El segundo método tiene el inconveniente de que las enzimas específicas necesarias no siempre son asequibles.

Actualmente se utiliza la cromatografía de gases en la determinación de la configuración absoluta de azúcares, llevándose a cabo mediante el uso de dos métodos alternativos:

- Cromatografía de gases empleando una fase estacionaria quiral.
- Conversión de los enantiómeros en derivados diastereoisoméricos mediante un reactivo quiral y posterior separación en cromatografía de gases utilizando una fase estacionaria aquiral.<sup>46,47</sup>

Este último método se basa en la formación de los *O*-trimetilsililderivados de los (+)-2-butil glicósidos correspondientes a los enantiómeros D o L de los monosacáridos. La formación de estos derivados se muestra en la Figura 2.7. Los glicósidos se forman por reacción de los monosacáridos patrones (D o L) con un alcohol ópticamente activo, en este caso (+)-butan-2-ol. Cuando no se dispone de ambos enantiómeros patrones y en el caso de la muestra problema, la reacción se lleva a cabo usando (+)-butan-2-ol y (±)-butan-2-ol. En el caso del alcohol racémico se forman los diastereoisómeros (+)-2-butil D-glicósidos y (-)-2-butil D-glicósidos; este último es el enantiómero del (+)-2-butil L-glicósido y, por tanto, posee sus mismas propiedades cromatográficas. Las relaciones estereoisoméricas entre los distintos derivados se muestran en la Figura 2.7.

La identificación se realiza por comparación de los tiempos de retención de los derivados diastereoisoméricos procedentes de los monosacáridos patrones, con los que se obtienen para la muestra problema.



**Figura 2.7.** Formación de 2-butil glicósidos utilizados en la determinación de la configuración absoluta de los monosacáridos y sus relaciones estereoisoméricas.

### 2.3.2.1. Formación de los 2-butil glicósidos.

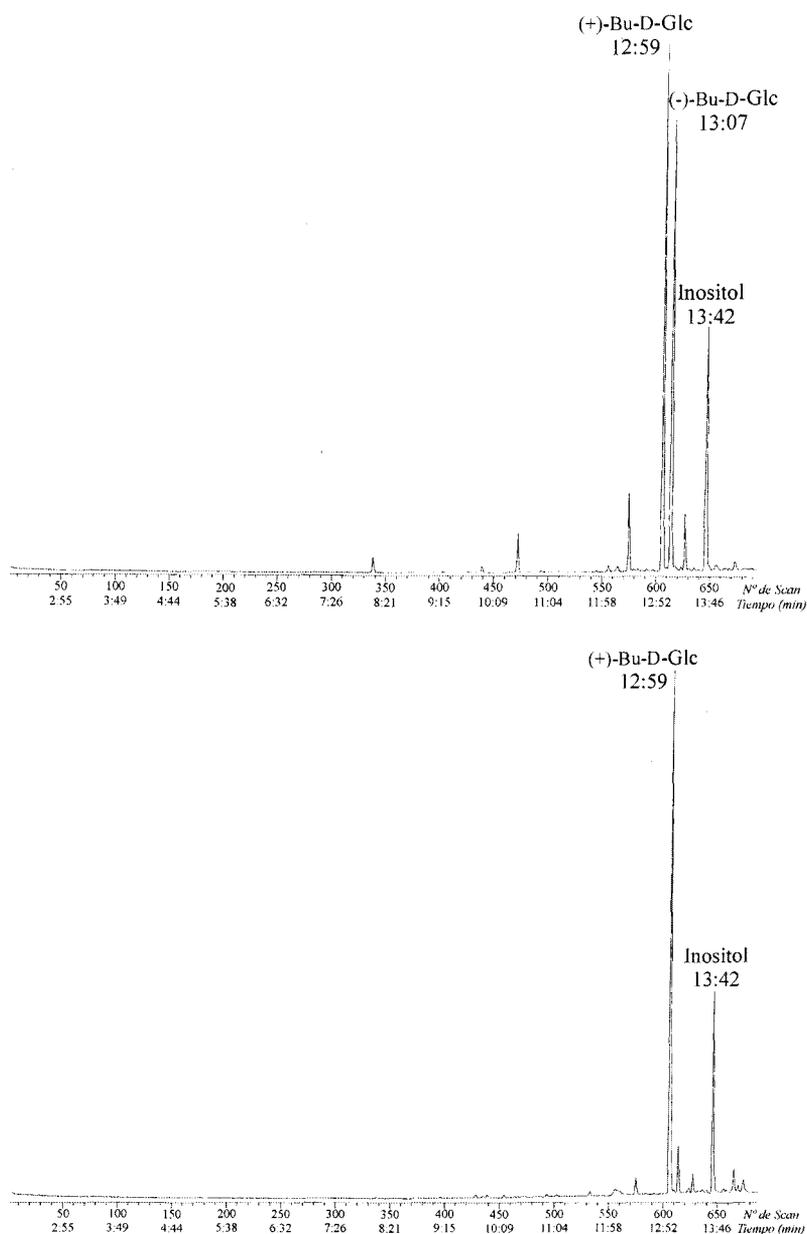
#### Metanólisis seguida de butanólisis.

La muestra liofilizada (30-60 µg para monosacáridos patrones, 60-100 µg para muestras problemas) se somete a metanólisis como se describe en el apartado 2.3.1.1, y, a continuación, el residuo seco se disuelve en HCl / (+)-butan-2-ol 0,625 M (500 µl) o HCl / (±)-butan-2-ol (1 ml) y se calienta 16 h a 80 °C. Transcurrido este tiempo el alcohol se evapora bajo corriente de nitrógeno y se procede a la sililación del residuo seco de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.3.1.1. Por último, se evapora a sequedad, se disuelve en hexano y se inyecta en el cromatógrafo de gases.

### 2.3.2.2. Instrumentación y condiciones cromatográfica (CGL-EM).

Se utiliza el cromatógrafo descrito en el apartado 2.3.1.1. Las condiciones cromatográficas son: 130 °C durante 3 min seguido de un gradiente de temperatura de

3 °C por minuto hasta 150 °C y nuevo gradiente de temperatura de 10 °C por minuto hasta 250 °C, temperatura que se mantiene durante 30 min. El potencial de ionización es de 70 eV.



**Figura 2.8.** CGL-EM de los 2,3,4,6-tetra-O-trimetilsililderivados de los (+) y (-)-2-butil glicósidos de D-glucosa

Azúcar	$t_R$ (min)	$t_{RR}^a$
D-GlcNAc	19:46	1,026
L-GlcNAc	19:56	1,034

<sup>a</sup> Tiempo de retención relativo ( $t_R/t_R^0$ ) al 1,2,3,4,5,6-hexa-O-trimetilsilil-*myo*-inositol (19:16 min)

**Tabla 2.2.** Datos de CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los butil glicósidos de *N*-acetilglucosamina.

### 2.3.3. Determinación del tipo de sustitución. Análisis por metilación.

El análisis por metilación es uno de los métodos más antiguos utilizados en la determinación estructural de polisacáridos y oligosacáridos. Consiste en la eterificación completa de los grupos hidroxilos libres de los azúcares del polisacárido, es decir, aquellos que no están implicados en la formación del anillo, no llevan sustituyentes estables en el medio básico de reacción y no participan en los enlaces glicosídicos.<sup>48,49</sup> Dichos enlaces glicosídicos son estables en las condiciones fuertemente básicas requeridas durante el proceso de metilación.

El polisacárido permetilado se despolimeriza obteniéndose azúcares parcialmente metilados que se analizan por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CGL-EM). La identificación de los azúcares parcialmente metilados, proporciona información detallada de las unidades estructurales del polisacárido, pero no de la secuencia ni la naturaleza anomérica ( $\alpha$  o  $\beta$ ) de los enlaces.

#### 2.3.3.1. Metilación del azúcar.

La metilación total del polisacárido depende del grado de ionización de los hidroxilos libres, por lo tanto, es fundamental efectuar la reacción en un medio suficientemente básico para conseguir que dichos grupos hidroxilos se transformen completamente en alcóxidos. La adición del agente alquilante conduce a la eterificación total. El polisacárido debe estar completamente disuelto en el medio de reacción por lo que el disolvente ha de ser cuidadosamente elegido.

Existe una gran variedad de métodos de metilación de oligosacáridos y polisacáridos. Los más utilizados son:

- Método de Purdie e Irvine:<sup>50</sup> Utiliza yoduro de metilo y óxido de plata.
- Método de Haworth:<sup>51</sup> Emplea sulfato de dimetilo en hidróxido sódico acuoso.
- Método de Kuhn y col.:<sup>52</sup> Emplea N,N-dimetilformamida o dimetilsulfóxido y yoduro de metilo.
- Método de Hakomori:<sup>53</sup> Utiliza yoduro de metilo y metilsulfinilmetanuro sódico y, como disolvente, dimetilsulfóxido.
- Método de Ciucanu y Kerek:<sup>54</sup> Emplea yoduro de metilo e hidróxido sódico en dimetilsulfóxido.

Estos dos últimos métodos son los más utilizados actualmente. En esta tesis se emplea una modificación del método de Ciucanu y Kerek:

El azúcar (100-200 $\mu$ g) se disuelve en DMSO seco (300-500  $\mu$ l) y se añade NaOH pulverizada (50-70  $\mu$ g). A continuación se añade CH<sub>3</sub>I (100 $\mu$ l) y se agita durante 15 min. Transcurrido este tiempo se repite la adición de CH<sub>3</sub>I y se agita de nuevo durante 15 min. Por último, se añade doble cantidad de CH<sub>3</sub>I y se agita durante 30 min. La reacción se detiene mediante la adición de 1 ml de una disolución de tiosulfato sódico en agua (100 mg/ml).

La purificación de la muestra procedente del paso anterior se puede llevar a cabo de varias formas, dependiendo de la naturaleza de dicha muestra. En el caso de monosacáridos y oligosacáridos el método es el siguiente:<sup>55,56</sup> La mezcla de reacción se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,2-1 ml, 4 veces) y las fases orgánicas se lavan con agua (3 ml, 4 veces) y se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve en DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1) (200  $\mu$ l) y se pasa con un flujo de 1-2 gotas por segundo a través de una microcolumna Sep-Pak C<sub>18</sub> (300 mg, Sep-Cartridge C-18, Lida Manufacturing Corp.) previamente lavada con etanol absoluto (40-50 ml), acetonitrilo (2 ml) y agua (4 ml). Las sustancias más polares de la mezcla de reacción, como el DMSO y el NaI, son eluidos de la columna con agua (2 ml, 4 veces). Los compuestos menos polares son eluidos utilizando dos tipos de mezcla: **A** [acetonitrilo: agua, 3:17] y **B** [acetonitrilo:agua, 1:4]. En la purificación de disacáridos, se utiliza sólo el eluyente **A** (cuatro lavados de 2 ml). En los oligosacáridos de grado de polimerización entre 3 y 10 se emplea de eluyente **A** (2 ml, 3 veces) seguido del **B** (2 ml).

El azúcar permetilado purificado se eluye de la microcolumna con acetonitrilo (2 ml). Los eluatos se concentran a sequedad.

### **2.3.3.2. Preparación de los acetatos de alditoles parcialmente metilados.**

El polisacárido u oligosacárido permetilado se hidroliza para obtener azúcares parcialmente metilados, que se convierten en sus correspondientes acetatos de alditoles parcialmente metilados<sup>57</sup> para su análisis por CGL-EM.

La despolimerización puede efectuarse por hidrólisis ácida o metanólisis. Los polisacáridos permetilados no son solubles en disolventes acuosos, por ello la hidrólisis conviene realizarla en primer lugar con un ácido orgánico y luego completarla con un ácido acuoso.

#### *A) Hidrólisis y reducción del azúcar permetilado.*

El azúcar, una vez purificado, se disuelve en ácido fórmico al 88% (0,2-1 ml) y se calienta a 100 °C durante 1h.<sup>58</sup> El ácido se evapora a presión reducida hasta sequedad y se añade ácido trifluoroacético (TFA) 2 M (0,2- 1 ml) al residuo seco, que se calienta a 121 °C durante 1 h y 30 min. El TFA se elimina por coevaporación con metanol (1 ml, 5 veces). El residuo seco se disuelve en NH<sub>4</sub>OH 1M (10-100 µl), se añade NaBH<sub>4</sub> 0,3 M en DMSO (0,1-1 ml) y se calienta durante 1 h y 30 min a 40 °C.<sup>59</sup> Al cabo de este tiempo, la reacción se detiene por adición de ácido acético glacial (10-100 µl).

#### *B) Acetilación.*

Al azúcar reducido se le añade 1-metilimidazol (20-200 µl) y Ac<sub>2</sub>O (0,2-2 ml), se agita fuertemente y se mantiene 10 min a temperatura ambiente. A continuación se añade agua fría (2 ml) y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,2-1 ml, 4 veces). Las fases orgánicas se lavan con agua (3 ml, 4 veces), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora a sequedad. Se disuelve en diclorometano y se inyecta en el cromatógrafo de gases para su estudio.

En la Figura 2.9 se muestra un esquema del análisis por metilación de un polisacárido.

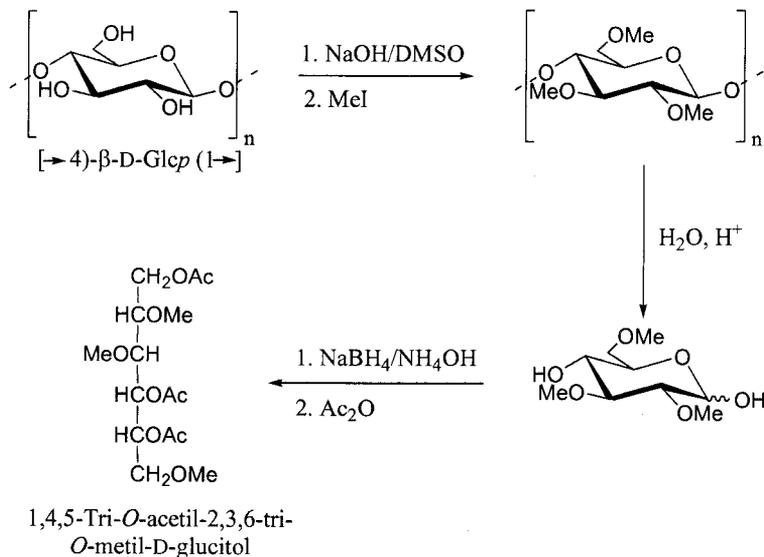


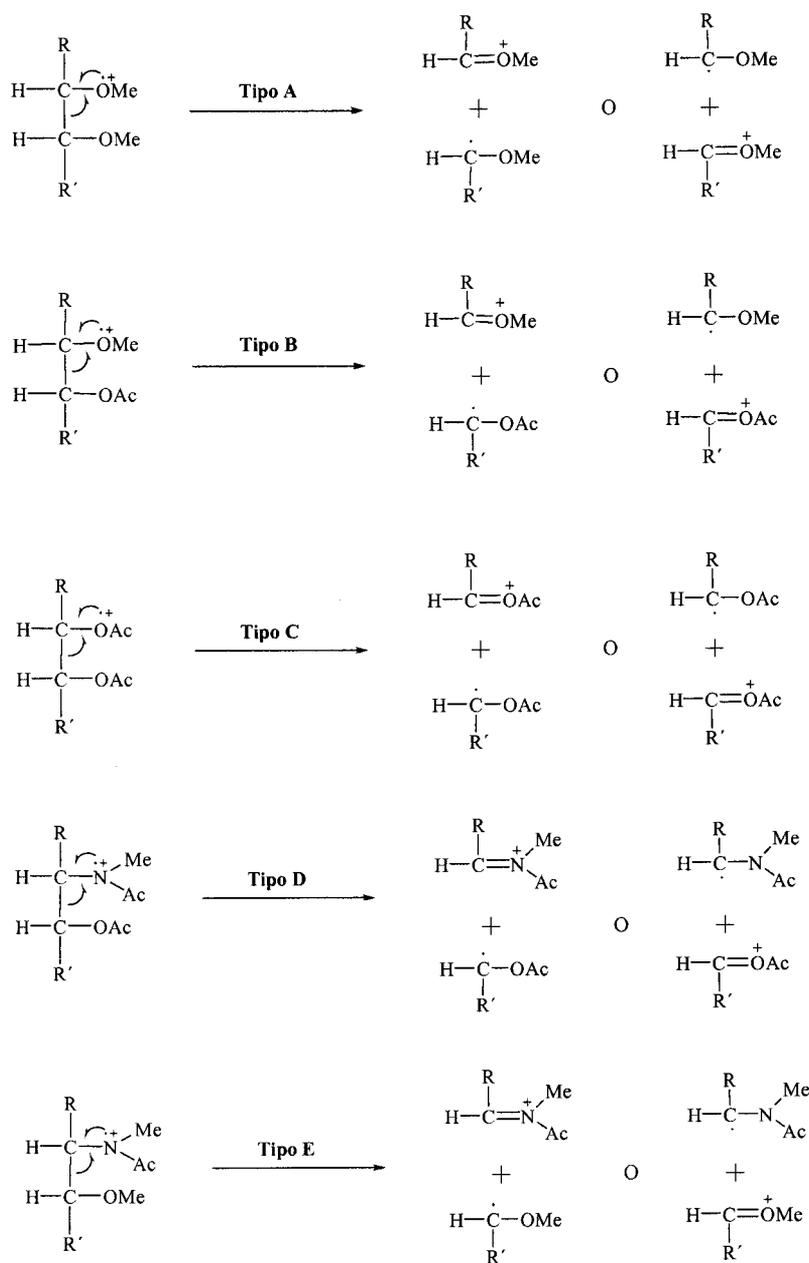
Figura 2.9. Análisis por metilación de un polisacárido.

### 2.3.3.3. Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas de los monosacáridos parcialmente metilados.

Los espectros de masas de estos compuestos son ampliamente conocidos.<sup>57,60,61</sup> Están realizados por el método del impacto electrónico y raramente aparecen los iones moleculares. Se propone que la fragmentación obedece a las siguientes reglas:

- 1) Los fragmentos primarios se originan por rotura de enlace C-C de la cadena del alditol, tal y como se formula en el esquema de fragmentación de la Figura 2.10.
- 2) La rotura entre dos carbonos que contienen un grupo metoxilo (tipo A) o un grupo metilacetamido (en el caso de aminoazúcares) y un grupo metoxilo (tipo E) está más favorecida que la rotura que se da entre un carbono con un grupo metoxilo o metilacetamido y otro con un grupo acetilo (tipo B o D, respectivamente). Ésta, a su vez, está más favorecida que la rotura entre dos carbonos con grupos acetilos (tipo C). Los fragmentos resultantes de la rotura del tipo A proporcionan señales intensas. En el caso de los resultantes de una rotura del tipo B, sólo aquellos fragmentos con carga en el grupo metoxilo producen señales intensas. Los del tipo C dan lugar a señales de poca intensidad.

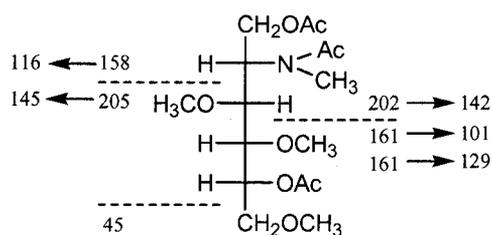
- 3) Los fragmentos secundarios proceden de los fragmentos primarios por pérdidas de ácido acético, cetana, metanol o formaldehído.



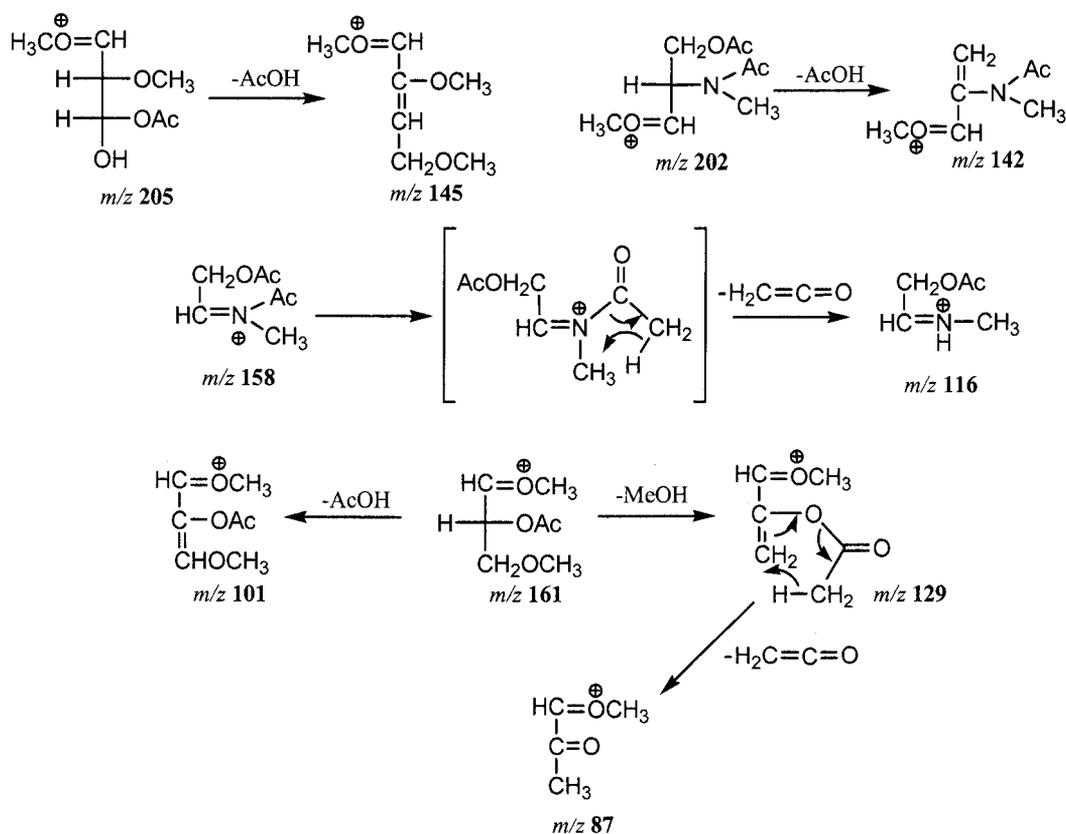
**Figura 2.10.** Fragmentos primarios formados por rotura de la cadena de un acetato de alditol parcialmente metilado.

Todas estas fragmentaciones están recogidas por Lindberg y col.<sup>61</sup> En el esquema de fragmentación presentado en la Figura 2.11 se recogen las que tienen lugar en el caso del 1,5-di-*O*-acetil-2-desoxi-2-(*N*-metilacetamido)-3,4,6-tri-*O*-metil glucitol.

### Fragmentos Primarios



### Fragmentos Secundarios



**Figura 2.11.** Esquema de fragmentación del 1,5-di-*O*-acetil-2-desoxi-2-(*N*-metilacetamido)-3,4,6-tri-*O*-metil glucitol.

#### **2.3.3.4. Instrumentación y condiciones cromatográficas.**

Se utilizan el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas descritos anteriormente. El programa de temperatura es isoterma a 120 °C durante un minuto seguido de un gradiente de temperatura de 8 °C/min hasta una temperatura final de 250 °C (30 min). El potencial de ionización es de 70 eV.

La identificación se lleva a cabo por comparación de los espectros de masas obtenidos con los descritos en la bibliografía.<sup>61</sup>

#### **2.3.4. Sustituyentes presentes en el azúcar: Ácidos grasos.**

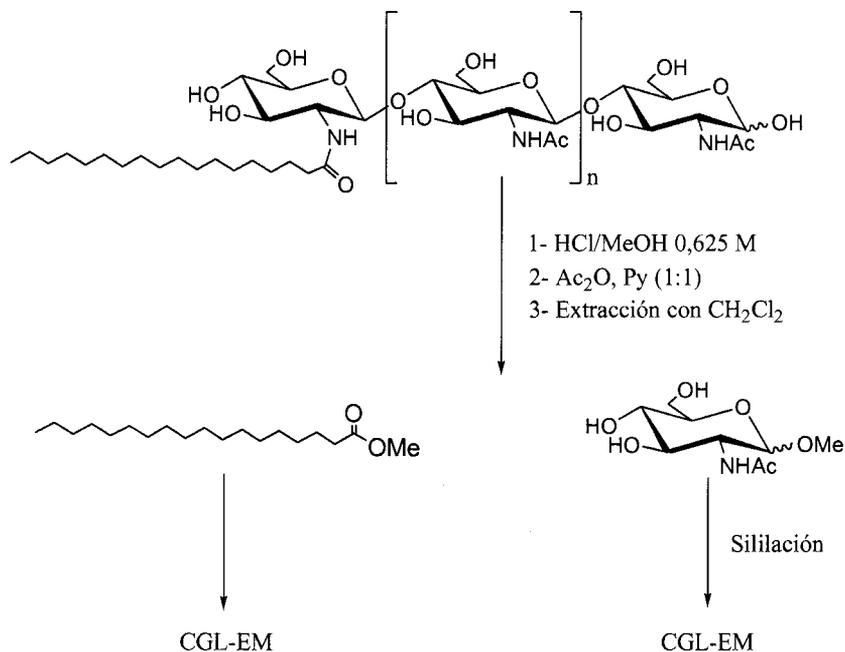
Las moléculas de reconocimiento producidas por bacterias del género *Rhizobiaceae* se encuentran *N*-aciladas en su terminal no reductor por un ácido graso de naturaleza variable. Estos ácidos grasos pueden ser saturados, insaturados y/o hidroxilados.

En esta tesis, la identificación de los ácidos grasos se realiza por CGL-EM de los correspondientes ésteres metílicos<sup>62</sup> o bien a través de derivados de éstos. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos insaturados son convertidos en sus bis-(metiltio) derivados<sup>63</sup> con el objeto de localizar la posición de los dobles enlaces. Los ésteres metílicos de los hidroxiácidos son sililados y posteriormente identificados por CGL-EM.

##### **2.3.4.1. Identificación de los ácidos grasos saturados.**

Se analizan mediante la formación de los correspondientes ésteres metílicos.<sup>63</sup> Para ello, la muestra (200-400 µg) se disuelve en HCl/MeOH 0.625 M (0.5 ml) y se calienta 16 h a 80 °C. Se deja enfriar y se seca bajo corriente de nitrógeno. El residuo seco se redissuelve en agua milliQ (1 ml) y se extraen los ácidos grasos esterificados con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml, 3 veces).

La fase orgánica se lava con agua (1 ml, 2 veces), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora a sequedad. Por último, se disuelve en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se inyecta en el cromatógrafo de gases (Figura 2.12).

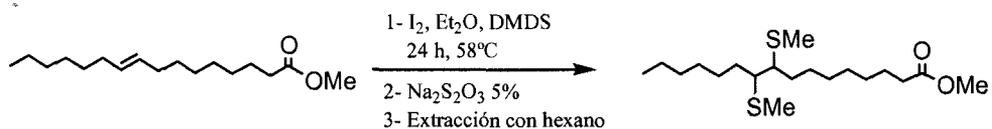


**Figura 2.12.** Aislamiento e identificación de azúcares y ácidos grasos de los factores de nodulación.

#### 2.3.4.2. Identificación de los ácidos grasos insaturados.

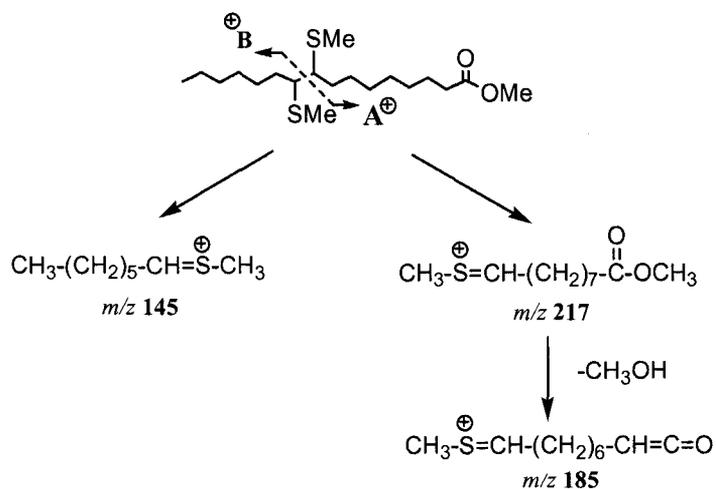
Con objeto de identificar la posición del doble enlace, y dado que los espectros de masas son prácticamente idénticos cualquiera que sea la posición de éste, se preparan los bis-(metiltio) derivados del éster metílico del ácido graso insaturado.<sup>63</sup>

La muestra con los ácidos grasos esterificados y aislados según el apartado 2.3.4.1, se disuelve en hexano (1 ml) y se añade I<sub>2</sub> (7,25 mg) en éter (100 µl). Se agrega disulfuro de dimetilo (DMDS) (1 ml) y la disolución se calienta en baño de glicerina durante 24 horas a 58 °C. Se añade a continuación una disolución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 5 % (1,5 ml) con objeto de destruir el exceso de I<sub>2</sub> y se agita vigorosamente hasta decoloración. La fase orgánica se extrae con hexano (1,5 ml, 3 veces) y se seca bajo corriente de nitrógeno. Se analiza por CGL-EM. El esquema de reacción para el éster metílico del ácido 9-hexadecanoico se muestra en la Figura 2.13.



**Figura 2.13.** Transformación de un ácido graso insaturado en su bis-(metiltio) derivado para su posterior análisis por CGL-EM

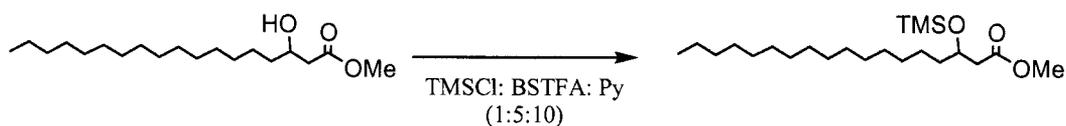
El esquema de fragmentación característico del bis-(metiltio) derivado del metil éster del ácido 9-hexadecanoico se muestra en la Figura 2.14:



**Figura 2.14.** Esquema de fragmentación del bis-(metiltio) derivado del éster metílico correspondiente al ácido palmitoleico (C<sub>16:1Δ9</sub>)

### 2.3.4.3. Identificación de los ácidos grasos hidroxilados.

Los ácidos grasos esterificados, aislados según apartado 2.3.4.1, se sililan siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.3.1.1. La formación de un *O*-trimetilsililderivado del metil éster de un ácido graso hidroxilado se muestra en la Figura 2.15:



**Figura 2.15.** Formación de un *O*-trimetilsililderivado del metil éster de un  $\beta$ -hidroxiácido.

#### 2.3.4.4. Instrumentación y condiciones cromatográficas

Se utiliza un cromatógrafo de gases FISONs GC-8000 Series equipado con una columna OV-1 (25 m x 0,25 mm) y conectado a un espectrómetro de masas Micromass AutoSpec-Q. Se utiliza un gradiente de temperatura de 10 °C/min desde una temperatura inicial de 100°C (2min) hasta una temperatura final de 280°C (30 min). El potencial de ionización en todos los casos es de 70 eV.

#### 2.3.5. Determinación del peso molecular. Espectrometría de Masas.

En la determinación del peso molecular de una sustancia, la elección de la técnica más adecuada está en función de dicho peso. Así, para moléculas pequeñas o de tamaño medio es posible utilizar la Espectrometría de Masas (FAB, MALDI-TOF, Electrospray...) y obtener resultados muy precisos, mientras que para sustancias de alto peso molecular, como por ejemplo polisacáridos, hay que recurrir a técnicas menos precisas (cromatografía de filtración sobre gel, electroforesis...)

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica que separa y detecta iones formados en la fuente de ionización en función de la relación masa/carga ( $m/z$ ). Existen varias técnicas de ionización: química (CI), impacto electrónico (EI), así como otras denominadas de "ionización blanda" (FAB, MALDI o Electrospray) que se describirán más adelante; y diferentes analizadores de masas (cuadrupolo, tiempo de vuelo, sector magnético...). La combinación de diferentes fuentes y analizadores, originan diferentes configuraciones de los espectrómetros de masas.

La Espectrometría de Masas es en un instrumento muy importante para el análisis estructural de las moléculas de reconocimiento, objeto de esta tesis. Hasta hace relativamente poco, se venía empleando el FAB o LSIMS obteniéndose buenos resultados, ahora con el desarrollo de nuevas técnicas de ionización, más sensibles y suaves, como la ionización por electrospray (ES) o la desorción/ionización con láser

asistida por matriz (MALDI), se han conseguido mejores resultados al poder utilizarse en moléculas orgánicas complejas de peso molecular entre unos pocos miles y varios cientos de miles de Daltons.

En esta tesis se han empleado las siguientes técnicas de Espectrometría de Masas para el análisis de los factores de nodulación: FAB, LSIMS, MALDI-TOF, ES-Q-o-TOF y MALDI-Q-o-TOF así como técnicas de Espectrometría de Masas en tándem: CID ES-Q-o-TOF y CID MALDI-Q-o-TOF.

### 2.3.5.1. Fuentes de Ionización.

#### 2.3.5.1.1. Bombardeo con átomos rápidos. FAB y LSIMS.

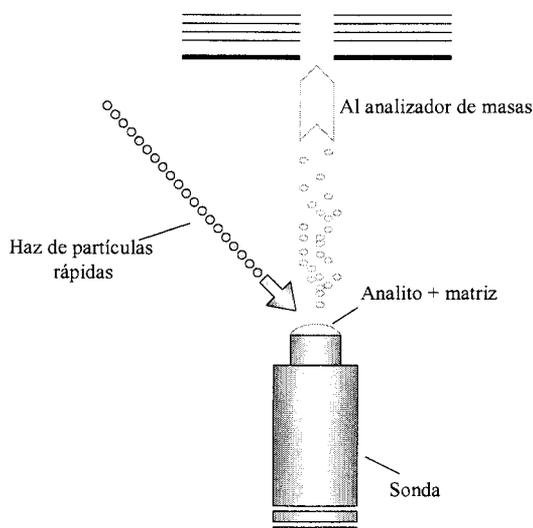
Esta técnica, introducida por primera vez en 1980, fue desarrollada como un nuevo procedimiento de ionización para el análisis de sustancias no volátiles. En el transcurso de un año, la nueva técnica, que se llamó FAB (*fast atom bombardment*) revolucionó los estudios de Espectrometría de Masas de biopolímeros.

El siguiente paso fue acoplar la fuente de FAB a los espectrómetros de masas de alta resolución que ya se habían desarrollado. Se consiguió analizar moléculas con mayor peso molecular que las que hasta entonces se habían estudiado siguiendo las técnicas normales de ionización. La superioridad de esta técnica con respecto a otras, como la CI o EI, quedó demostrada a través de los datos obtenidos para un polisacárido bacteriano compuesto por unidades de *O*-metil-D-glucosa en los que se ponía de manifiesto la utilidad del FAB en el cálculo del peso molecular del mismo.

El fundamento de esta técnica es el siguiente:

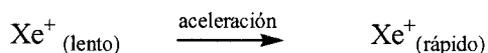
Al bombardear la superficie de un líquido, colocado sobre el extremo de una sonda, con un haz de átomos rápidos, se produce la desorción de iones característicos del líquido. Si disolvemos la muestra problema en un disolvente o matriz, el bombardeo produce iones moleculares o pseudomoleculares positivos y negativos de la muestra y de la matriz (Figura 2.16).

Aunque el FAB está considerado como una técnica de ionización “blanda”, a menudo puede producir fragmentación. El espectro de masas de FAB se caracteriza por la presencia de un intenso ión pseudomolecular, algunas veces acompañado por iones-fragmento de baja intensidad, superpuestos sobre ruido de fondo relativamente intenso.



**Figura 2.16.** Representación esquemática de una fuente de Ionización de FAB o LSIMS.

El bombardeo con átomos rápidos suele hacerse con un gas inerte para evitar cualquier reactividad no deseada con la muestra. Se utilizan He, Ar o Xe. Para la generación de átomos rápidos, el gas inerte se introduce en una cavidad donde es parcialmente ionizado por bombardeo electrónico, de modo que se forman iones positivos que son inmediatamente acelerados por campos electromagnéticos con potenciales de 2 a 10 KV. La disposición de los campos magnéticos en la fuente de ionización permite que se forme un plasma confinado, con un movimiento resonante que favorece las colisiones entre iones acelerados y átomos neutros lentos; las colisiones dan lugar a intercambios de carga, originándose así átomos neutros rápidos que escapan del cañón a través de una fina abertura. Los iones residuales que puedan salir de cañón acompañando a los átomos rápidos son eliminados por medio de placas deflectoras convenientemente situadas.



Otra técnica de ionización semejante, LSIMS (*Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*), emplea iones como haz de partículas rápidas, que inciden directamente sobre la muestra mezclada con la matriz. Estos iones suelen ser de  $\text{Cs}^+$ , que son acelerados por campos electromagnéticos con potenciales de 35 KV. El cesio tiene una masa atómica similar al xenón ( $\text{Cs}=139$ ,  $\text{Xe}=131$ ), y su coste es notablemente inferior.<sup>64</sup>

El disolvente que se emplea como matriz debe tener un alto punto de ebullición para que su presión de vapor en las condiciones de alto vacío sea muy baja. Los disolventes más usados son, entre otros, glicerol, 1-tioglicerol y alcohol 3-nitrobencílico. El glicerol es el más utilizado y es muy adecuado para compuestos polares como hidratos de carbono y glicopéptidos sin derivar. El 1-tioglicerol es el que más se utiliza en el caso de compuestos peracetilados o permetilados. Por último, puede utilizarse también mezcla de disolventes.

Para modificar la fuerza iónica de la matriz se utilizan aditivos iónicos. En el caso de los carbohidratos se emplean:

- Ácido clorhídrico diluido.
- Acetato o yoduro sódico. En el espectro se obtiene el ion pseudomolecular  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  cuando se detectan los fragmentos cargados positivamente.
- Tiocianato amónico. Aparece el ion  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  cuando se registra en el modo positivo.

Esta técnica es adecuada para el análisis de un gran número de compuestos biológicos tales como péptidos, oligosacáridos, lípidos o metabolitos endógenos.

En el campo de los polisacáridos bacterianos, la técnica de FAB ha sido aplicada fundamentalmente tanto en la determinación del peso molecular de oligosacáridos, naturales o procedentes de hidrólisis parciales de polisacáridos, como en la identificación de sustituyentes en los mismos.

#### *Aplicación de las muestras e instrumentación.*

La muestra (100-200  $\mu\text{g}$ ) se disuelve en DMSO (10  $\mu\text{l}$ ) y 1  $\mu\text{l}$  de esta disolución se mezcla con la matriz. Finalmente, la mezcla resultante se deposita en el extremo de una sonda. En el caso de los factores de nodulación estudiados en esta tesis se utilizan dos matrices:

- 1) Tioglicerol (matriz) más NaI (aditivo).

2) Glicerol:Alcohol *m*-nitrobencílico (1:1).

En los espectros de masas registrados mediante la técnica LSIMS, se utiliza un espectrómetro de masas Micromass AutoSpecQ. El bombardeo se realiza con un haz de iones Cs<sup>+</sup> con un voltaje de aceleración de 8 KV. En el caso de los experimentos de FAB, se utiliza un espectrómetro de masas Kratos MS80-RFA. El bombardeo se realiza con xenón a un voltaje acelerador de 4 KV. En ambos casos, siempre se ha registrado el espectro en modo positivo.

2.3.5.1.2. *Electrospray.*

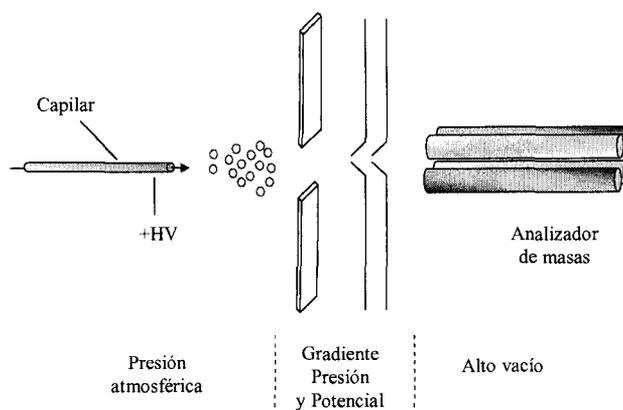
Uno de los objetivos de la Espectrometría de Masas es conseguir ionizar sin fragmentar moléculas polares termolábiles, de alto peso molecular, y luego separarlas en un espectrómetro de masas con un alto rango de masas dotado con un detector adecuado, y que posea la sensibilidad y precisión suficientes para una adecuada determinación de las masas moleculares. La búsqueda de nuevas formas de ionización más suaves llevaron al desarrollo de técnicas como Electrospray (ES) y *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* (MALDI), que han permitido la obtención de espectros de masas de especies de elevado peso molecular, tales como proteínas u oligosacáridos.<sup>65</sup>

La técnica de ionización por electrospray, ES o ESI (*Electrospray ionisation*) también puede llamarse electronebulización o electropulverización; es una técnica de Ionización a Presión Atmosférica (API) que permite detectar masas de hasta unos 200.000 Da con buena sensibilidad.

El proceso de ionización por electrospray<sup>66</sup> puede dividirse en tres etapas: 1) generación de un spray que contiene gotas altamente cargadas; 2) Disminución del tamaño de la gota y 3) Formación de iones del analito en fase gaseosa.<sup>67,68</sup>

El analito, que normalmente se encuentra disuelto en una mezcla de agua con un disolvente orgánico (metanol o acetonitrilo), se hace pasar a través de un capilar hacia la fuente de ionización con un flujo que puede oscilar entre 1 y 10 µl /min. La aplicación de un campo eléctrico intenso, normalmente de unos cuantos KV, a la salida del capilar, provoca la formación de un aerosol con gotas altamente cargadas de 1-2 µm de diámetro (cono de Taylor), la generación de estas gotas puede facilitarse por aplicación de un gas nebulizador coaxialmente al capilar. Las gotas altamente cargadas formadas deben pasar a través de un gradiente de presión y potencial en su camino al analizador de masas al

encontrarse la fuente de ionización a presión atmosférica. Un esquema de una fuente de electrospray se muestra en la Figura 2.17.

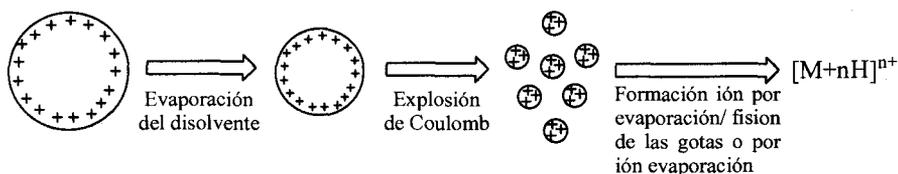


**Figura 2.17.** Representación esquemática de una fuente de electrospray

Se han postulado dos mecanismos para la formación del ion de analito a partir de las gotas cargadas. El primero propone que las gotas se reducen de tamaño por la evaporación de disolvente (ayudado por calor o por un gas de desolvatación) y/o por rotura de las mismas debido al aumento de la densidad de carga en la gota al disminuir de tamaño (explosión de Coulomb). El resultado de sucesivas evaporaciones y roturas, es una serie de iones de carga múltiple o simple.

El segundo mecanismo propuesto (modelo de ion evaporación) basado en los trabajos de Iribarne y Thompson,<sup>69,70</sup> considera que el ion de analito es “expulsado” de la gota cuando ésta es muy pequeña debido a fuerzas de repulsión entre la carga de ion y otras cargas dentro de la gota, siendo el resultado iones con carga múltiple o simple.

La Figura 2.18 muestra la formación de los iones en una fuente de electrospray.



**Figura 2.18.** Formación de iones en fuente de electrospray.

Una vez que los iones entran en la zona de interfase del espectrómetro de masas, la energía de deposición puede incrementarse por aplicación de un alto cono de voltaje para reducir la cantidad de iones con carga múltiple con respecto a iones monovalentes o para promover la fragmentación.

La optimización del proceso de electrospray y la necesidad de acoplarlo a sistemas modernos que permiten el análisis de moléculas en continuo, tales como, sistemas cromatográficos (nano-HPLC, etc.) ha permitido el desarrollo de la técnica nanoElectrospray. Con esta técnica se emplean volúmenes de analito inferiores a 1  $\mu\text{L}$  a través de un capilar de diámetro 1-2  $\mu\text{m}$ , con un flujo muy bajo que oscila de 20-30  $\text{nl}/\text{min}$ . Este flujo tan bajo permite un diámetro de gota inferior a 200  $\text{nm}$ ; este diámetro de gota inicial tan pequeño provoca que todas las moléculas de analito sean pulverizadas hacia el espectrómetro de masas sin ayuda del gas nebulizador.

Con la miniaturización del sistema de spray, se mejora la evaporación, ionización y eficiencia en la transferencia de iones hacia el analizador de masas con respecto a la fuente de ES convencional. La desolvatación se incrementa al formarse gotas más pequeñas y la eficiencia en la ionización es más alta porque la relación carga-volumen es mucho mayor que en las fuentes convencionales de ES. Además, fracciones mucho más grandes de iones se transfieren hacia el sistema de vacío dado que las gotas se evaporan más rápido y el capilar se encuentra localizado a una distancia de la interfase mucho menor (1-2  $\text{nm}$ ).

El desarrollo en muchos espectrómetros de masas de la fuente de electrospray ortogonal (Z-ES) ha hecho que esta técnica de ionización se pueda aplicar al análisis de analitos en tampones y otras matrices complejas. Los iones se extraen ortogonalmente al spray en la rendija del cono de muestra dejando que las grandes gotas, materiales no volátiles y otros compuestos no neutros se eliminen y no pasen hacia el analizador de masas (Figura 2.19).

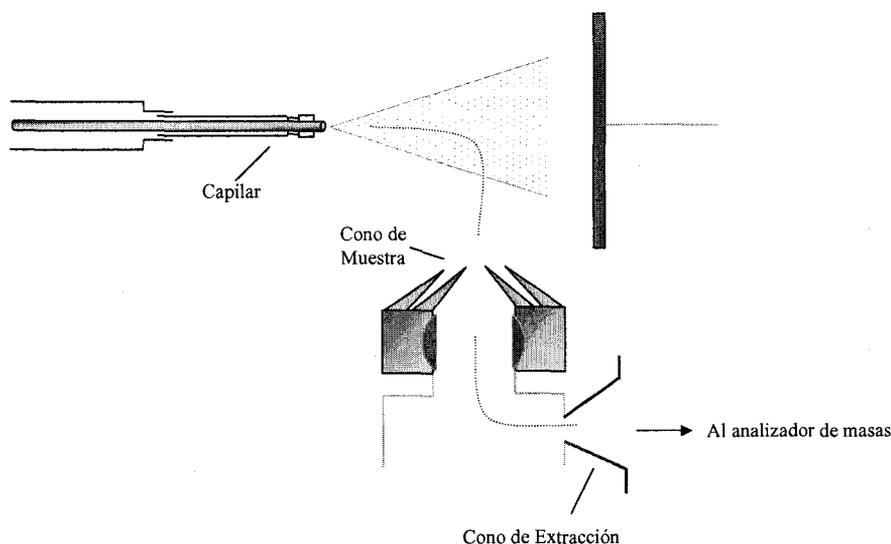


Figura 2.19. Representación esquemática de una fuente Z-ES

La ionización por electrospray, al realizarse a presión y temperatura prácticamente ambientales, es extremadamente suave, consiguiendo iones cuasi-moleculares intactos y evitando la rotura de enlaces de tipo covalente por muy débiles que sean. Otra cualidad de la ionización ES es que la formación de aductos es mínima.

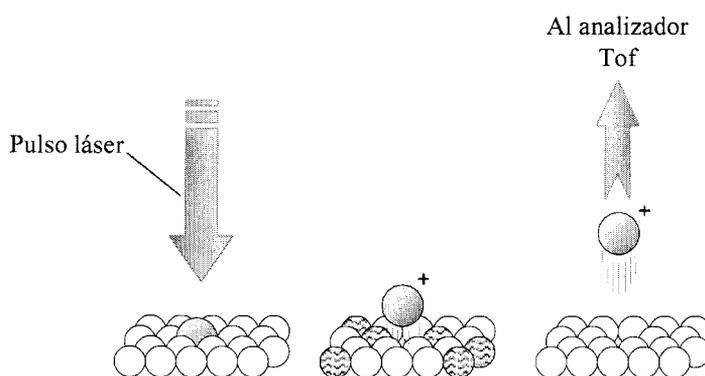
Por último, dado que la ionización por electrospray produce una enorme abundancia de iones con carga múltiple, la técnica permite determinar masas moleculares de moléculas muy grandes (iones de masas muy elevadas aparecen en el espectro a valores  $m/z$  mucho más bajos) como por ejemplo proteínas.

#### *Aplicación de las muestras e instrumentación*

Las muestras se disuelven en una disolución de acetonitrilo: agua: ácido fórmico (50:50:0,1). La disolución se introduce en la fuente de electrospray a través de un capilar de sílice con un flujo de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se aplica una diferencia de potencial al final del capilar de 3500 V, con una temperatura de 80  $^{\circ}\text{C}$ . Se utiliza un espectrómetro de masas Micromass Q-TOF, equipado con dos analizadores en tándem en disposición ortogonal (cuadrupolo y tiempo de vuelo). La fuente tiene geometría ortogonal (Z-ES).

### 2.3.5.1.3. MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation).

La “desorción/ionización con láser asistida por matriz” (MALDI) es una técnica de ionización suave en la que la muestra (cocristalizada con una matriz apropiada) es ionizada mediante la acción de un láser. La matriz absorbe energía del pulso láser y la transfiere a la muestra, la cuál se libera e ioniza. Puede aplicarse en moléculas orgánicas complejas de peso molecular entre unos miles y varios cientos de miles de Daltons.<sup>64</sup>



**Figura 2.20.** Esquema de ionización MALDI.

Se emplea un láser a una longitud de onda adecuada para conseguir la excitación electrónica o vibracional de la molécula que se analiza (ultravioleta lejano o infrarrojo cercano, respectivamente), además el pulso láser debe ser de muy corta duración (1 a 100 ns) para evitar la descomposición térmica. La matriz elegida debe absorber a esa longitud de onda, aunque no es necesario que la muestra tenga un máximo de absorción en dicho intervalo, ya que es la matriz la que absorbe la energía y la transmite a las moléculas de analito. Por tanto, la muestra debe previamente dispersarse de forma homogénea en la matriz, que puede ser sólida o líquida; de este modo, cada molécula de muestra quedará rodeada de un gran número de moléculas de matriz, con lo que se evita, por un lado, la asociación de moléculas de analito que daría lugar a la formación de complejos de muy alto peso molecular, difíciles de liberar y analizar. Por otra parte, la matriz absorbe el exceso de energía, de modo que el proceso de ionización es extremadamente suave. En el proceso de conversión de las moléculas neutras de analito en especies cargadas o iones (generalmente protonados), la matriz juega un papel fundamental al ceder protones a la muestra.

El analizador que se utiliza con este tipo de ionización es el de tiempo de vuelo (TOF) que al tener también carácter pulsante puede sincronizarse con el láser excitador. La técnica instrumental se denomina MALDI-TOF. Existen dos tipos de espectrómetros de masas MALDI-TOF, uno con óptica lineal, y otro con óptica reflectora para compensar el efecto de la dispersión de energías y conseguir mayor resolución

La técnica MALDI se utiliza en el análisis de proteínas, glicoproteínas, oligosacáridos, etc. También puede emplearse en el análisis de mezclas complejas de péptidos o proteínas

#### *Aplicación de las muestras e Instrumentación.*

En los experimentos MALDI-TOF se utiliza un espectrómetro de masas Micromass TOFSpec equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Como patrón externo para la calibración se utiliza una mezcla de oligosacáridos de maltosa. Se usa como matriz ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB). La muestra se disuelve en agua (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y esta disolución (2  $\mu\text{l}$ ) se mezcla con una disolución en acetonitrilo:agua (1:1) de DHB (15 mg/ml)(2  $\mu\text{l}$ ). De esta nueva mezcla se toman 2  $\mu\text{l}$  y se depositan sobre la diana. Finalmente, se añade 1  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto sobre la muestra, se deja secar y se introduce en el espectrómetro de masas.

En los experimentos MALDI Q-o-TOF se utiliza un espectrómetro de masas Applied Biosystems QSTAR con configuración tándem cuadrupolo-tiempo de vuelo en disposición ortogonal (Q-o-TOF) equipado con un láser de nitrógeno a 337 nm.. Se usa como matriz el ácido  $\alpha$ -hidroxicinámico ( $\alpha$ -ciano), disuelto en una disolución de acetonitrilo:agua:ácido trifluoroacético (50:50:0,1). La muestra se disuelve en una disolución de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (50:50:0,1) (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). La disolución resultante (1  $\mu\text{l}$ ) se mezcla con la matriz (1  $\mu\text{l}$ ). De esta nueva mezcla se toman 1  $\mu\text{l}$  y se deposita sobre la diana. Se deja secar y se introduce en el espectrómetro de masas. Como patrón externo para la calibración se utiliza una mezcla de maltooligosacáridos. En los experimentos tándem se emplea el nitrógeno como gas de colisión.

#### **2.3.5.2. Analizadores de masas.**

Una vez que los iones se forman en la fuente de ionización es necesario separarlos, y esta separación se realiza en función de su relación  $m/z$ . El analizador es la parte esencial de un espectrómetro de masas y de la que dependen en mayor grado las características más importantes del sistema, tales como la resolución, la sensibilidad, el

rango de masas, la capacidad para la medida exacta de masas, la posibilidad de estudios cinéticos y de iones metastables, etc.

De la misma manera que existen diferentes fuentes de ionización, también se han desarrollado diferentes tipos de analizadores. Los iones pueden ser separados en función de su comportamiento en campos magnéticos, eléctricos, de radiofrecuencia o por la medida del tiempo de desplazamiento de los iones a los largo de una distancia, etc. Los analizadores más empleados son los magnéticos para alta resolución y altas prestaciones, y los cuadrupolares para trabajos de rutina en baja resolución.

#### 2.3.5.2.1. *Analizador magnético.*

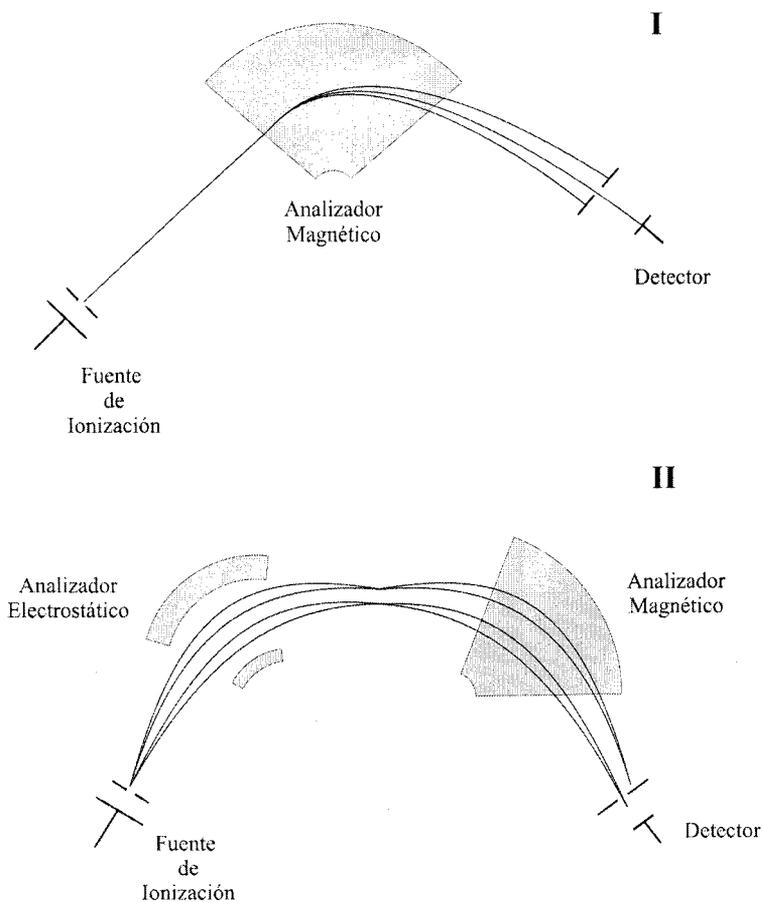
Los iones cargados generados en la fuente de ionización son acelerados mediante un potencial eléctrico y al pasar a través de un campo magnético varían su trayectoria en función de su relación  $m/z$  según la ecuación:

$$m/z = \frac{B^2 R^2}{2V}$$

Para un valor dado del campo magnético  $B$  y del potencial de aceleración  $V$ , solo los iones de un valor determinado de  $m/z$  seguirán las trayectorias curvas de radio  $R$ , y se enfocarán en un punto al final del campo magnético (detector). Los iones que tengan valores de  $m/z$  superiores e inferiores serán desviados en su trayectoria.<sup>64</sup>

Los sistemas magnéticos consiguen una alta transmisión iónica y por tanto una elevada sensibilidad, acelerando los iones producidos en la fuente iónica mediante campos eléctricos con un voltaje de aceleración  $V$ , que suele ser de varios miles de voltios (4-10 KV). La energía cinética adquirida por los iones ( $zV$ ) hace que éstos atraviesen las zonas libres de campo a gran velocidad, por lo que la eficacia en la transmisión es muy elevada.

El instrumento básico que analiza los iones formados en la fuente de ionización usando un campo magnético se denomina espectrómetro de masas de simple enfoque. Para mejorar los problemas de resolución, en la actualidad se utilizan espectrómetros de doble enfoque, que consiste en colocar, antes o después del analizador de campo magnético, un segundo analizador de tipo electrostático. Cada geometría, convencional (EB) o inversa (BE), tiene sus ventajas, por lo que también se han desarrollado geometrías de triple sector (EBE) que permiten reunir en un solo equipo las virtudes de ambas. En la Figura 2.21 se muestra un esquema de un analizador magnético.



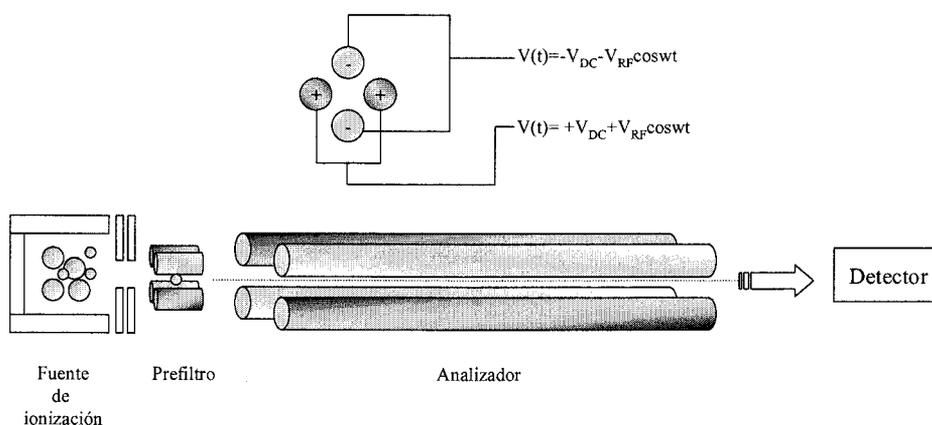
**Figura 2.21.** Esquema de un analizador magnético de simple enfoque (I) y doble enfoque con geometría convencional (EB) (II).

#### 2.3.5.2.2. *Analizador cuadrupolar.*

El analizador cuadrupolar, filtro de masas cuadrupolar o, denominado simplemente, cuadrupolo, está formado por cuatro barras (polos) de sección cilíndrica o hiperbólica, alineadas paralelamente entre sí, y equidistantes a una distancia  $r_0$  de un eje central imaginario. Mediante la aplicación a cada pareja de barras opuestas de voltajes variables de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) superpuestos, se consigue que sólo determinados iones pasen por el túnel formado por los cuatro polos, siguiendo las trayectorias oscilantes estables que les conducen al detector, mientras que los demás iones al ser inestables sus trayectorias, no alcanzan el detector, siendo desviados fuera del

conjunto de barras. Variando convenientemente estos voltajes se puede enfocar de modo sucesivo los diferentes iones presentes y así obtener el espectro correspondiente. En la Figura 2.22 se muestra un esquema de un analizador cuadrupolar.

Los analizadores cuadrupolares no emplean campos aceleradores de alta energía a la salida de la fuente de ionización, ya que pueden provocar que muchos iones se pierdan en trayectorias erráticas, para solucionar este problema se emplea un filtro cuadrupolar complementario (prefiltro) entre la fuente y el analizador y se utiliza sólo con radiofrecuencia. Esto hace que los iones que abandonan la fuente se encuentren con un filtro de máxima transmisión en un amplio rango de masas, que les conduce directamente al analizador, lo que aumenta considerablemente la transmisión y la sensibilidad del sistema. De igual forma, se puede emplear postfiltros entre el analizador y el detector.



**Figura 2.22.** Esquema del analizador cuadrupolar.

El analizador de cuadrupolo es uno de los más extendidos hoy en día. A su bajo costo y su relativa sencillez, se une una alta tolerancia a vacíos relativamente pobres y un rango de masas que, en el mejor de los casos, llega hasta unos 4000 Da que lo hace muy adecuado para ser acoplado a interfases de cualquier tipo, incluida la ES, en el análisis de proteínas y biomoléculas. Por otra parte, las desventajas más importantes que presentan provienen principalmente de su limitado poder de resolución (los cuadrupolos normalmente sólo son capaces de obtener resolución unidad) y su baja transmisión a masas altas.

### 2.3.5.2.3. Analizador de tiempo de vuelo (TOF).

El analizador de tiempo de vuelo es uno de los más antiguos analizadores de la Espectrometría de Masas. Su utilización estuvo restringida durante mucho tiempo a aplicaciones especiales, actualmente se aplica al estudio de biomoléculas: desde azúcares de menos de 1000 Da de peso molecular hasta proteínas de más de 300 kDa. Este analizador posee un rango de masas ilimitado y es capaz de detectar todos los iones formados en la fuente, lo que implica gran sensibilidad pero presenta una baja resolución.

Cuando la muestra es ionizada en la fuente de ionización (por impacto electrónico, desorción láser, etc.), los iones formados se retienen en la fuente por medio de un potencial de retardo de igual signo al de la carga de los iones para evitar que éstos puedan salir de la fuente dispersos en el tiempo. Una vez conseguida la ionización, y confinados los iones en el recinto de la fuente, se aplica un voltaje de extracción, con lo que se consigue que todos los iones salgan de la fuente de modo simultáneo. Pasan a continuación por un campo electrostático acelerador con un voltaje  $V$ , adquiriendo una elevada energía cinética que les impulsa en la dirección del tubo de vuelo, o analizador, hacia el detector. Los iones de mayor  $m/z$  volarán más lentamente que los de menor  $m/z$ . El resultado es que los iones más pequeños llegan primero al detector, y seguidos en el tiempo, y de modo sucesivo, por los de mayor tamaño (suponiendo a todos de carga unitaria). El tiempo empleado en recorrer la longitud del tubo de vuelo será proporcional a la masa, o relación masa/carga, de los iones. El sistema de detección será capaz de distinguir las diferentes masas iónicas (cuanto más largo sea el tubo de vuelo), y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados en la fuente. En la Figura 2.23 se muestra un esquema de un analizador de tiempo de vuelo.

Una de las limitaciones de los analizadores TOF es la resolución, para mejorarla habría que aumentar la longitud del tubo de vuelo de tal modo que no haría práctica su construcción, debido al alto costo, enormes dimensiones resultantes y dificultades con el vacío. Se sabe, que los iones pueden formarse en diferentes regiones en la fuente de ionización, por lo que iones de igual masa/carga al ser acelerados a la salida de la fuente pueden adquirir diferente energía cinética y por tanto alcanzar el detector con ligeras diferencias. Esta dispersión de energías producidas en la fuente de ionización es la causante del ensanchamiento de los picos espectrales. Se ha diseñado un dispositivo para compensar esta dispersión, denominado "Reflectron". Situado al final del tubo de vuelo, frena y devuelve los iones hacia el detector mediante la aplicación de campos electrostáticos progresivos. Por ejemplo, de dos iones de igual masa y diferente energía cinética, el más rápido penetra algo más que el ion de menor energía. De esta forma se reenfoca los iones sobre el detector.

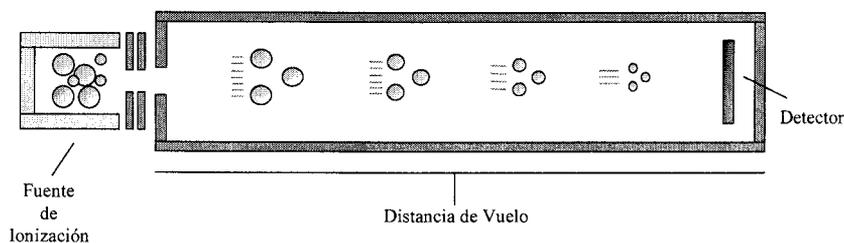


Figura 2.23. Esquema de un analizador tiempo de vuelo (TOF).

### 2.3.5.3. Espectrometría de Masas en tándem. Disociación Inducida por colisión (CID).

Los sistemas MS/MS (*Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) o  $MS^2$ ,  $MS^3$ ...  $MS^n$  consisten en diferentes configuraciones de espectrómetros de masas más o menos complejas capaces de ejecutar diferentes técnicas para el estudio de iones metastables, mediante las cuales se puede aislar un ion de interés en una primera etapa, y posteriormente analizar su relación con otros iones producidos por el analito. Pueden formarse utilizando diferentes combinaciones de analizadores (eléctricos, magnéticos, cuadrupolares, de tiempo de vuelo, etc.), y cada uno presenta sus ventajas e inconvenientes. La realización de sistemas híbridos o tándem tiene como objetivo explotar las cualidades de cada uno de estos tipos de analizadores, evitando sus inconvenientes, mediante la utilización combinada de varios de ellos en un mismo espectrómetro de masas.

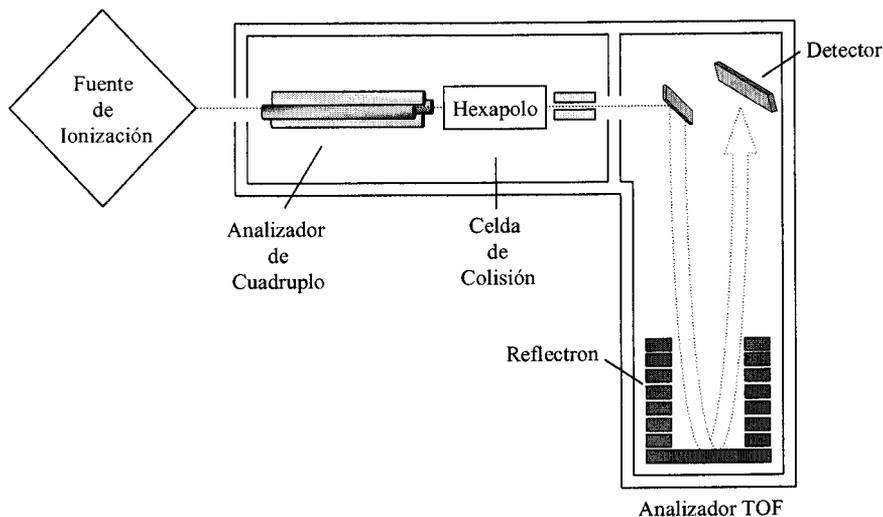
Los espectrómetros de masas en tándem se utilizan de forma generalizada en el análisis de estructuras, ya que mediante ellos, y en combinaciones adecuadas, se pueden hacer experimentos de fragmentación inducida en iones obtenidos por técnicas de ionización blandas como Electrospray o MALDI, de esta forma se puede conseguir información de secuencias en biopolímeros, así como estudios de estructuras iónicas, procesos de ionización y energías de relajación. Los sistemas tándem también se pueden emplear en el estudio de mezclas y trazas mediante la identificación, aislamiento y cuantificación de compuestos minoritarios en mezclas complejas.

La fragmentación o descomposición de iones que normalmente ocurre dentro de los analizadores de masas no suele ser detectada. Sin embargo, iones-fragmento que son producidos en las regiones entre los analizadores de masas sí son transmitidos y detectados. Para generar un espectro de masas de un ion seleccionado específicamente

(llamado “ion precursor”) se emplea la técnica CID (*Collision Induced Dissociation* o Disociación Inducida por Colisión) que induce la fragmentación en vuelo del analito por colisión con partículas. La colisión se lleva a cabo mediante la utilización de una pequeña célula o cámara en la que se introduce un gas a una cierta presión (normalmente Ar o Xe), por la que deben pasar los iones en su trayectoria.

Los métodos de descomposición inducida permiten generar iones metastables, permitiendo su estudio incluso en conjunción con técnicas de ionización blandas, como ES, etc. Estas técnicas proporcionan un exceso de energía prácticamente nulo en el proceso de ionización, por lo que producen poca o nula fragmentación y, virtualmente, no dan origen a iones metaestables. La técnica de CID se realiza en un espectrómetro de masas con configuración en tándem.

La Figura 2.24, representa un espectrómetro de masas tándem cuadrupolo-tiempo de vuelo, dispuestos en geometría ortogonal. La celda de colisión se encuentra situada entre los dos analizadores y suele ser normalmente un hexapolo.



**Figura 2.24.** Representación esquemática de un espectrómetro de masas Q-o-TOF.

#### 2.3.5.4. Análisis estructural de oligosacáridos.

El empleo de la Espectrometría de Masas para el estudio de oligosacáridos proporciona una amplia información estructural de los mismos. Permite identificar la composición, la secuencia, la presencia o no de determinados sustituyentes de diferente naturaleza, e incluso establecer su posición dentro de la molécula.

Si bien, la Espectrometría de Masas es una técnica analítica en la que sólo podemos obtener la relación  $m/z$ , en oligosacáridos de composición conocida este dato es de gran ayuda. El peso molecular de un oligosacárido es indicativo del número y naturaleza de los monosacáridos constituyentes, así como de algunos de los sustituyentes presentes en dicho oligosacárido. Además, dependiendo de la técnica empleada, en un espectro de masas no sólo dispondremos del ion molecular perteneciente al oligosacárido en estudio, sino que obtendremos una serie de iones-fragmento procedentes de roturas preferentes dentro del analito. En el caso de los oligosacáridos, el enlace más débil y que por tanto, fácilmente se rompe es el enlace glicosídico.

Siguiendo la nomenclatura de Domon y Costello,<sup>71</sup> los iones-fragmento que resultan de la rotura directa de los enlaces glicosídicos y que contienen el terminal no reductor del oligosacárido se denominan  $B_n$ , o "iones oxonios".

Los iones-fragmento que resultan de la transferencia de un hidrógeno desde la parte que contiene el terminal no reductor hacia la parte cargada que contiene el terminal reductor del oligosacárido, se denominan  $Y_n$  (Figura 2.25).

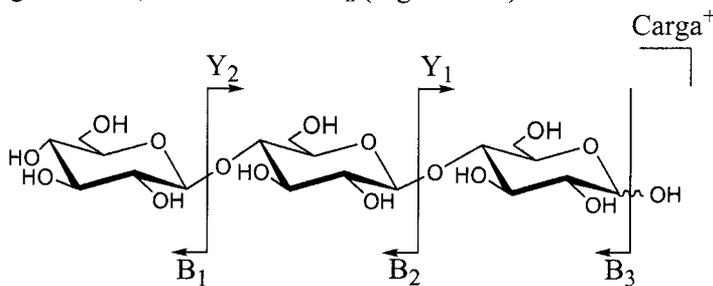


Figura 2.25. Fragmentos  $B_n$  e  $Y_n$  en un trisacárido.

Los iones  $C_n$  y  $Z_n$  también son el resultado de la rotura del enlace glicosídico (Figura 2.26), aunque se producen con menor frecuencia. Al contrario que en el caso anterior, el oxígeno del enlace glicosídico queda del lado del terminal no reductor. Así,  $C_n$  contiene el terminal no reductor y  $Z_n$  es el complementario. (El subíndice  $n$  se refiere al

número del enlace glicosídico contando a partir del terminal no reductor para el caso de los iones-fragmento tipo B y C, o bien, a partir del terminal reductor para los iones-fragmento tipo Y y Z).

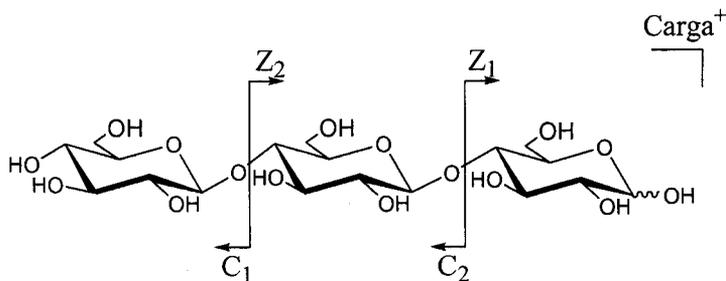


Figura 2.26. Fragmentos  $C_n$  y  $Z_n$  en un trisacárido.

Se pueden encontrar otros iones-fragmento dentro del espectro de masas que proceden de rotura doble o múltiple de los enlaces glicosídicos dentro del oligosacárido. Así, tenemos los iones-fragmentos  $B_n Y_n$  que proceden de la combinación de  $B_n$  e  $Y_n$  (Figura 2.27).

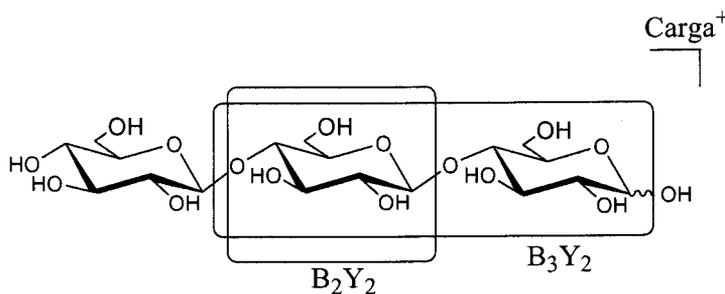


Figura 2.27. Ejemplos de fragmentos  $B_n Y_n$  en un trisacárido.

No todos los iones-fragmento proceden de roturas simples o dobles de los enlaces glicosídicos, también se pueden dar roturas dentro del propio anillo de azúcar y pueden ocurrir en enlaces C-C o C-O. Se denominan  $^{l,m}A_n$  y  $^{l,m}X_n$  (l y m indican los enlaces que se rompen). Estos iones se muestran en la Figura 2.28.

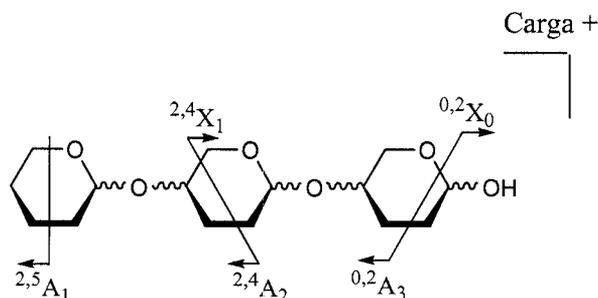


Figura 2.28. Fragmentos  ${}^l m A_n$  y  ${}^l m X_n$  en un trisacárido.

### 2.3.6. Resonancia Magnética Nuclear.

La resonancia magnética nuclear posee una serie de características que hacen a esta técnica especialmente importante en el estudio estructural de oligo- y polisacáridos.

La aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN) permite, en determinados casos, obtener la secuencia completa de la cadena de un oligo- o polisacárido, siendo la herramienta esencial en la determinación de estructuras. Existe un gran número de técnicas, algunas de las cuales han sido aplicadas en esta tesis:

#### 2.3.6.1. Espectro monodimensional de ${}^1H$ -RMN.

El espectro monodimensional proporciona los datos de los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de los monosacáridos que componen el oligo- o polisacárido. Los protones anoméricos tienen una zona de resonancia característica normalmente separada de la del resto de los protones de la molécula, por lo que se puede determinar el número de monosacáridos diferentes (o iguales, pero con entornos distintos) que posee el oligosacárido y la estereoquímica de los enlaces glicosídicos ( $\alpha$  o  $\beta$ ). Asimismo, puede revelar la presencia de sustituyentes o grupos adicionales, como acetilos, metilos o desoxiazúcares.

#### 2.3.6.2. Experimentos de excitación selectiva.

En los experimentos 1D-TOCSY (descritos en el apartado 2.3.6.4) y 1D-NOESY (apartado 2.3.6.5) es necesaria la excitación de una única señal o de un pequeño conjunto de señales en el espectro de RMN. La secuencia de pulsos DANTE-Z<sup>72</sup> (Delays

alternating with nutation for tailored excitation) consiste en una serie de pulsos cortos separados por un pequeño tiempo de espera (aproximadamente 1 ms). Se consigue la excitación selectiva de aquellas señales que están en resonancia con este tren de pulsos.

De la misma forma, la secuencia de pulsos BURP<sup>73</sup> (Band selective uniform response pure phase) permite seleccionar zonas del espectro de RMN, y se utiliza, por ejemplo, en el experimento DBF-COSY (apartado 2.3.6.3)

### 2.3.6.3. Experimentos COSY (Correlated spectroscopy).

La secuencia de pulsos COSY genera un espectro bidimensional en el que cada señal de protón se correlaciona con las señales de los protones acoplados escalarmenente al primero. Existen distintas variaciones de la técnica fundamental de COSY. Entre ellas:

- ♦ COSY convencional: Las señales de cruce que proporciona esta técnica relacionan dos resonancias de protón directamente acoplados (acoplamientos activos).
- ♦ COSY sensible a la fase: Discrimina entre acoplamientos activos, que son los que generan las señales de cruce, y acoplamientos pasivos. Estos últimos se muestran en las señales de cruce pero no son responsables de la aparición de éstas (por ejemplo, en la señal de cruce para dos protones A y M, los acoplamientos pasivos serían los acoplamientos con otros protones distintos de A y M). Gracias a esto, es posible medir directamente constantes de acoplamiento en los picos de cruce, aunque existen otros experimentos especialmente diseñados con este fin, por ejemplo E-COSY.
- ♦ DQF-COSY (double-quantum filtered correlated spectroscopy):<sup>74</sup> No produce señales tan anchas como el COSY convencional y reduce o elimina las de los singuletes, mucho más intensos que las señales de cruce próximas a la diagonal principal.
- ♦ COSY 45: El segundo pulso en el experimento COSY es de 45° en lugar de 90°, con lo que se consigue que las intensidades de las señales de autocorrelación (las señales de cruce dentro de un multiplete) disminuyan. También se afina la diagonal principal, lo que permite observar más fácilmente las señales próximas a ésta.

- ♦ DBF-COSY (2D homonuclear proton double-band filtered selectiv correlated spectroscopy):<sup>75</sup> En este experimento se selecciona una zona del espectro y se obtiene el espectro COSY de dicha zona, sin que interfieran las señales no seleccionadas. De este modo, en la adquisición de este COSY parcial se utiliza la misma cantidad de memoria que la empleada en la adquisición de todo el espectro, con lo que se consiguen espectros COSY de alta resolución. La selección de las zonas en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN se realiza mediante pulsos BURP.<sup>73</sup>

#### 2.3.6.4. Experimento TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).

En el experimento COSY, se obtienen señales de cruce sólo entre espines directamente acoplados unos con otros. Sin embargo, en esta técnica la magnetización se transfiere a lo largo del sistema de acoplamiento, produciendo en el espectro señales de cruce procedentes de un sistema de espín completo.<sup>76</sup> Este experimento es muy útil en el estudio de oligosacáridos o péptidos, ya que permite identificar las señales de cada residuo.

La versión monodimensional de este experimento permite obtener los espectros <sup>1</sup>H-RMN editados de los diferentes sistemas de espín.

La interpretación del espectro debe realizarse con la ayuda de un COSY, convencional, que facilita las asignaciones.

#### 2.3.6.5. NOE y 2D-NOESY.

El efecto NOE (nuclear Overhauser enhancement) se define como una variación de la intensidad de una señal como consecuencia de la relajación de espines próximos espacialmente, generalmente protones.<sup>77</sup> Depende del tamaño y la movilidad de la molécula, además de la temperatura. En el caso de moléculas pequeñas (monosacáridos) el NOE (cambio en la intensidad) suele ser positivo. Al aumentar el tamaño molecular, el NOE disminuye (menos positivo) y pasa a ser negativo para moléculas mayores como es el caso de los polisacáridos. Para moléculas de tamaño medio, como pueden ser tri- o tetrasacáridos, puede llegar a ser nulo.

El experimento 2D-NOESY<sup>78</sup> es bidimensional y de las señales de cruce se obtiene la misma información que el NOE: indican la proximidad espacial de los núcleos implicados.

El experimento 2D-ROESY<sup>79</sup> es también bidimensional y se usa cuando las moléculas son de un tamaño intermedio, que dan señales NOE débiles o incluso nulas. En este experimento, todos los NOE son positivos.

#### 2.3.6.6. Espectro monodimensional de <sup>13</sup>C.

El espectro de <sup>13</sup>C-RMN proporciona información sobre los desplazamientos químicos de los carbonos de un oligo- o polisacárido. Dichos desplazamientos químicos tienen un valor que se mantiene aproximadamente constante comparando monosacáridos aislados y monosacáridos constituyentes de oligo- y polisacáridos. Sin embargo, los desplazamientos químicos de las señales de carbonos involucrados en los enlaces glicosídicos si se modifican, aumentando entre 5 y 10 ppm en la mayoría de los casos.<sup>80,81</sup> Las señales de los carbonos adyacentes a los implicados en el enlace también sufren un desplazamiento, aunque en menor extensión y en sentido contrario, es decir, hacia campo alto.

Por otro lado, las intensidades de las señales del espectro <sup>13</sup>C-RMN, adquirido siguiendo una secuencia de pulsos estándar, se ven afectadas por los distintos tiempos de relajación de los carbonos; este efecto es especialmente importante en el caso de los carbonos cuaternarios. La técnica *Inverse gated <sup>1</sup>H-decoupling* permite la adquisición de espectros <sup>13</sup>C-RMN cuantitativos ya que suprime el efecto NOE responsable de la alteración de las intensidades.

#### 2.3.6.7. Correlación heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C.

La correlación heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C relaciona señales del espectro de protón con las de <sup>13</sup>C entre núcleos directamente unidos a través de la constante de acoplamiento <sup>1</sup>J<sub>H,C</sub>. Si la detección es en <sup>13</sup>C se requiere una gran cantidad de muestra, por lo que se suele recurrir a técnicas de detección inversa (detección en <sup>1</sup>H), mucho más sensibles. En esta tesis se ha utilizado la técnica HSQC (*<sup>1</sup>H-detection mode hetero single-quantum correlation*)<sup>82</sup> ligeramente modificada de modo que la fase sea dependiente de la multiplicidad.<sup>83</sup>

#### 2.3.6.8. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

El experimento anterior permite correlacionar <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C a través de la constante de acoplamiento <sup>1</sup>J<sub>H,C</sub>. Para obtener correlaciones a mayor distancia, como <sup>2</sup>J<sub>H,C</sub> y <sup>3</sup>J<sub>H,C</sub>, se emplea una secuencia de pulsos llamada HMBC.<sup>84</sup>

### 2.3.6.9. Instrumentación.

Las muestras se disuelven en agua deuterada (99.95%) y se liofilizan varias veces para eliminar las señales de los protones intercambiables (generalmente OH y NH). Los espectros se registran en una disolución 60-200  $\mu$ l de DMSO- $d_6$ , conteniendo la máxima cantidad de D<sub>2</sub>O (alrededor de un 8%), usando un espectrómetro Bruker AMX500 operado a 500,13 MHz (para <sup>1</sup>H) y 125,75 MHz (para <sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos se dan en ppm, usando como referencia el multiplete de DMSO (2.49 ppm en el caso de <sup>1</sup>H y 39.5 ppm en el de <sup>13</sup>C). La señal DHO se elimina, en general, por la presaturación con un pulso de baja potencia (atenuación del transmisor de 70 dB) aproximadamente de 1,2 s.

El experimento DBF-COSY se realiza mediante la aplicación de dos pulsos BURP basados en el tren de pulsos DANTE-Z ( $n = 10$ ,  $\tau = 50 \mu$ s,  $\theta = 10^\circ$ ). Se usa una matriz de datos de 512 x 1 K puntos para digitalizar un ancho espectral de 1500 Hz, y 64 barridos por incremento. El experimento DQF-COSY se realiza en el modo sensible a la fase usando la secuencia de pulsos estándar de Bruker. Se emplea una matriz de datos de 256 x 2 K puntos para digitalizar un ancho espectral de 4700 Hz, y se usan 96 barridos por incremento con un tiempo de espera entre ellos de 2 s, y antes de la transformada de Fourier, se emplea un llenado de ceros (*zero filling*) en F<sub>1</sub> para expandir los datos a 1K x 2K.

Los experimentos de correlación heteronuclear a un enlace protón-carbono se efectuaron con detección en <sup>1</sup>H (HSQC). Se utiliza una matriz de datos de 256 x 1 K para digitalizar un ancho espectral en F2 y F1 de 3000 y 15000 Hz, respectivamente. El número de barridos por incremento es 64 y el tiempo de espera entre ellos de 1 s. El valor en la demora de 3,4 ms en la secuencia de pulsos utilizada corresponde a un valor de <sup>1</sup>J<sub>H,C</sub> de 150 Hz. El desacoplamiento de <sup>13</sup>C se consigue con una secuencia GARP. Se aplican funciones  $\cos^2 x$  en ambas dimensiones y un llenado de ceros para expandir los datos a 512 x 1 Hz. Éste experimento se ha modificado ligeramente, incorporando un bloque que permite la detección de la multiplicidad.

Los experimentos monodimensionales de excitación selectiva se llevan a cabo mediante la aplicación del tren de pulsos DANTE-Z ( $n = 300$ ,  $\tau = 100 \mu$ s,  $\theta = 0,3^\circ$ ). A este tren de pulsos también se le agrega una secuencia TOCSY (a diferentes tiempos de mezcla isotrópicos) para dar los correspondientes subspectros 1D-TOCSY. Se acumulan 512 barridos. En el experimento 2D-TOCSY se emplea una matriz de datos de 256 x 2 K puntos para digitalizar un ancho espectral de 5100 Hz, y se usan 8 barridos por incremento con un tiempo de espera entre ellos de 2 s, antes de la transformada de

Fourier, se emplea un llenado de ceros (*zero filling*) en  $F_1$  para expandir los datos a 1K x 2K.

El experimento de absorción pura 2D-NOESY se realiza con un tiempo de mezcla de 300 ms. Se emplea una matriz de datos de 256 x 2 K puntos para digitalizar un ancho espectral de 4700 Hz, y se usan 128 barridos por incremento con un tiempo de espera entre ellos de 2 s antes de la transformada de Fourier, se emplea un llenado de ceros (*zero filling*) en  $F_1$  para expandir los datos a 1K x 2K. El subspectro 1D-NOESY se obtienen permitiendo la libre evolución de la magnetización sobre un tiempo de mezcla de 200 ms después de la selección.

El experimento HMBC se realiza siguiendo la secuencia estándar de Bruker, con 256 incrementos de 2048 puntos reales para digitalizar un ancho espectral de 3000 x 28000 Hz. Se adquieren 192 barridos por incremento, con un valor en la demora de 65 ms para la evolución de los acoplamientos  $^2J$  y  $^3J$ .

3. FACTORES DE NODULACIÓN DE  
*R. giardinii* bv. *giardinii* H152

### 3.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN AISLADOS DE *Rhizobium giardinii* bv. *giardinii* H152.

La judía común (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa más importante en la nutrición humana. Esta planta tiene la capacidad de formar nódulos con un amplio rango de rizobios incluyendo cepas pertenecientes a diferentes géneros y especies, así como con cepas que aún no han sido reconocidas como especies.<sup>85</sup> Los rizobios que nodulan judía cultivada pertenecen, hasta este momento, a cinco especies de *Rhizobium*: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. gallicum* y *R. giardinii*.<sup>86-89</sup> Esta última debería ser subdivida en dos: *R. giardinii* bv. *giardinii* y *R. giardinii* bv. *phaseoli*. *Rhizobium giardinii* fue aislada por primera vez en Francia<sup>89</sup> y está presente en suelos de Europa, África<sup>90</sup> y China.<sup>91</sup> En este capítulo se describe la determinación estructural de los factores de nodulación producidos por *Rhizobium giardinii* bv. *giardinii* H152.

#### 3.1.1. Cultivo de bacterias y cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.

##### 3.1.1.1. Cultivo de bacterias.

El cultivo de *Rhizobium giardinii* bv. *giardinii* H152 se realiza en las condiciones descritas en el apartado 2.1.1. Se emplea apigenina como flavonoide inductor para la producción de los factores de nodulación.

##### 3.1.1.2. Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.

Los factores de nodulación se marcan con un isótopo radiactivo *in vivo* y se analizan por cromatografía en capa fina usando el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2. Se preparan dos cultivos marcados con 0,5  $\mu$ Ci de clorhidrato de <sup>14</sup>C-glucosamina, uno inducido con apigenina (**A**) y otro sin inducir (**B**), que se depositan sobre la placa de cromatografía. Se eluye con acetonitrilo:agua (1:1) y se revela tal como se indica en el apartado 2.1.2.

La placa de c.c.f. realizada se muestra en la Figura 3.1. En el cultivo inducido con apigenina (**A**) se detecta la presencia de factores de nodulación al dar señal positiva al marcaje radiactivo con <sup>14</sup>C-glucosamina. En el cultivo no inducido (**B**) no existe señal radiactiva positiva como cabría esperar, ya que no existe flavonoide en el cultivo que induzca la producción de factores de nodulación.



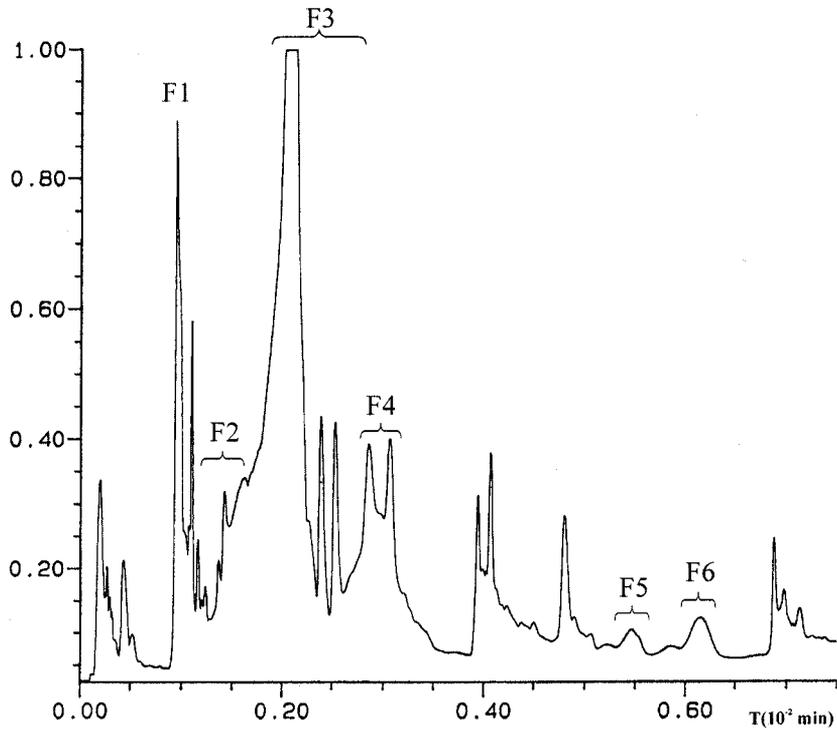
**Figura 3.1.** C.c.f del cultivo marcado radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ -glucosamina inducido con apigenina (A) y no inducido (B).

### 3.1.2. Aislamiento y purificación de los factores de nodulación.

Para la realización del estudio estructural de las moléculas-señal producidas por *R. giardinii* bv. *giardinii* H152 se necesitan 9 l de cultivo crecido en medio B e inducido con apigenina. Los factores de nodulación se extraen del cultivo bacteriano con *n*-butanol.<sup>41</sup>

La fase butanólica se concentra a sequedad en un rotavapor a 50 °C y el residuo resultante se suspende en una disolución de acetonitrilo:agua 60% (45ml) dejándose en agitación durante 12 horas. La disolución resultante se diluye con agua hasta 20% en acetonitrilo y se purifica mediante extracción en fase sólida según lo indicado en el apartado 2.2.2.1. Las fracciones correspondientes a la elución con acetonitrilo al 20, 45 y 60 % se concentran y se liofilizan. La fracción del 45%, que contiene mayoritariamente los factores de nodulación, se cromatografía por HPLC según las condiciones descritas en el apartado 2.2.2.2.

El cromatograma de HPLC de la fracción de purificada al 45 % se muestra en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Cromatograma obtenido por HPLC de la fracción purificada con acetonitrilo al 45%. Se detallan las fracciones aisladas.

En total se aíslan seis fracciones distribuidas en dos zonas de diferente polaridad. Las cuatro primeras fracciones (F1-F4), más polares, se eluyen con acetonitrilo al 30 %, y las dos últimas (F5 y F6), menos polares, con acetonitrilo al 40%.

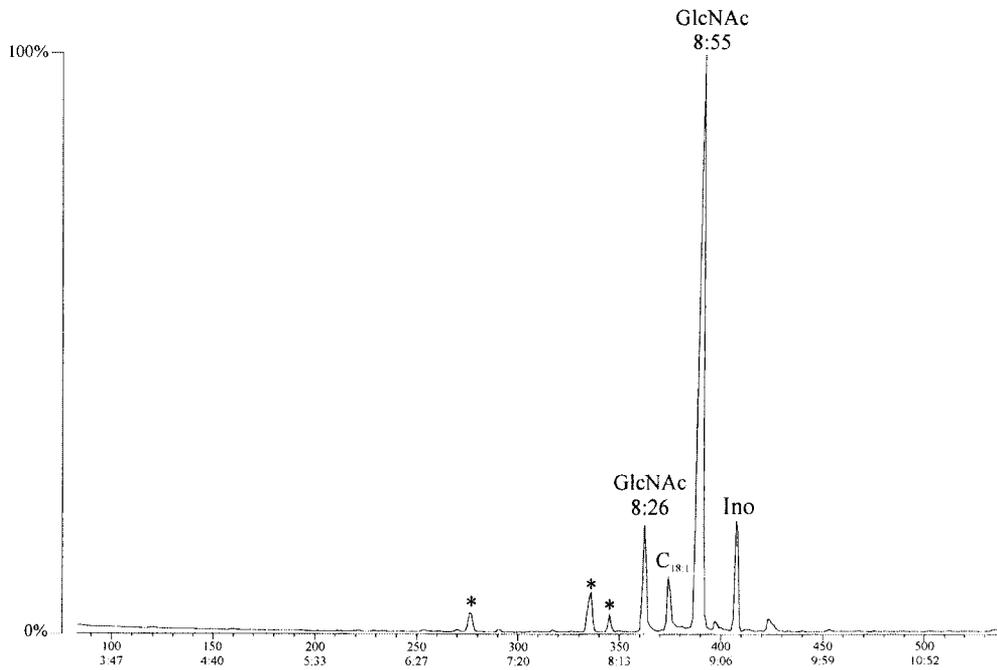
Cada una de las fracciones aisladas se concentra y se liofiliza. Se obtienen las siguientes cantidades:

Fracción F1.....	1,4 mg	Fracción F4.....	1,9 mg
Fracción F2.....	1,2 mg	Fracción F5.....	700µg
Fracción F3.....	3,5 mg	Fracción F6.....	1 mg

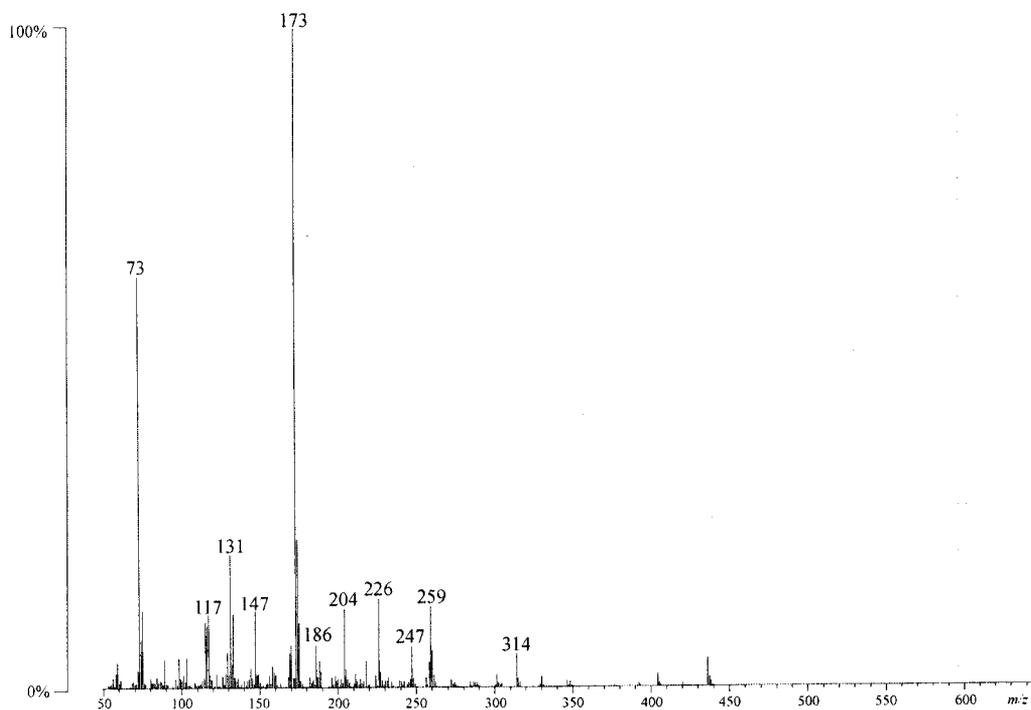
### 3.1.3. Análisis de azúcares.

El análisis de los azúcares que componen los factores de nodulación procedentes de *R. giardinii* bv. *giardinii* H152 se realiza a través de la formación de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, tal y como se describe en el apartado 2.3.1.1. Los derivados se analizan por CGL-EM según la instrumentación y condiciones cromatográficas descritas en el apartado 2.3.1.3.

El cromatograma y el espectro de masas del pico cromatográfico ( $t_R = 8:55$  min) que se obtienen para la fracción F3 se muestran en las Figuras 3.3 y 3.4.



**Figura 3.3.** CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos procedentes de la fracción F3. Las señales marcadas con asterisco no corresponden a azúcares. El ácido graso  $C_{18:1}$  también fue identificado.



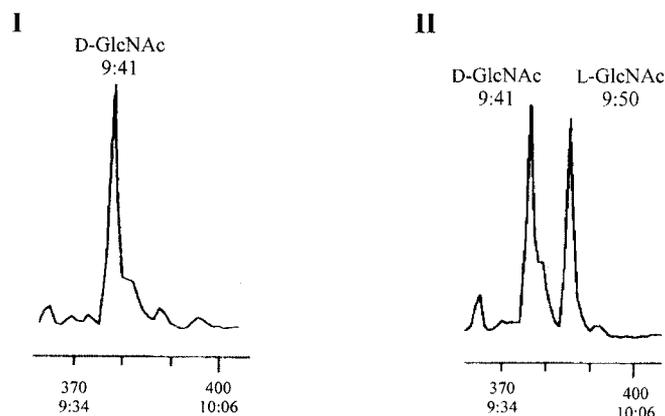
**Figura 3.4.** Espectro de masas del pico a  $t_R = 8:55$  min correspondiente al *O*-trimetilsililderivado del metil glicósido de la *N*-acetilglucosamina.

El análisis mediante CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos que se obtienen para las diferentes fracciones aisladas, permite identificar en todos los casos la presencia de *N*-acetilglucosamina como único azúcar presente en cada fracción, por comparación con los datos obtenidos para monosacáridos patrones

#### 3.1.4. Determinación de la configuración absoluta.

La determinación de la configuración absoluta del monosacárido componente de los lipoquitinolisacáridos procedentes de *R. giardinii* bv. *giardinii* H152 se realiza a través de la formación del (+)-2-butil 2,3,4,6-tetra-*O*-trimetilsililglicósido, tal y como se describe en apartado 2.3.2.1. Los glicósidos se forman por reacción de la muestra problema (sometida previamente a metonólisis) con un alcohol ópticamente activo, (+)-butan-2-ol, y con su alcohol racémico ( $\pm$ )-butan-2-ol. Posteriormente, los glicósidos resultantes se reacetilan y se analizan por CGL-EM según la instrumentación y condiciones cromatográficas descritas en el apartado 2.3.2.2. En la Figura 3.5, se

muestran los cromatogramas correspondientes a los *O*-trimetilsililderivados de los (+)-2-butil glicósidos (I) y (±)-2-butil glicósidos (II).



**Figura 3.5.** Cromatogramas de CGL-EM de los 2-butil 2 *N*-acetamido-2-desoxi-3,4,5-tri-*O*-trimetilsililglucósidos de F3, obtenidos al tratar la muestra con (+)-butan-2-ol (I) y (±)-butan-2-ol (II).

Cuando la fracción F3 se trata con el alcohol ópticamente puro se obtiene un sólo derivado, (+)-2-butil D-glicósido, mientras que si se trata con el racémico se obtienen dos diastereoisómeros, (+)-2-butil D-glicósido y (-)-2-butil D-glicósido; éste último es el enantiómero del (+)-2-butil L-glicósido y, por tanto, posee sus mismas propiedades cromatográficas.

La comparación de los tiempos de retención de los derivados obtenidos, con los producidos a partir de *N*-acetil-D-glucosamina patrón, permite determinar la configuración absoluta de la *N*-acetilglucosamina que compone los factores de nodulación de *R. giardinii* bv. *giardinii* H152. El monosacárido pertenece a la serie D, que es el que se encuentra mayoritariamente en la naturaleza.

### 3.1.5. Estudio de los factores de nodulación mediante Espectrometría de Masas.

El empleo de la Espectrometría de Masas en el estudio de los factores de nodulación producidos por *R. giardinii* bv. *giardinii* H152 resulta determinante a la hora de abordar el análisis estructural de estos oligosacáridos. Permite identificar la

composición, la secuencia, así como la presencia de sustituyentes de diversa naturaleza e inclusive establecer su posición dentro de los mismos, como se detalla a continuación.

Se emplean las siguientes técnicas en este estudio: LSIMS (*Liquid Secondary Ionisation Mass Spectrometry*), FABMS (*Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*), ES Q-o-TOF (*Electrospray*) y CID ES Q-o-TOF (Espectrometría de masas en tándem). Los factores de nodulación se analizan según la instrumentación y condiciones descritas en el apartado 2.3.5.

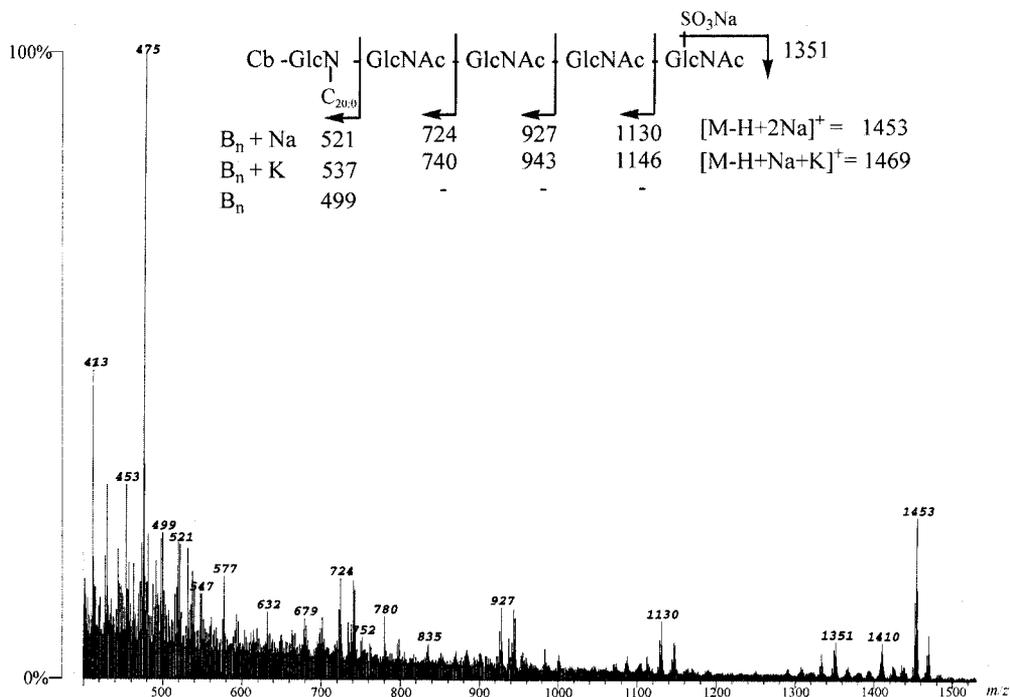
### 3.1.5.1. Estudio por LSIMS y FAB.

Las seis fracciones aisladas por HPLC (F1-F6) se preparan para su análisis por LSIMS y/o FAB disolviéndolas en dimetilsulfóxido hasta una concentración aproximada de 10 µg/µl, tal y como se indica en el apartado 2.3.5.1.1. Se emplean dos matrices para la realización de los espectros de masas: glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1) y tioglicerol (con NaI como aditivo). Los resultados son los siguientes:

#### *Fracción F1*

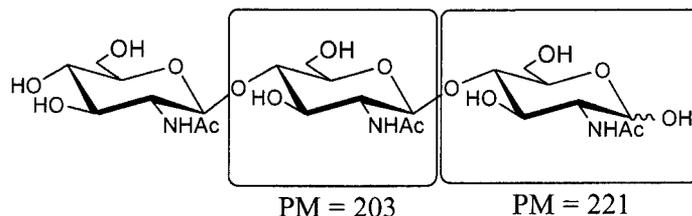
El espectro de masas LSIMS de la fracción F1 usando como matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1) se muestra en la Figura 3.6. Contiene señales correspondientes a los aductos de la molécula con sodio y con potasio a  $m/z$  1453 y 1469, que se asignan a  $[M-H+2Na]^+$  y  $[M-H+Na+K]^+$ , respectivamente. Además, se identifican otros iones que corresponden a iones-fragmento (tipo  $B_n$ ) procedentes del ion pseudomolecular. Las señales encontradas se asignan de la siguiente forma: las señales a  $m/z$  1130 y 1146 corresponden al ion oxonio  $B_4$  más Na y más K, respectivamente; las señales a  $m/z$  927 y 943 se asignan al ion-fragmento  $B_3$  más Na y más K; las señales a  $m/z$  724 y 740 corresponden al ion oxonio  $B_2$  más Na y más K; y las señales a  $m/z$  499, 521 y 537 a  $B_1$  y sus correspondientes aductos con Na y con K.

Una diferencia de masas de 221 Th se corresponde con la unidad de *N*-acetilglucosamina que forma el terminal reductor del oligosacárido. Una diferencia de 203 Th de masas entre dos fragmentos  $B_n$  implica un residuo de *N*-acetilglucosamina interno. La presencia de sustituyentes en el oligosacárido se revela como diferencias en estos valores (Figura 3.7).



**Figura 3.6.** Espectro LSIMS de la fracción F1. Se muestra esquema de fragmentación, indicándose la serie de iones B<sub>n</sub>.

En el espectro de LSIMS registrado, además de los iones oxonios, se identifica una señal a  $m/z$  1351 que se asigna a la pérdida de un grupo NaSO<sub>3</sub> (102 Th) a partir del ion pseudomolecular (pérdida característica de especies sulfatadas).<sup>92</sup> Por tanto, este factor de nodulación contiene en su estructura un grupo sulfato, situado probablemente en el terminal reductor como se confirmará posteriormente. Por último, la señal a  $m/z$  1333 se corresponde a la pérdida de NaSO<sub>3</sub> procedente del ion oxonio B<sub>5</sub>.



**Figura 3.7.** Trisacárido de *N*-acetilglucosamina

Analizando estos resultados se puede proponer que el factor de nodulación presente en la fracción F1 es un oligosacárido formado por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de *N*-acilglucosamina como extremo no reductor (se identifican en el espectro de masas cuatro iones oxonios consecutivos) y, dada la diferencia de masas entre el ion pseudomolecular y el ion oxonio B<sub>4</sub>, el grupo sulfato identificado se localiza en el terminal reductor de la molécula.

Por otra parte, el valor impar de B<sub>1</sub> indica la presencia de un sustituyente nitrogenado en el terminal no reductor del oligosacárido.<sup>92</sup> Se deduce que el factor de nodulación se encuentra sustituido por un grupo carbamoilo y un ácido graso saturado de 20 átomos de carbono en el terminal no reductor.

Cuando el espectro de FAB o LSIMS se realiza con la matriz (tioglicerol con NaI como aditivo) se observa principalmente los iones pseudomoleculares (no suele detectarse fragmentación en la molécula) y los aductos con tioglicerol (este último caso sólo se da cuando el oligosacárido se encuentra *N*-acilado con un ácido graso insaturado).<sup>92,93</sup> El espectro de FAB de esta fracción (F1) realizado empleando esta segunda matriz, no muestra picos que pudieran corresponder con aductos con tioglicerol. Por tanto, se trata de un factor de nodulación cuya estructura contiene un ácido graso saturado.

De estos resultados se puede proponer que la molécula señal aislada en la fracción F1 es un lipooligosacárido formado por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina *N*-acilada por un ácido graso saturado de veinte carbonos, que forma el terminal no reductor del oligosacárido. Además, se encuentra sustituido por un grupo carbamoilo en el terminal no reductor y por un grupo sulfato en el terminal reductor. La estructura puede representarse por V (C<sub>20:0</sub>, Cb, S), que es la nomenclatura establecida por Roche et al.<sup>13</sup> según la cuál, el número romano representa el número de glucosaminas del oligosacárido y entre paréntesis se indica los sustituyentes presentes en el factor de nodulación, comenzando por el ácido graso. La estructura propuesta para el factor de nodulación presente en la fracción F1 se muestra en la Figura 3.8:

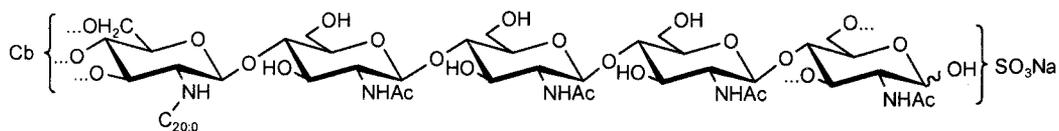
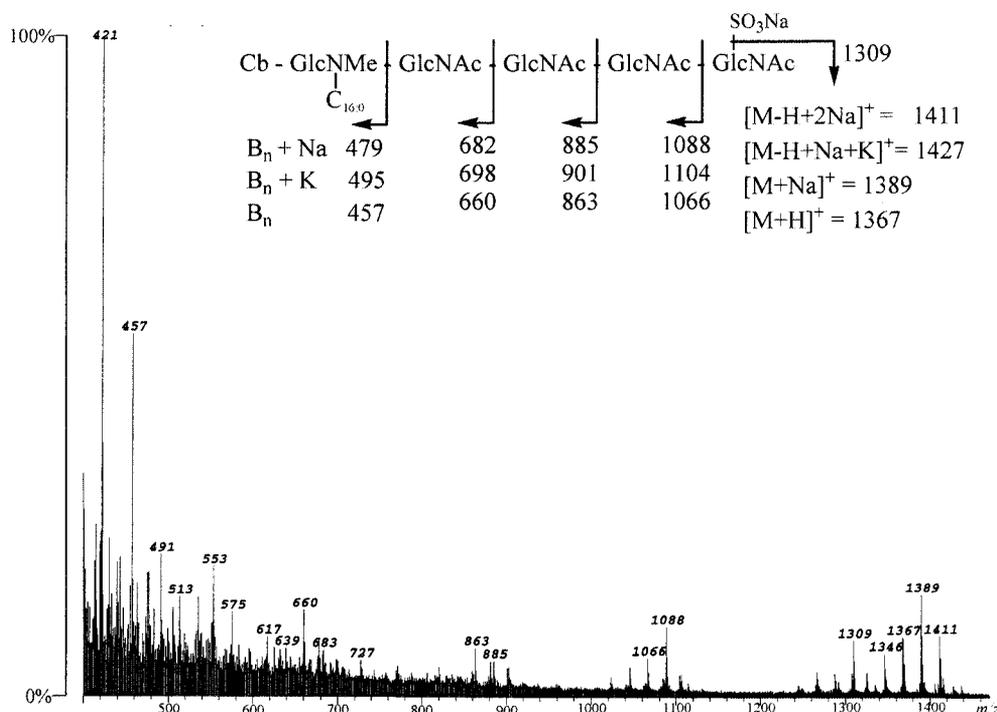


Figura 3.8. Factor de nodulación presente en la fracción F1: V (C<sub>20:0</sub>, Cb, S).

### Fracción F2

El espectro de masas LSIMS de F2 usando como matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobenílico (1:1) se muestra en la Figura 3.9. El espectro contiene señales a  $m/z$  1411, 1427, 1389 y 1367 correspondientes a  $[M-H+2Na]^+$  y  $[M-H+Na+K]^+$ ,  $[M+Na]^+$  y  $[M+H]^+$ , respectivamente.

Al igual que la fracción anterior, se observan los iones-fragmento  $B_n$  procedentes del ion pseudomolecular. Así, se distinguen los picos de  $m/z$ : 1066, 1088 y 1104 ( $B_4$ ,  $B_4$  más Na y más K, respectivamente); 863, 885 y 901 ( $B_3$ ,  $B_3$  más Na y más K, respectivamente); 660, 682 y 698 ( $B_2$ ,  $B_2$  más Na y más K, respectivamente); y 457, 479 y 495 ( $B_1$  y sus correspondientes aductos con Na y con K).



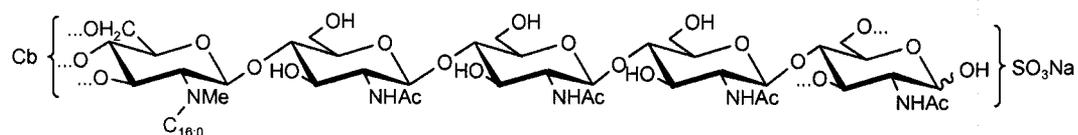
**Figura 3.9.** Espectro LSIMS de la fracción F2. Se muestra esquema de fragmentación. Se indica la serie de iones  $B_n$ .

La pérdida de 102 Th, característica del grupo  $\text{NaSO}_3$ , se aprecia en el pico a  $m/z$  1309  $[\text{M}+\text{Na}-\text{NaSO}_3]^+$ . Por tanto, este factor de nodulación también se encuentra sulfatado. El esquema de fragmentación que muestra es equivalente al del oligosacárido presente en la fracción F1.

Del valor de  $m/z$  del ion oxonio  $B_1$  puede deducirse que el oligosacárido lleva un grupo carbamoilo, un grupo *N*-metilo y un ácido graso saturado de dieciséis átomos de carbono en el terminal no reductor

El espectro de FAB llevado a cabo con la matriz de tioglicerol y NaI como aditivo, no muestra picos correspondientes a aductos con tioglicerol, lo que confirma que el ácido graso es saturado.

De estos resultados se deduce que el componente de la fracción F2 es un lipooligosacárido de cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina sustituida por un ácido graso saturado de dieciséis átomos de carbono, un grupo carbamoilo y un grupo *N*-metilo que forma el terminal no reductor del oligosacárido. El terminal reductor se encuentra sustituido por un grupo sulfato. Su estructura se resume como: V ( $\text{C}_{16,0}$ , NMe, Cb, S) (Figura 3.10).

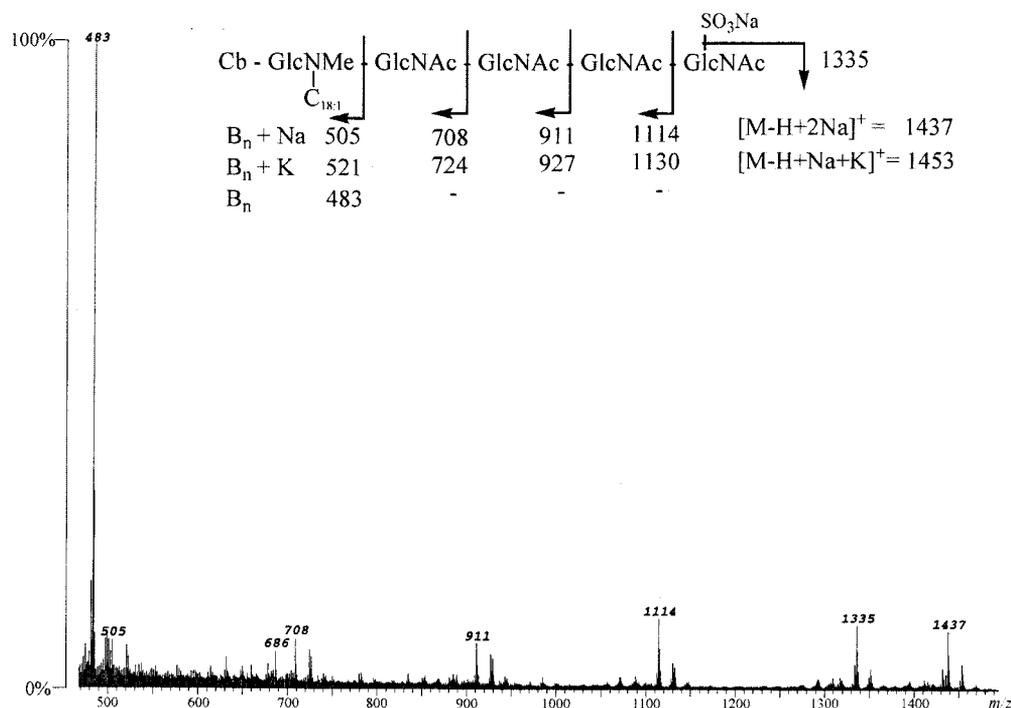


**Figura 3.10.** Factor de nodulación presente en la fracción F2: V ( $\text{C}_{16,0}$ , NMe, Cb, S).

### Fracción F3

El espectro de masas LSIMS de la fracción F3 se muestra en Figura 3.11 y contiene señales correspondientes a  $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$  y  $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$  a  $m/z$  1437 y 1453, respectivamente. Se utiliza la matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1).

Los iones-fragmento  $B_n$  que se identifican son los siguientes:  $m/z$  1114 y 1130 ( $B_4$  más Na y K);  $m/z$  911 y 927 ( $B_3$  más Na y más K);  $m/z$  708 y 724 ( $B_2$  más Na y más K) y  $m/z$  483 (fragmento  $B_1$ ) y el par 505 y 521 ( $B_1$  más Na y más K.)



**Figura 3.11.** Espectro LSIMS de la fracción F3. Se muestra el esquema de fragmentación y se indica la serie de iones  $B_n$ .

La relación  $m/z$  de  $B_1$ , parece indicar que el terminal no reductor contiene un grupo nitrogenado (carbamoilo), un ácido graso monoinsaturado de dieciocho átomos de carbono y un grupo *N*-metilo. La pérdida de  $NaSO_3$  ( $m/z$  1335) indica que el factor de nodulación se encuentra sulfatado.

El espectro de FAB utilizando la matriz tioglicerol y NaI como aditivo, muestra además del ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1437, otro a  $m/z$  1545 que corresponde al ion-aducto  $[M-H+2Na+Tiog]^+$ , lo que indica la presencia de un ácido graso insaturado.

La molécula señal de la fracción F3 está formada por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina que forma el terminal no reductor del oligosacárido. El terminal reductor está sustituido por un grupo sulfato y el no reductor por un ácido graso monoinsaturado de dieciocho átomos de carbono, un grupo carbamoilo y un grupo *N*-metilo. Su estructura se designa como: V ( $C_{18:1}$ , NMe, Cb, S). La estructura propuesta para este LCO se muestra en la Figura 3.12.

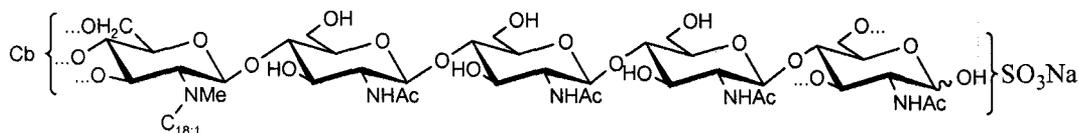


Figura 3.12. Factor de nodulación presente en la fracción F3: V ( $C_{18:1}$ , NMe, Cb, S).

### Fracción F4

El espectro de masas LSIMS de la fracción F4 usando como matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobenílico (1:1) se muestra en Figura 3.13. Al igual que las fracciones anteriores contiene señales correspondientes a los aductos de la molécula con sodio y con potasio. Así, las señales a  $m/z$  1439 y a  $m/z$  1455 corresponden a  $[M-H+2Na]^+$  y a  $[M-H+Na+K]^+$ , respectivamente.

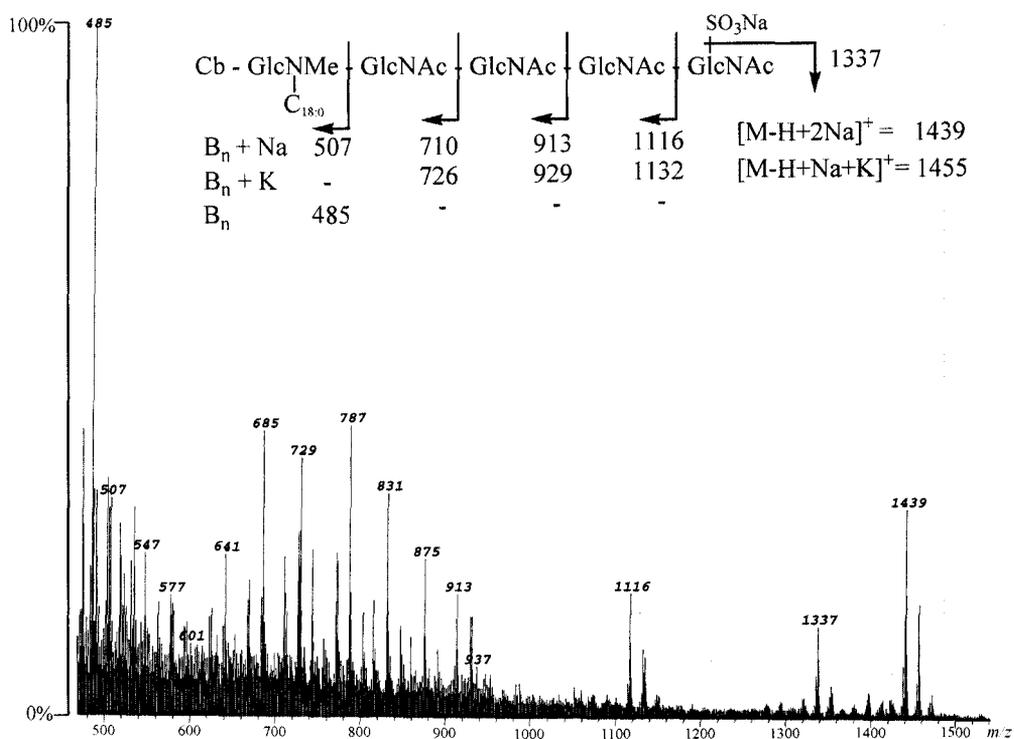
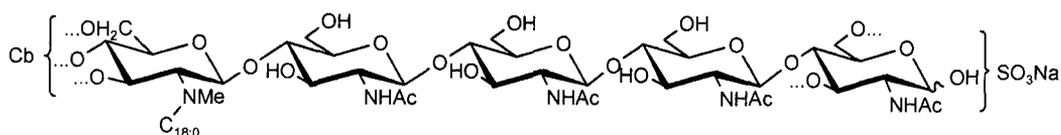


Figura 3.13. Espectro LSIMS de la fracción F4. Se muestra el esquema de fragmentación, indicando la serie de iones  $B_n$ .

La pérdida del grupo sulfato origina la señal a  $m/z$  1337. Se identifica la serie de iones oxonios:  $m/z$  1116 y 1132 ( $B_4$  más Na y más K);  $m/z$  913 y 929 ( $B_3$  más Na y más K);  $m/z$  710 y 726 ( $B_2$  más Na y más K) y por último a  $m/z$  485 y 507 ( $B_1$  y  $B_1$  más Na).

El espectro de FAB, que se registra empleando como matriz tioglicerol y NaI como aditivo, no muestra ion-aducto con tioglicerol. Por tanto, este LCO se encuentra acilado por un ácido graso saturado.

De estos datos se deduce que la fracción F4 contiene un lipooligosacárido integrado por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina *N*-acilada por un ácido graso saturado de dieciocho átomos de carbono que forma el terminal no reductor del oligosacárido. El oligosacárido se encuentra sustituido por un grupo sulfato en el terminal reductor y por un grupo *N*-metilo y un grupo carbamoilo en el terminal no reductor. Le corresponde la nomenclatura: V ( $C_{18:0}$ , NMe, Cb, S). La estructura propuesta para el factor de nodulación presente en la fracción F4 se muestra en la Figura 3.14:



**Figura 3.14.** Factor de nodulación presente en la fracción F4: V ( $C_{18:0}$ , NMe, Cb, S).

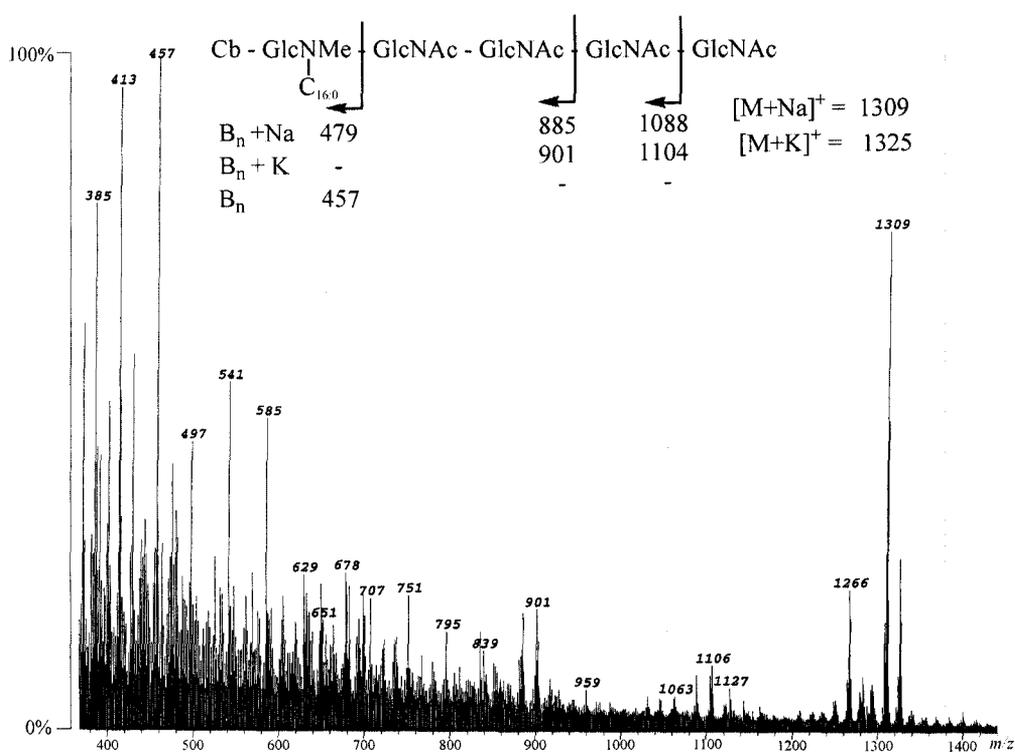
### **Fracción F5**

El espectro de masas de la fracción F5 usando como matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobenzílico (1:1) se muestra en la Figura 3.15. Las señales a  $m/z$  1309 y a  $m/z$  1325 corresponden a  $[M+Na]^+$  y a  $[M+K]^+$ , respectivamente.

También podemos encontrar algunos de los iones fragmentos  $B_n$ :  $m/z$  1088 y 1104 ( $B_4$  más Na y más K);  $m/z$  885 y 901 ( $B_3$  más Na y más K) y por último a  $m/z$  457 y 479 ( $B_1$  y  $B_1$  más Na).

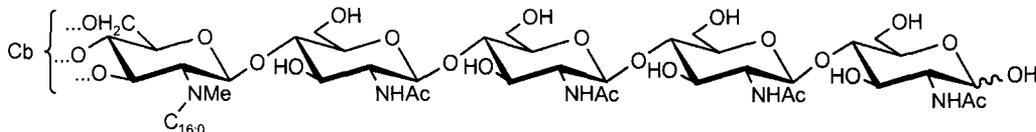
A diferencia con las cuatro fracciones anteriores, en este espectro no se observa pérdida de 102 Th procedente del ion pseudomolecular lo que parece indicar que este oligosacárido no se encuentra sulfatado. El espectro de FAB registrado empleando como

matriz tioglicerol y NaI como aditivo no muestra ion aducto con tioglicerol, por tanto, esta molécula señal se encuentra acilada por un ácido graso saturado.



**Figura 3.15.** Espectro LSIMS de la fracción F5. Se muestra el esquema de fragmentación, así como la serie de iones B<sub>n</sub>.

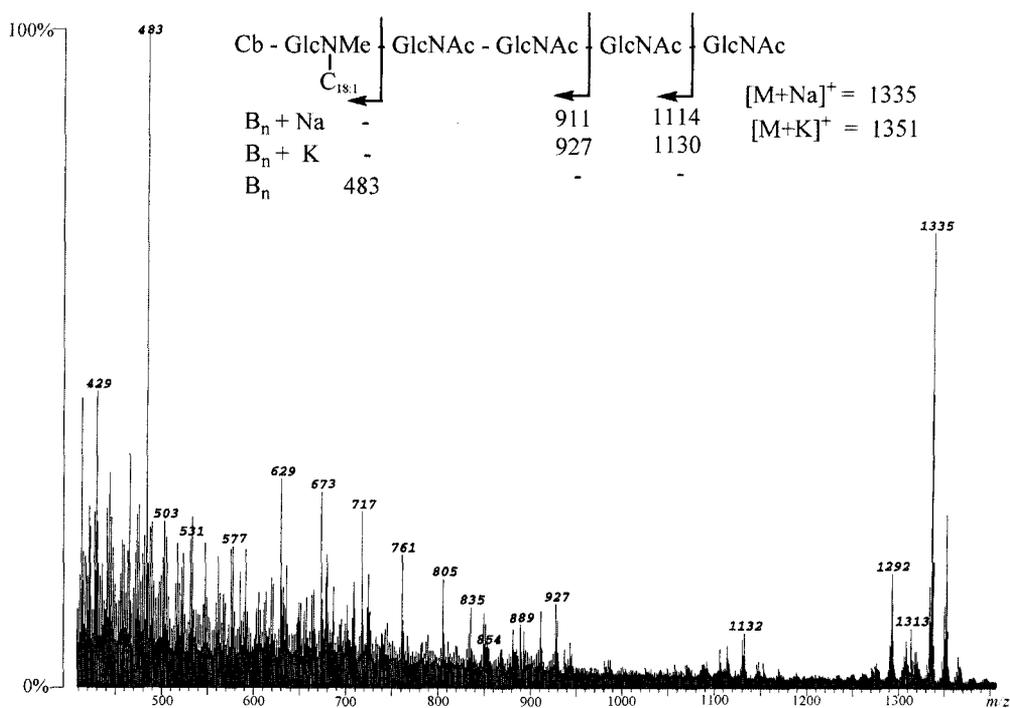
Analizando los iones oxonios encontrados, se puede proponer que el factor de nodulación presente en la fracción F5, corresponde a un oligosacárido formado por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina *N*-acilada por un ácido graso saturado de dieciséis carbonos, que forma el terminal no reductor del oligosacárido. Esta unidad también se encuentra sustituida por un grupo carbamoilo y un grupo *N*-metilo (Figura 3.16). Su estructura se designa como: V (C<sub>16:0</sub>, NMe, Cb).



**Figura 3.16.** Factor de nodulación presente en la fracción F5: V (C<sub>16:0</sub>, NMe, Cb).

**Fracción F6**

El espectro de masas LSIMS de la fracción F6 usando como matriz: glicerol:alcohol *m*-nitrobenílico (1:1) se muestra en Figura 3.17.

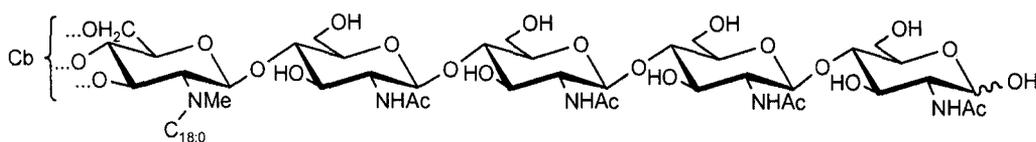


**Figura 3.17.** Espectro LSIMS de la fracción F6. Se muestra el esquema de fragmentación y se indica la serie de iones B<sub>n</sub>.

Las señales a  $m/z$  1335 y a  $m/z$  1351 corresponden a  $[M+Na]^+$  y a  $[M+K]^+$ , respectivamente. Los iones oxonios que se observan son:  $m/z$  1114 y 1130 (B<sub>4</sub> más Na y más K);  $m/z$  911 y 927 (B<sub>3</sub> más Na y más K) y por último  $m/z$  483 que corresponde a B<sub>1</sub>. Al igual que la fracción anterior, no se observa pérdida de SO<sub>3</sub>Na.

Cuando el espectro de FAB se registra utilizando como matriz tioglicerol y NaI como aditivo, observamos además del ion pseudomolecular  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1335, otro a  $m/z$  1443 que corresponde al ion aducto  $[M+Na+Tiog]^+$ , lo que indica la presencia en este oligosacárido de un ácido graso insaturado.

Estos datos permiten proponer que la molécula señal encontrada en esta fracción está compuesta por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina *N*-acilada por un ácido graso monoinsaturado de dieciocho átomos de carbono, y sustituida además por un grupo *N*-metilo y un grupo carbamoilo en el terminal no reductor. Su estructura se designa como V ( $C_{18:1}$ , NMe, Cb). La estructura propuesta para el factor de nodulación presente en la fracción F6 se muestra en la Figura 3.18:



**Figura 3.18.** Factor de nodulación presente en la fracción F6: V ( $C_{18:0}$ , NMe, Cb).

La recopilación de los resultados del análisis por LSIMS de las fracciones aisladas de *R. giardinii* bv. *giardinii* H152 se muestra en la Figura 3.19:

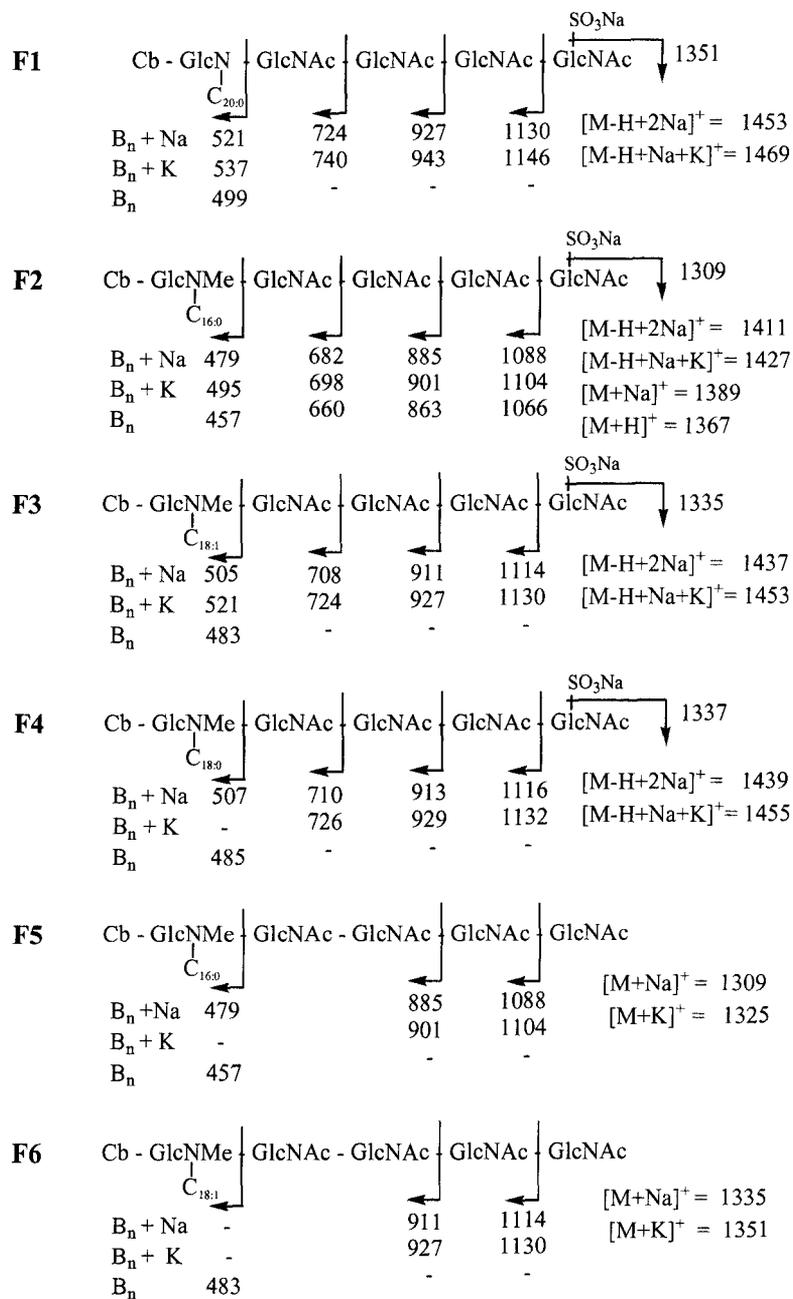


Figura 3.19. Resultado del análisis por LSIMS de las fracciones F1-F6.

### 3.1.5.2. Estudio por ES Q-o-TOF y CID ES Q-o-TOF.

Algunas de las fracciones aisladas se estudian mediante Electrospray (ES Q-o-TOF) y Espectrometría de Masas en tándem (CID ES-Q-o-TOF), para confirmar los resultados obtenidos por LSIMS. Esta técnica de ionización es más sensible y suave que las técnicas FAB o LSIMS y permite identificar componentes minoritarios, como se verá en el caso de la fracción F3.

Se eligen para este estudio fracciones que contienen factores de nodulación que presentan diferencias estructurales entre si:

*F1*: Factor de nodulación sulfatado en el terminal reductor y un grupo carbamoilo en el no reductor

*F3*: Factor de nodulación sulfatado en el terminal reductor con un grupo carbamoilo y un grupo *N*-Me en el terminal no reductor.

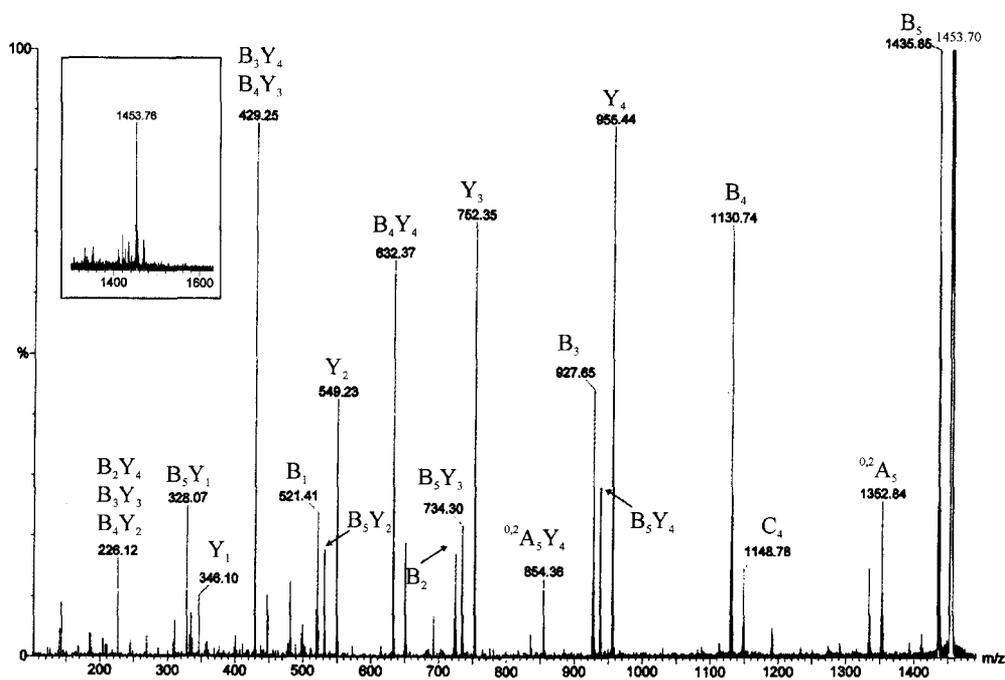
*F6*: Factor de nodulación no sulfatado, con un grupo carbamoilo y *N*-Me en el terminal no reductor.

Las muestras se disuelven en una disolución de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (50:50:0,1). La disolución resultante se introduce en la fuente de electrospray a través de un capilar de sílice con un flujo de 1  $\mu$ l/min, tal y como se indica en el apartado 2.3.5.1.2. Los resultados son los siguientes:

#### ***Fracción F1***

El espectro CID ES-Q-o-TOF y la región del ion pseudomolecular del espectro de ES Q-o-TOF obtenidos para la fracción F1 se muestran en la Figura 3.20.

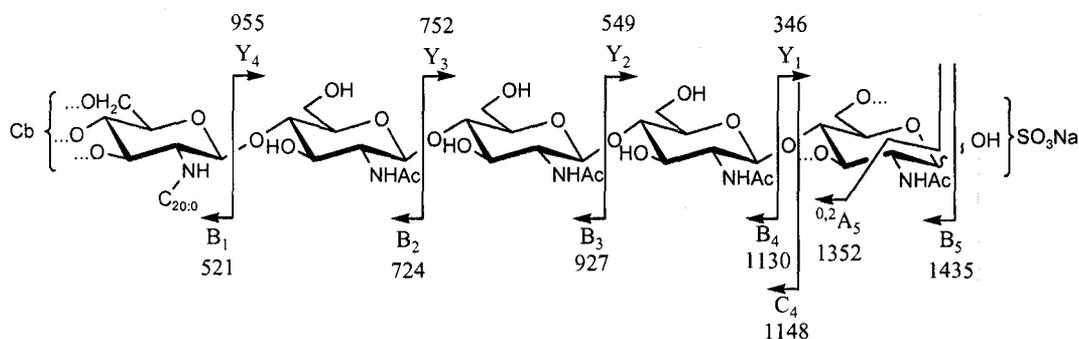
El espectro de CID-MSMS se obtiene por fragmentación del ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1453. Los iones-fragmento, correspondientes a la rotura de los enlaces glicosídicos, son los iones tipo B, Y, C y Z; los iones-fragmento procedentes de doble rotura son los iones tipo BY; y los producidos por rotura de anillo y doble rotura son los iones tipo  $^{1,m}A_n$  y  $^{1,m}AY$ . En la Figura 3.20 se muestra la asignación de los iones-fragmento encontrados para el factor de nodulación presente en F1.



**Figura 3.20.** Espectro de masas CID ES-Q-o-TOF de la fracción F1 y en el recuadro se muestra el espectro de masas ES-Q-o-TOF.

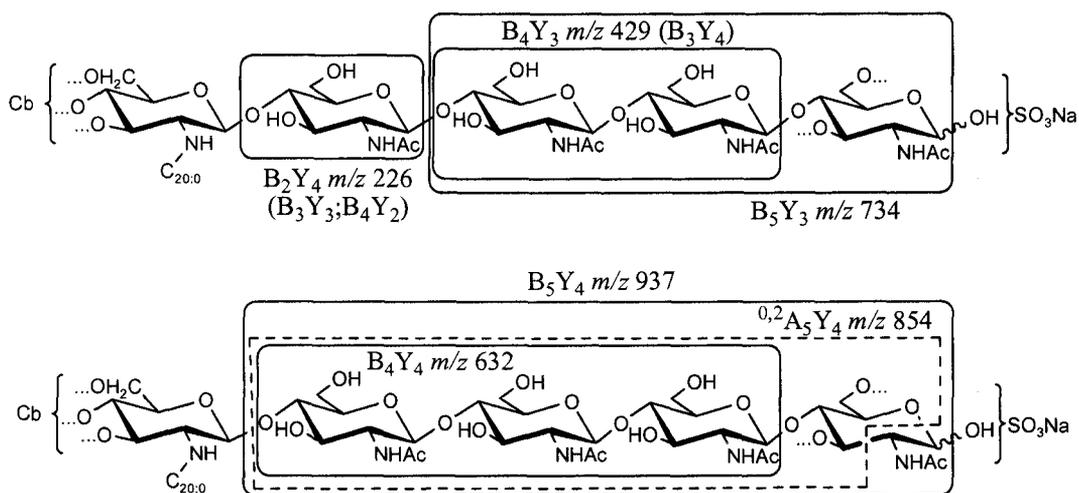
Se identifica la serie de iones oxonio  $[B_n+Na]^+$  formada por los iones a  $m/z$ : 521, 724, 927, 1130 y 1435; y la serie de iones  $[Y_n+Na]^+$  a  $m/z$ : 346, 579, 752 y 955. También se asignan algunos iones-fragmento poco frecuentes, tales como  $C_4$  ( $m/z$  1148) y  $^{0,2}A_5$  ( $m/z$  1352).

El esquema de fragmentación del factor de nodulación presente en la fracción F1 se muestra en la Figura 3.21. En este esquema se representan todas las fragmentaciones encontradas procedentes de roturas simples dentro de la molécula, además de alguna procedente de rotura de anillo (tipo A).



**Figura 3.21.** Esquema de fragmentación CID ES-Q-o-TOF del LCO en fracción F1. Se muestra la asignación de los iones fragmentos B<sub>n</sub>, Y<sub>n</sub>, C<sub>n</sub> y <sup>l,m</sup>A<sub>n</sub> encontrados.

Los iones-fragmento procedentes de doble rotura dentro de la molécula, tales como B<sub>n</sub>Y<sub>n</sub> y <sup>l,m</sup>AY<sub>n</sub>, se detallan en los siguientes esquemas de fragmentación (Figura 3.22):



**Figura 3.22.** Esquema de fragmentación CID ES-Q-o-TOF del LCO identificado en la fracción F1. Se indican los iones fragmentos B<sub>n</sub>Y<sub>n</sub> y <sup>l,m</sup>A<sub>n</sub>Y<sub>n</sub> encontrados.

Analizando los datos obtenidos, se confirma que el grupo sulfato se encuentra localizado en el terminal reductor del oligosacárido, y que los grupos carbamoilo y ácido graso se encuentran localizados en el terminal no reductor de la molécula señal.

Por tanto, se confirma la estructura propuesta para el factor de nodulación presente en la fracción F1: V (C<sub>20:0</sub>, Cb, S).

### ***Fracción F3***

El espectro de masas de ES Q-o-TOF de la fracción F3 muestra dos iones pseudomoleculares a  $m/z$  1437 y a  $m/z$  1174 asignados a  $[M-H+2Na]^+$  y  $[M^++Na]^+$ , respectivamente, que corresponden a dos factores de nodulación diferentes. En el espectro de masas LSIMS de esta fracción solo se identificó el ion pseudomolecular a  $m/z$  1437 (Figura 3.11). Los picos del espectro de electrospray se muestran en las Figuras 3.23 y 3.26 (recuadro).

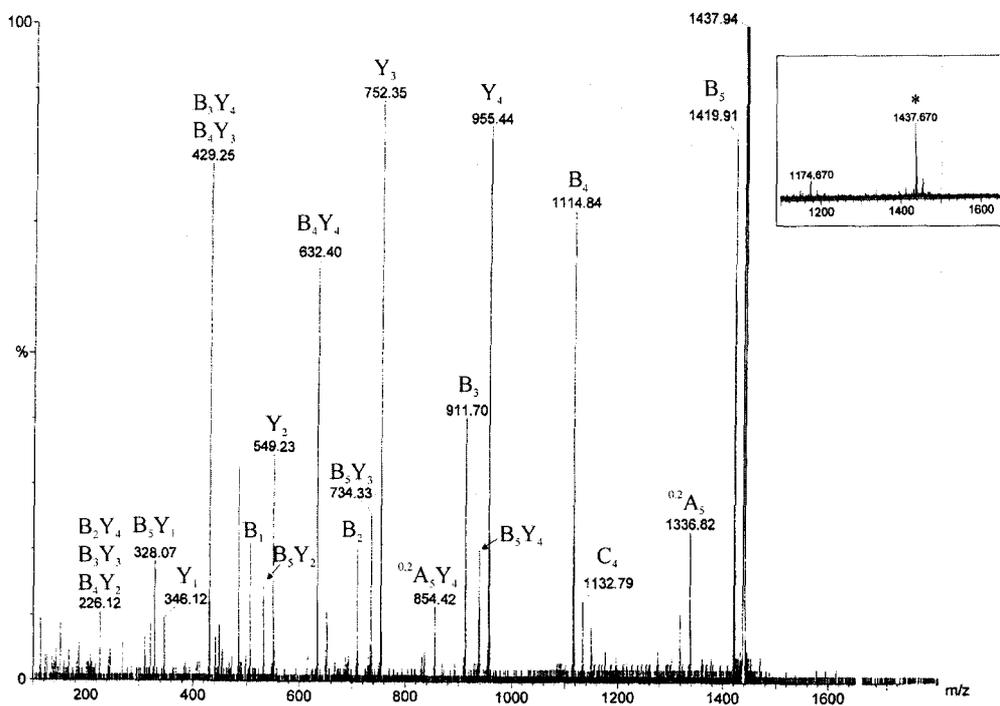
Con el fin de comprobar los resultados obtenidos, se realiza el espectro de masas CID ES Q-o-TOF de cada uno de los iones pseudomoleculares detectados en esta fracción (el mayoritario a  $m/z$  1437 y el minoritario a  $m/z$  1174). Se asignan todos los iones-fragmento encontrados para ambos oligosacáridos.

#### *Factor de nodulación mayoritario presente en la fracción F3*

El factor de nodulación a  $m/z$  1437 representa un segundo tipo de oligosacárido aislado. Se diferencia del LCO de la fracción F1 en el grupo *N*-metilo que lleva en el terminal no reductor. La zona del ion pseudomolecular del espectro de masas ES Q-o-TOF que se realiza en modo positivo se muestra en la Figura 3.23.

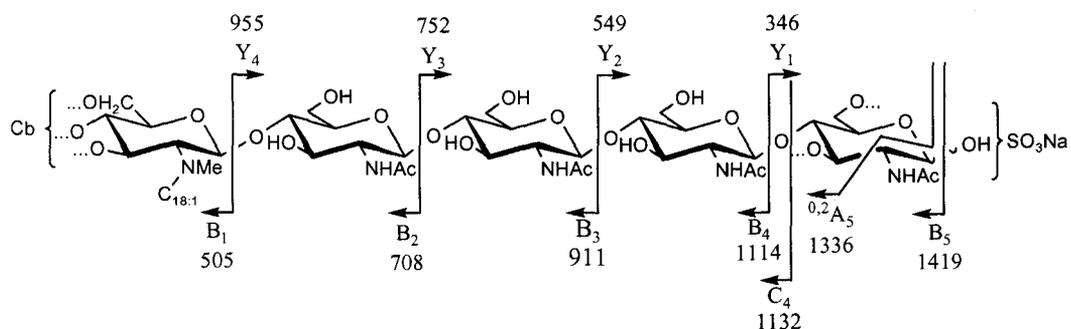
El espectro CID-MSMS del ion a  $m/z$  1437 contiene diferentes tipos de iones-fragmento:

Las series de  $[B_n+Na]^+$  e  $[Y_n+Na]^+$  están constituidos por los siguientes iones:  $m/z$  505, 708, 911, 1114 y 1419 y  $m/z$  346, 549, 752 y 955, respectivamente. Al igual que en la molécula anterior, también se asignan algunos iones-fragmento no tan frecuentes, como C<sub>4</sub> ( $m/z$  1132) y otros procedentes de rotura del anillo, <sup>0,2</sup>A<sub>5</sub> ( $m/z$  1336).



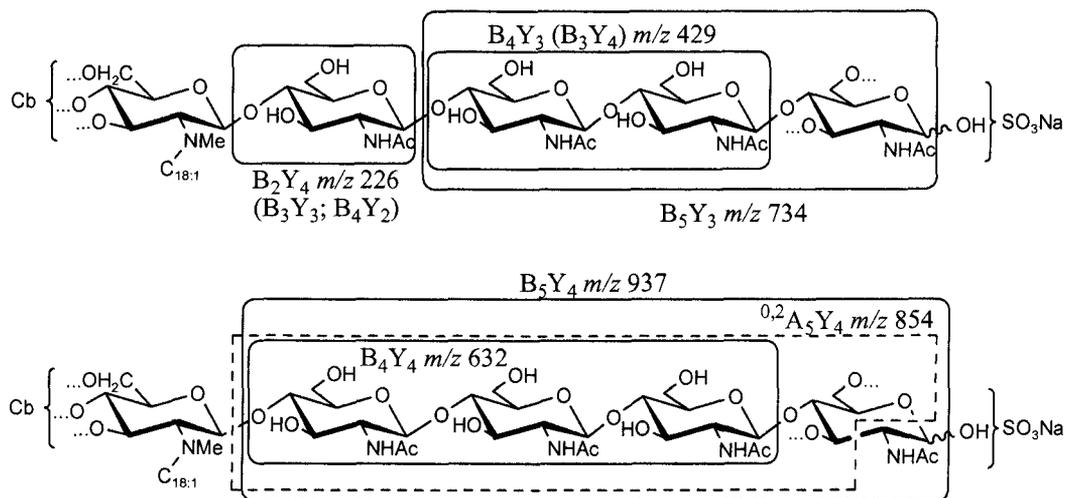
**Figura 3.23.** Espectro de masas CID ES Q-o-TOF del componente mayoritario en la fracción F3 y en el recuadro se muestra el espectro de masas ES Q-o-TOF.

A continuación (Figura 3.24) se detalla su esquema de fragmentación y se representan todas las fragmentaciones encontradas procedentes de roturas simples dentro de la molécula, además de alguna procedente de rotura de anillo (tipo A).



**Figura 3.24.** Esquema de fragmentación CID ES Q-o-TOF del LCO mayoritario en la fracción F3. Se muestra la asignación de los iones-fragmento  $B_n$ ,  $Y_n$ ,  $C_n$  y  ${}^{l,m}A_n$  encontrados.

Los iones fragmentos procedentes de doble rotura, tales como  $B_n Y_n$  o  ${}^{l,m}A_n Y_n$  se detallan en la figura siguiente:

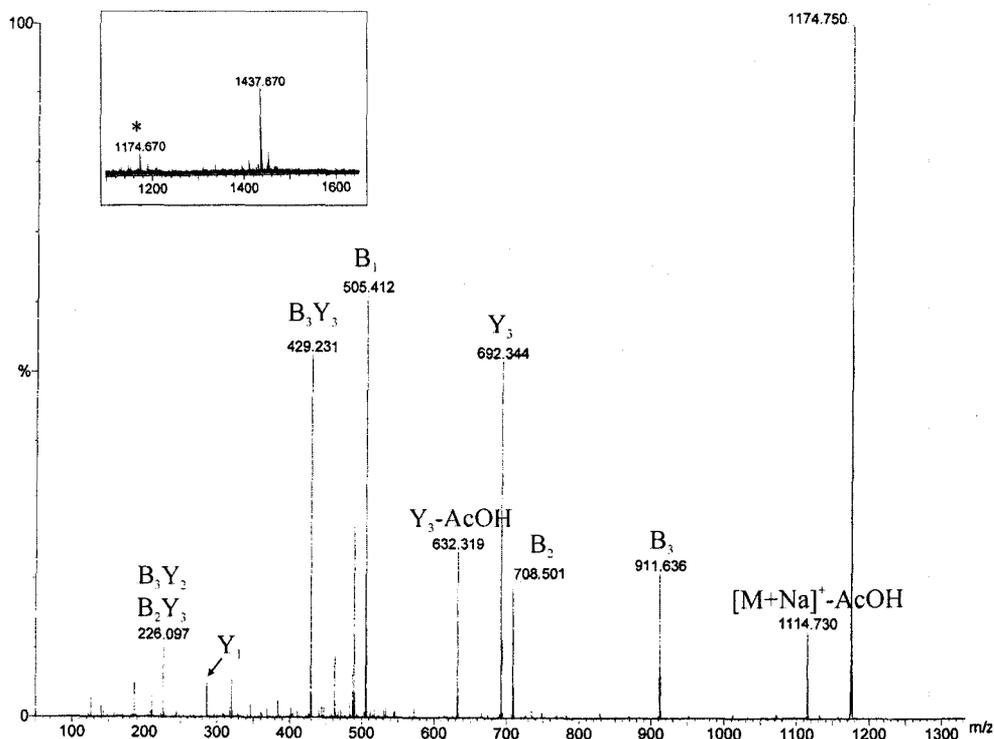


**Figura 3.25.** Esquema de fragmentación CID ES-Q-o-TOF del LCO mayoritario en la fracción F3. Se indican los iones-fragmento  $B_n Y_n$  y  ${}^{l,m}A_n Y_n$  encontrados.

Los datos obtenidos confirman que el grupo sulfato se encuentra localizado en el terminal reductor del oligosacárido y que los grupos carbamoilo, *N*-metilo y el ácido graso (C<sub>18:1</sub>) se localizan en el terminal no reductor de la molécula.

#### *Factor de nodulación minoritario presente en la fracción F3*

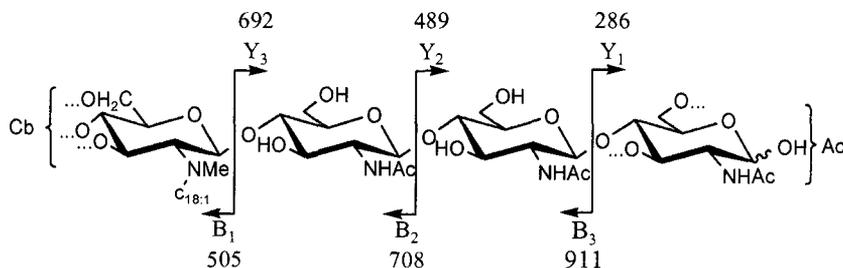
El espectro CID ES-Q-o-TOF obtenido para la molécula señal minoritaria presente en la fracción F3 y con ion pseudomolecular  $[M^+ + Na]^+$  a *m/z* 1174 se muestra en la Figura 3.26 (recuadro).



**Figura 3.26.** Espectro de masas CID ES-Q-o-TOF del componente minoritario en la fracción F3 y en el recuadro se muestra el espectro de masas ES Q-o-TOF.

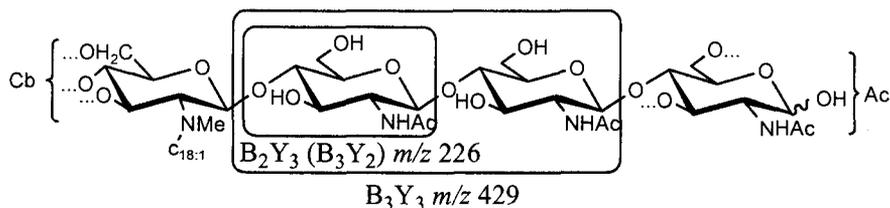
Analizando el espectro obtenido, se asigna la serie de iones  $B_n$  más Na  $m/z$ : 505, 708 y 911, y la serie de  $Y_n$  más Na  $m/z$ : 286, 489 y 692. El valor de  $Y_1$  junto con las pérdidas de una molécula de ácido acético (-60 Th) procedentes del ion pseudomolecular y del ion-fragmento  $Y_3$  revela que este oligosacárido se encuentra sustituido por un grupo acetilo en el terminal reductor.

En el esquema de fragmentación que se muestra en la Figura 3.27 se detallan las series de iones-fragmentos  $B_n$  e  $Y_n$  encontradas para este oligosacárido.



**Figura 3.27.** Esquema de fragmentación CID ES-Q-o-TOF del LCO minoritario en la fracción F3. Los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  están asignados.

En el espectro de masas CID ES Q-o-TOF también se observan algunos fragmentos procedentes del  $B_n Y_n$  tales como,  $B_3 Y_3$  ( $m/z$  429) y  $B_3 Y_2$  o  $B_2 Y_3$  ( $m/z$  226). Estos vienen representados en el siguiente esquema de fragmentación (Figura 3.28):



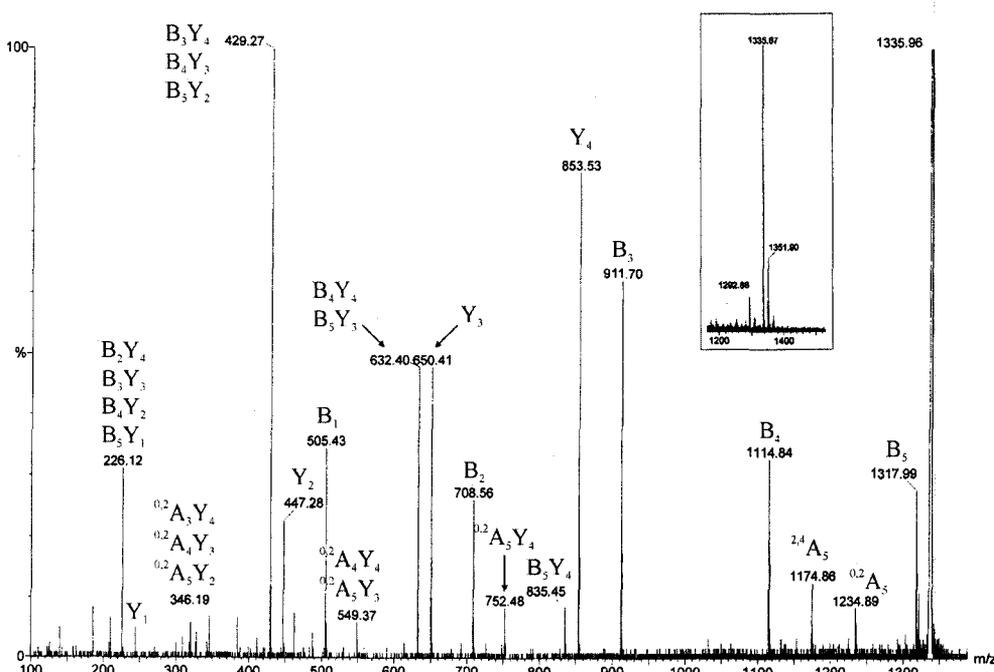
**Figura 3.28.** Esquema de fragmentación CID ES-Q-o-TOF del LCO minoritario en fracción F3. Se indican los iones-fragmento  $B_n Y_n$  encontrados.

De estos datos se deduce que esta molécula señal es un lipooligosacárido de tres unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina *N*-acilada por un ácido graso insaturado de dieciocho átomos de carbono ( $C_{18:1}$ ). Además, está sustituido por un grupo acetilo en el terminal reductor y por un grupo *N*-metilo y un grupo carbamoilo en el terminal no reductor. Su estructura puede indicarse como IV ( $C_{18:1}$ , NMe, Cb, Ac).

### Fracción F6

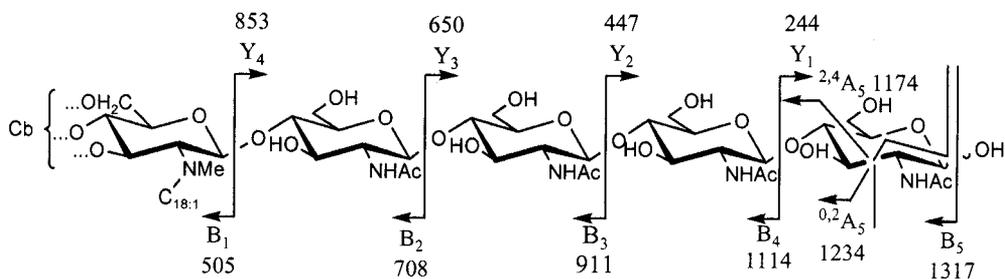
El espectro de masas CID ES Q-o-TOF obtenido para el ion a  $m/z$  1335 presente en la fracción F6 se muestra en la Figura 3.29. En el recuadro se muestra la región del ion pseudomolecular del espectro de electrospray obtenido para dicha fracción.

El espectro de CID-MSMS se obtiene por fragmentación del ion pseudomolecular  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1335. El espectro contiene diferentes tipos de iones-fragmento. La serie  $B_n$  más Na es:  $m/z$  505, 708, 911, 1114 y 1317 y la serie de iones  $Y_n$  más Na es:  $m/z$  244, 447, 650 y 853.



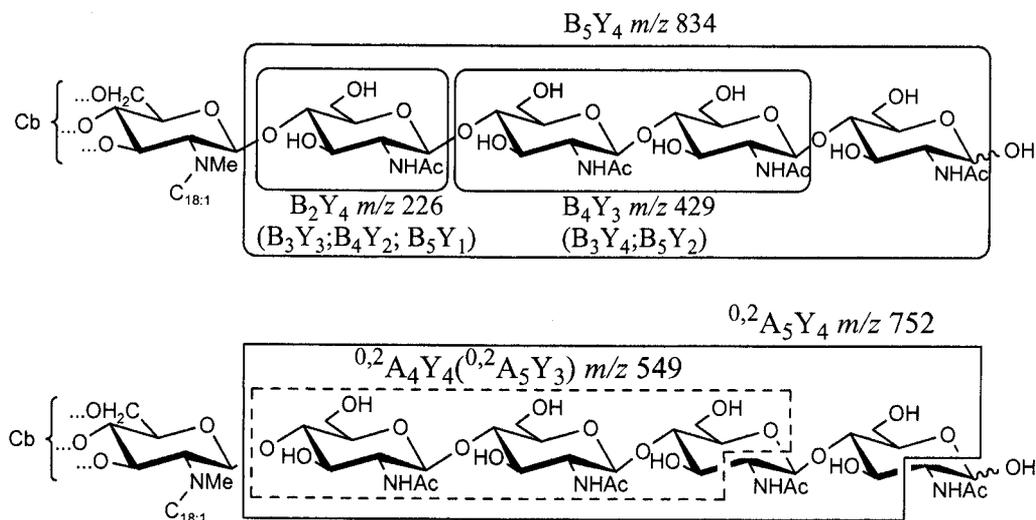
**Figura 3.29.** Espectro de masas CID ES Q-o-TOF de la fracción F6 y en el recuadro se muestra el espectro de masas ES Q-o-TOF.

A continuación, Figura 3.30, se muestra su esquema de fragmentación y se representan todas las fragmentaciones encontradas procedentes de roturas simples dentro de la molécula, además de otras procedentes de rotura de anillo (tipo A).



**Figura 3.30.** Esquema de fragmentación CID ES Q-o-TOF del LCO presente en la fracción F6. Se muestran los iones-fragmento  $B_n$ ,  $Y_n$  y  $^{1,m}A_n$  encontrados.

Los iones-fragmento procedentes de doble rotura dentro de la molécula, tales como  $B_n Y_n$  o  $^{m,1}A_n Y_n$  se muestran en la figura siguiente:



**Figura 3.31.** Esquema de fragmentación CID ES-Q-o-TOF del LCO presente en la fracción F6. Los iones-fragmento  $B_n Y_n$  y  $^{1,m}A_n Y_n$  encontrados están asignados.

Los datos obtenidos confirman que se trata de un oligosacárido de cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina *N*-acilada por un ácido graso monoinsaturado de dieciocho átomos de carbono, y sustituido únicamente en el terminal no reductor por un grupo carbamoilo y un grupo *N*-metilo. Se confirma por tanto la estructura propuesta: V ( $C_{18:1}$ , NMe, Cb).

### 3.1.5.3. Localización del grupo *O*-carbamoilo.

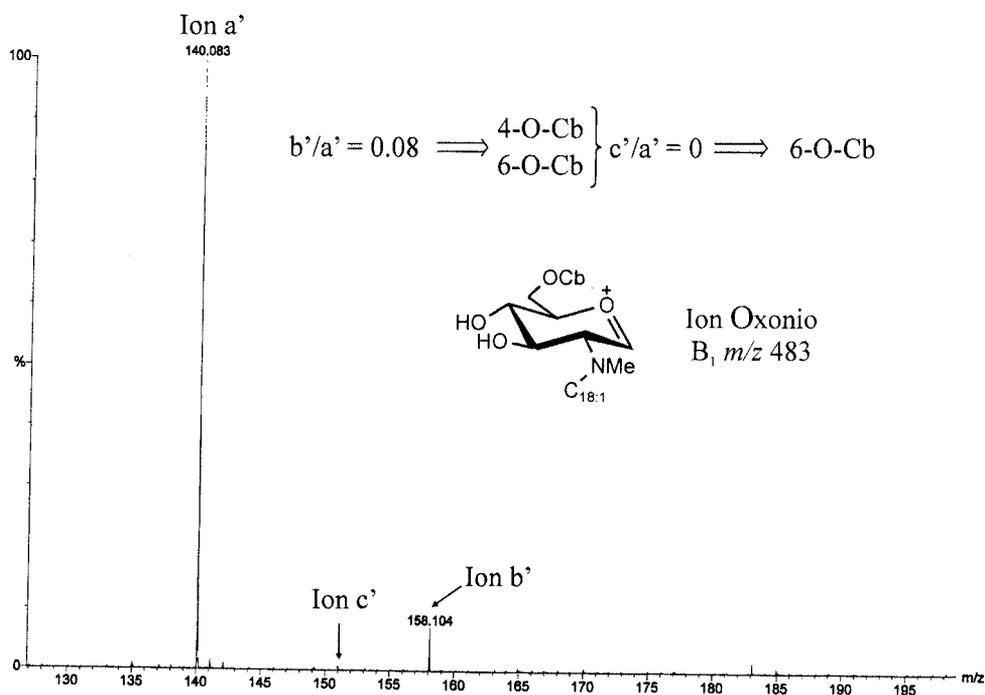
Existen antecedentes en la bibliografía, que describen la localización de sustituyentes (tipo *O*-acetilo u *O*-carbamoilo) en el terminal no reductor de un factor de nodulación mediante Espectrometría de Masas.<sup>94</sup> Para ello, es necesario realizar un experimento CID-MSMS sobre el ion oxonio B<sub>1</sub> y analizar la abundancia relativa de los iones resultantes. De esta manera, es posible distinguir entre sustituciones en *O*-3, en *O*-4 o en *O*-6 en el terminal no reductor del oligosacárido.

Los experimentos CID MSMS se realizan en condiciones de alta energía de colisión, por tanto, la abundancia relativa de iones producidos por simple eliminación de agua, ácido acético, ácido carbámico o ambos, es mucho menor. Además, se induce la formación abundante de iones con relación *m/z* pequeñas. Las variaciones en las intensidades relativas de ciertos iones, denominados iones-diagnóstico, permite diferenciar entre isómeros en los que el grupo *O*-carbamoilo ocupa diferentes posiciones. Los iones-diagnóstico que cita la bibliografía son: *m/z* 126 (**a**), *m/z* 144 (**b**) y *m/z* 138 (**c**).

El ion-diagnóstico **b** se genera por la eliminación de una alquil cetena (procedente del ácido graso) y una molécula de ácido carbámico; el ion-diagnóstico **a** se produce a partir de **b** por pérdida de una molécula de agua, y el ion **c** proviene de la pérdida de ácido carbámico, formaldehído y agua. La molécula de formaldehído probablemente procede de la pérdida de un grupo alcohol primario dentro de la molécula. Esto puede explicar por qué la abundancia de este ion es particularmente baja para los 6-*O*-sustituidos.

La relación *m/z* de los iones-diagnóstico pueden cambiar debido a la presencia de otros sustituyentes en la glucosamina que forma el terminal no reductor del oligosacárido. En el caso de la molécula señal en estudio, además del grupo carbamoilo, posee un grupo *N*-Me. Por este motivo, estos iones se desplazan 14 Th en el espectro obteniéndose los siguientes iones-diagnóstico equivalentes: *m/z* 140 (**a'**), *m/z* 158 (**b'**) y *m/z* 152 (**c'**).

Por tanto, para conocer la posición exacta del grupo carbamoilo situado en el terminal no reductor de la molécula señal procedente de *Rhizobium giardinii* bv. *giardinii* H152, se realiza un espectro de masas CID ES Q-o-TOF en la fracción F3. Se selecciona y se fragmenta el ion-fragmento B<sub>1</sub> a *m/z* 483. El espectro resultante se muestra en la Figura 3.37.



**Figura 3.29.** Espectro de masas CID ES-Q-o-TOF del LCO mayoritario en F3 seleccionando el ion B<sub>1</sub> ( $m/z$  483).

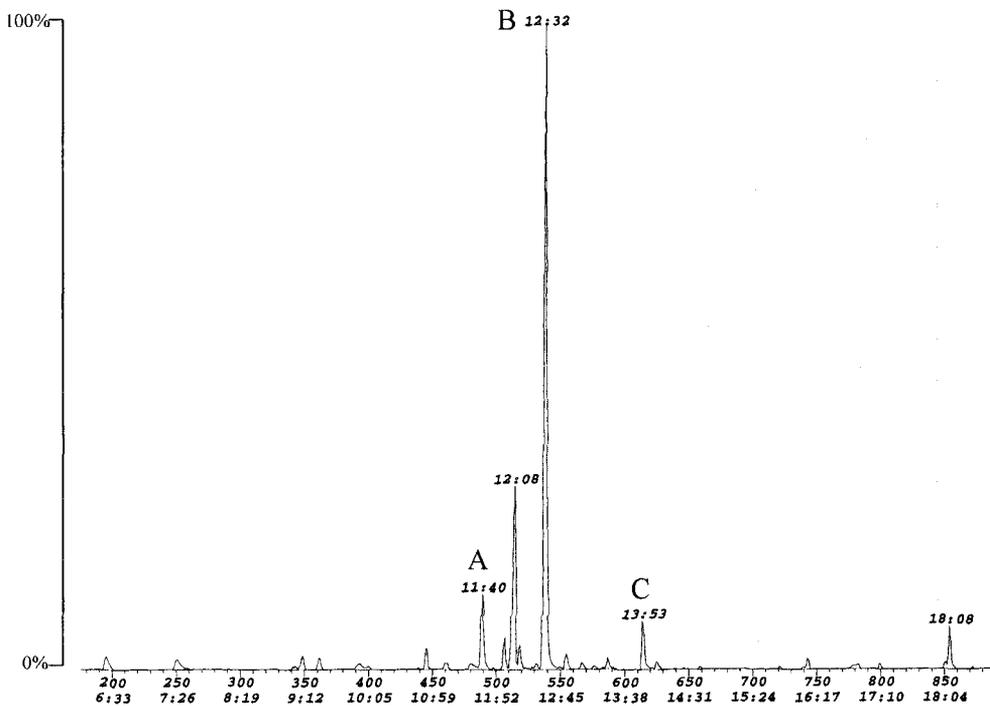
Una relación entre las abundancias de los iones-diagnóstico, **b'** y **a'**, menor de 0,1 ( $b'/a'=0,08$ ), es característica de sustituciones en *O*-4 y en *O*-6.<sup>94</sup> Dado que la relación entre las abundancias de los iones **c'** y **a'** es prácticamente nula, lo que es característico de sustituciones en *O*-6, se deduce que el grupo carbamoilo presente en el componente mayoritario de la fracción F3 se encuentra localizado en *O*-6 del terminal no reductor del oligosacárido.

### 3.1.6. Análisis por metilación

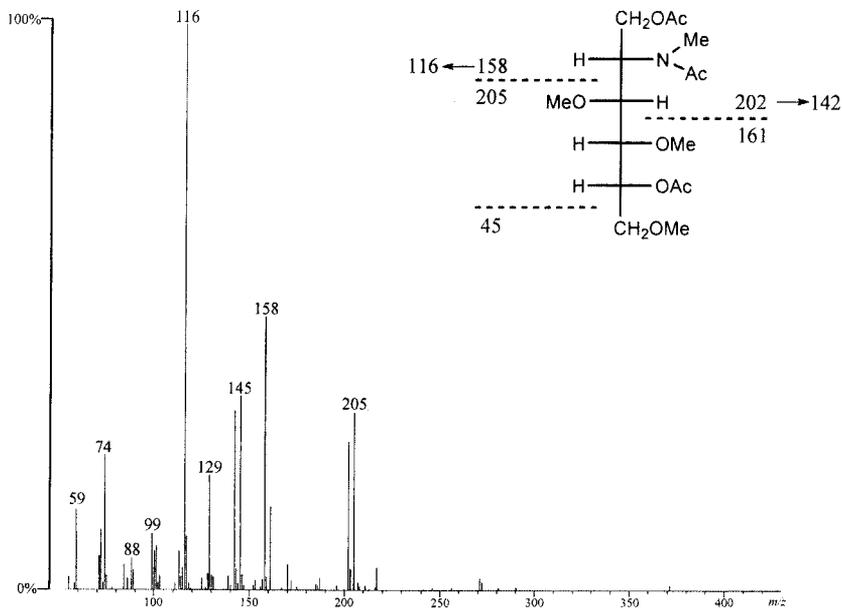
La fracción mayoritaria F3 se somete a un análisis por metilación de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.3.3.1.<sup>54</sup> El oligosacárido permetilado se despolimeriza, se reduce el grupo carbonilo y se acetila obteniéndose acetatos de alditoles parcialmente metilados que se analizan por CGL-EM (Figura 3.32). La identificación de los derivados resultantes proporciona información detallada de las unidades estructurales.

Se identifican los siguientes acetatos de alditoles parcialmente metilados:

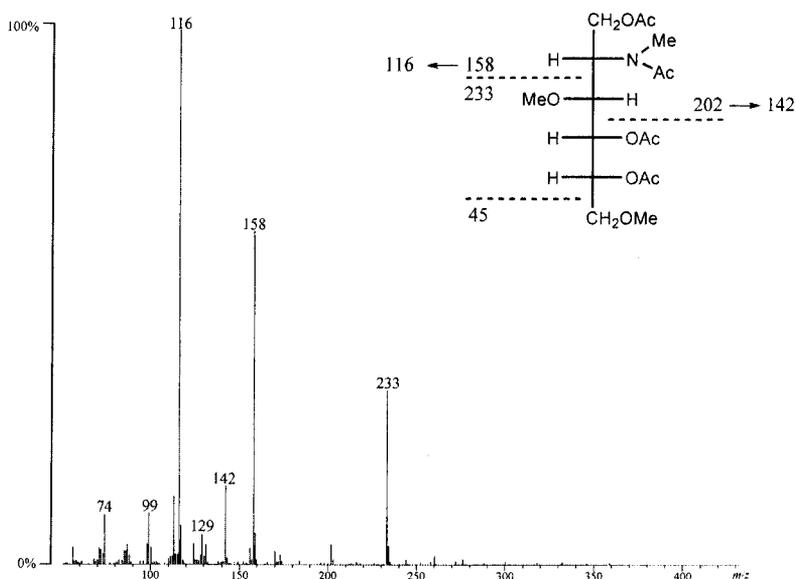
- 1,5-di-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente del terminal no reductor del oligosacárido, que puede estar sustituido o no, por un sustituyente sensible al medio básico (Figura 3.33)
- 1,4,5-tri-*O*-acetil-3,6-di-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente de los residuos internos de *N*-acetilglucosamina del oligosacárido (Figura 3.34).
- 1,4,5,6-tetra-*O*-acetil-3-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente del terminal reductor del oligosacárido y sustituido en O-6 (Figura 3.35).



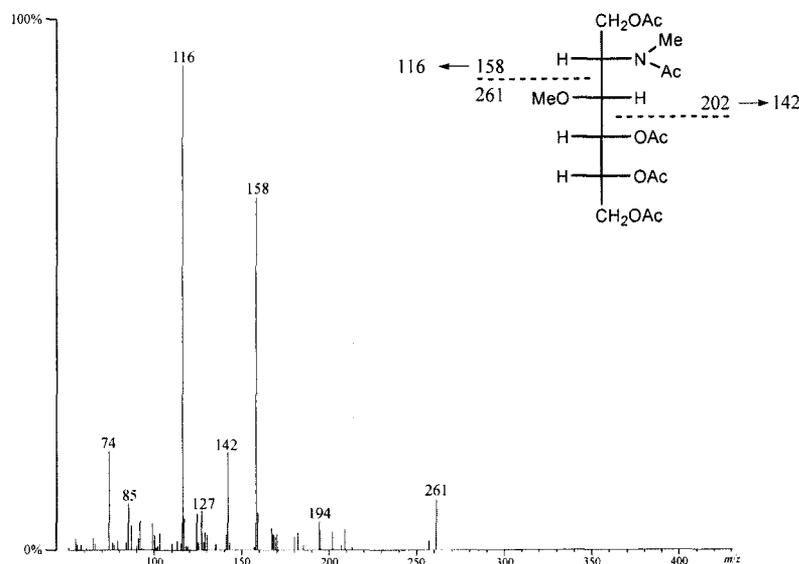
**Figura 3.32.** Cromatograma de CGL-EM de los acetatos de alditoles parcialmente metilados del oligosacárido mayoritario de *R. giardinii* bv. *giardinii* H152.



**Figura 3.33.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,5-di-*O*-acetil-2-desoxi-2-(*N*-metilacetamido)-3,4,6-tri-*O*-metilglucitol procedente del análisis por metilación de la fracción F3 (pico A).



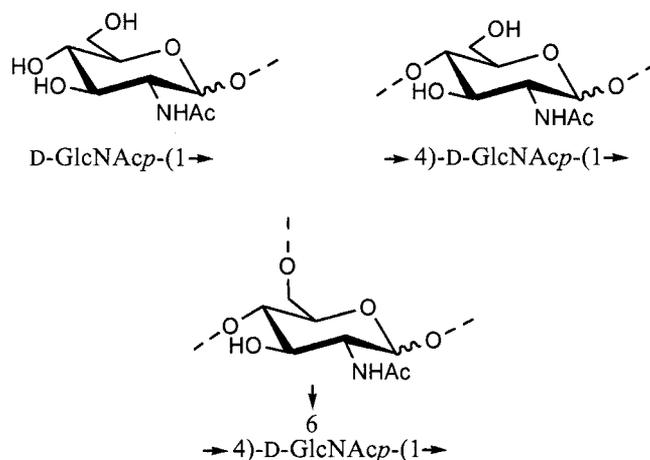
**Figura 3.34.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,4,5-tri-*O*-acetil-2-desoxi-2-(*N*-metilacetamido)-3,6-di-*O*-metilglucitol procedente del análisis por metilación de la fracción F3 (pico B).



**Figura 3.35.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,4,5,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-(*N*-metilacetamido)-3-*O*-metilglucitol procedente del análisis por metilación de la fracción F3 (pico C).

La fracción mayoritaria F3 está compuesta principalmente por el factor de nodulación V ( $C_{18:1}$ , NMe, Cb, S). Este oligosacárido posee dos sustituyentes: un grupo sulfato localizado en el terminal reductor y un grupo carbamoilo localizado en el terminal no reductor como se describe en el apartado 3.5. En el cromatograma obtenido se detecta la presencia de derivados procedentes de glucosamina terminal (pico A), glucosamina sustituida en la posición 4 (pico B) y glucosamina sustituida en las posiciones 4 y 6 (pico C). Véase Figura 3.36.

Dada la naturaleza de este análisis, se pierde la información que permitiría identificar la posición exacta del grupo carbamoilo dentro del terminal no reductor, al ser un sustituyente sensible al medio básico empleado en la metilación. Por el contrario, el grupo sulfato presente en el terminal reductor del oligosacárido resiste esta primera etapa, pero no así la hidrólisis. La presencia de un grupo acetilo en *O*-6 del terminal reductor confirma que el grupo sulfato se encuentra en la posición 6 de dicha unidad del factor de nodulación.



**Figura 3.36.** Monosacáridos que componen los factores de nodulación de *Rhizobium giardinii* bv. *giardinii* H152.

### 3.1.7. Análisis e identificación de los ácidos grasos.

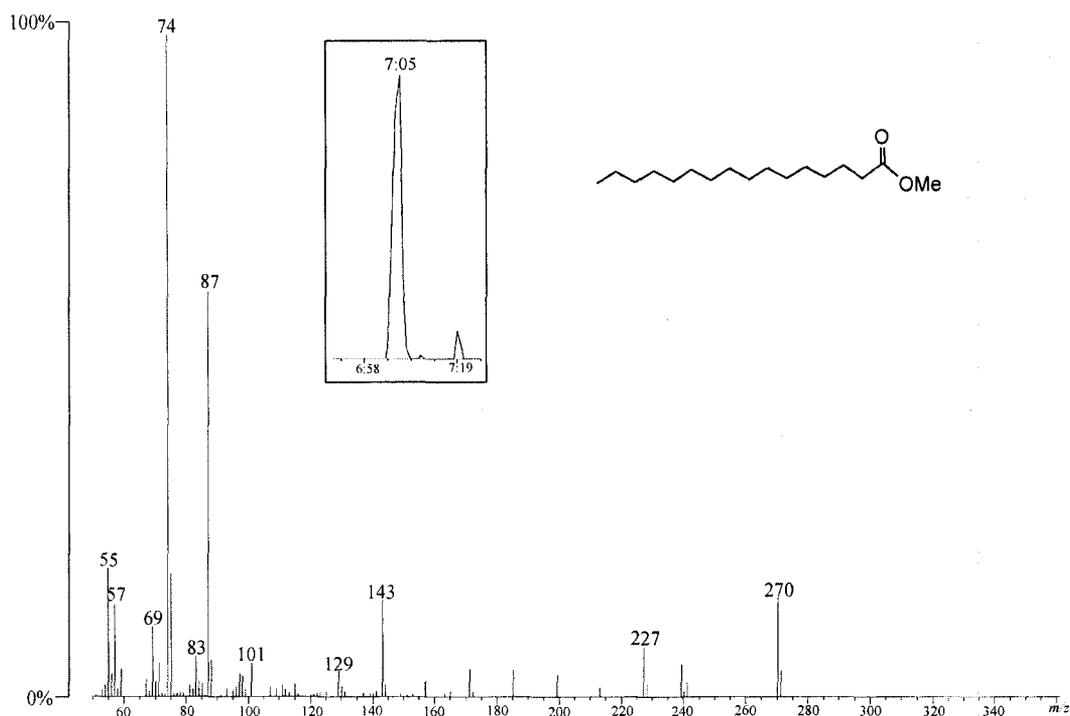
Los ácidos grasos se estudian por CGL-EM mediante la formación de derivados volátiles, en este caso, sus correspondientes ésteres metílicos. La muestra (400  $\mu\text{g}$ ) se trata con HCl/MeOH tal como se describe en el apartado 2.3.4.1. Se analiza por CGL-EM según se detalla en el apartado 2.3.4.4.

En el cromatograma registrado para los ésteres metílicos de los ácidos grasos de alguna de las fracciones, se observa la presencia de ácidos grasos insaturados. Los espectros de masas de los ácidos grasos insaturados difieren muy poco entre sí, y en aquellos casos en que sólo se diferencia en la posición del doble enlace, los espectros son prácticamente idénticos. Se hace por tanto necesario la localización del doble enlace para la identificación del ácido graso insaturado. Ésta se realiza formando los bis-(metiltio) derivados de los ésteres metílicos, por reacción con disulfuro de dimetilo (DMDS), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.4.2.

A continuación se detallan los ácidos grasos encontrados en alguna de las fracciones aisladas:

### Fracción F2

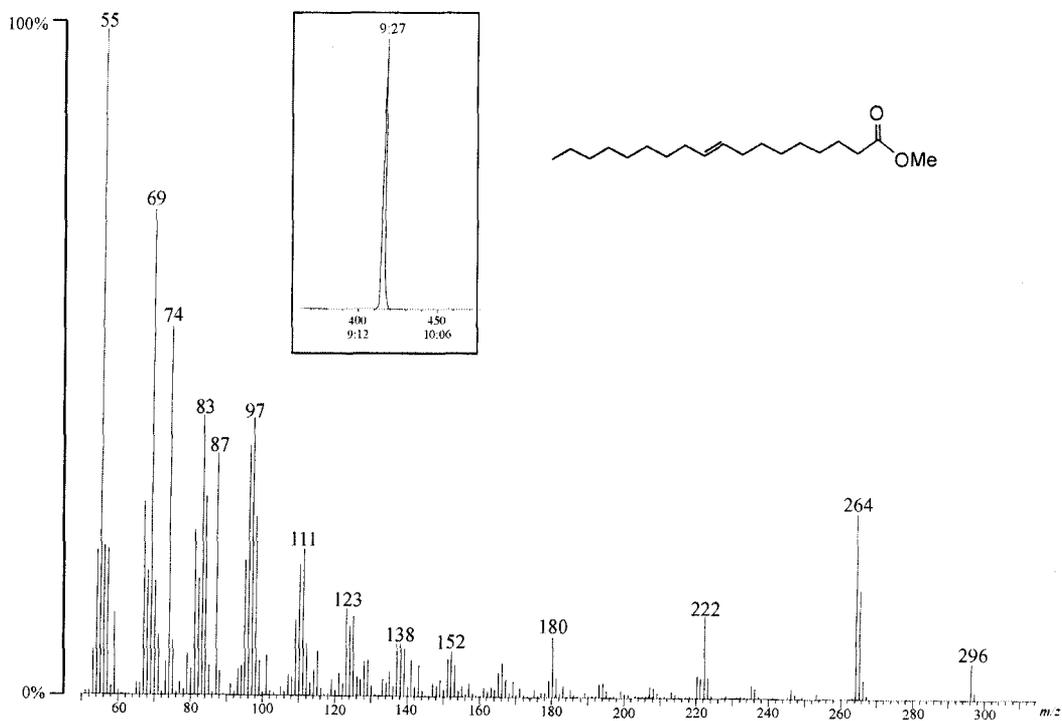
El resultado del análisis de los ésteres metílicos de la fracción F2 se muestra en la Figura 3.37. Se observa un único pico con  $t_R = 7:05$  min que corresponde al metil éster del ácido hexadecanoico o ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ).



**Figura 3.37.** Espectro de masas y cromatograma CGL-EM del éster metílico del ácido graso presente en la fracción F2 ( $t_R = 7:05$  min).

### Fracción F3

El cromatograma y espectro de masas del análisis de los ésteres metílicos de la fracción F3 se muestra en la Figura 3.38. Se observa un único pico con  $t_R = 9:27$  min. El tiempo de retención junto con su espectro de masas permite identificarlo como el ácido octadecenoico ( $C_{18:1}$ ).



**Figura 3.38.** Cromatograma CGL-EM del éster metílico del ácido graso presente en la fracción F3 ( $t_R = 9:27$  min).

El espectro de masas y el pico cromatográfico del bis-(metilitio) derivado del metil éster del ácido octadecenoico presente en la fracción F3 se muestra en la Figura 3.39. En el espectro se asignan los siguientes iones: a  $m/z$  390 corresponde con el ion molecular, los iones a  $m/z$  145 y 245 proceden de la rotura del enlace entre los carbonos 11 y 12, y que prueban la localización del doble enlace sobre el carbono 11, y por último el ion de  $m/z$  213 procede de la pérdida de metanol del fragmento  $m/z$  245. El esquema de fragmentación se muestra en la Figura 3.40.

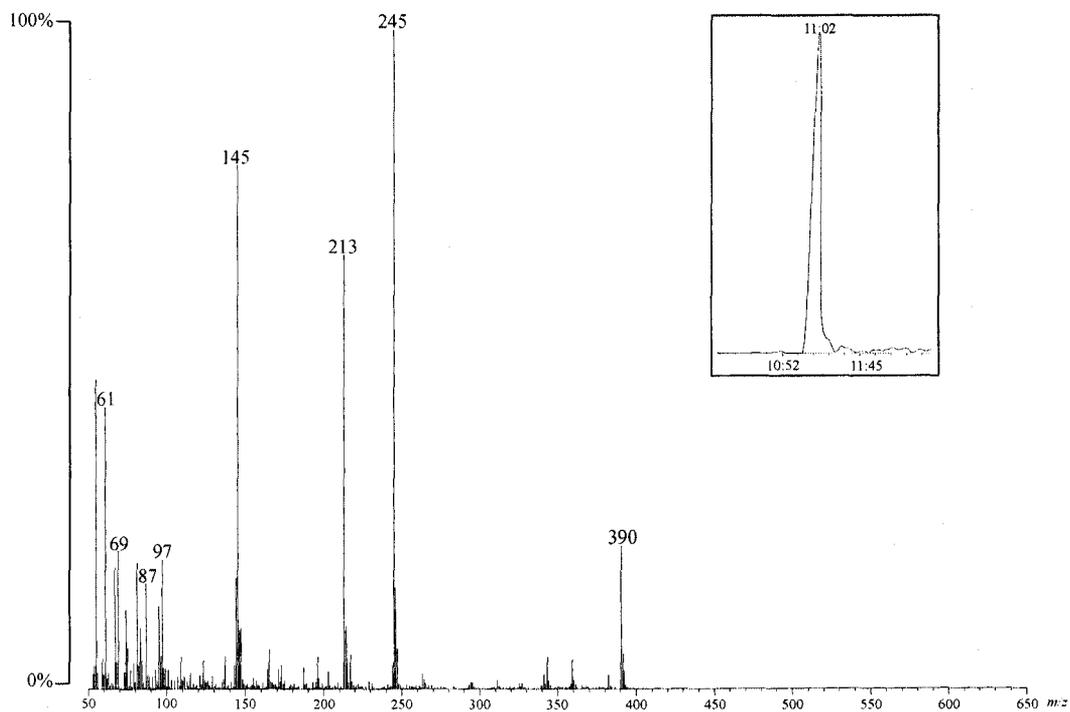


Figura 3.39. Espectro de masas del bis-(metiltio) derivado del éster metílico correspondiente al ácido vacénico ( $C_{18:1\Delta 11}$ ).

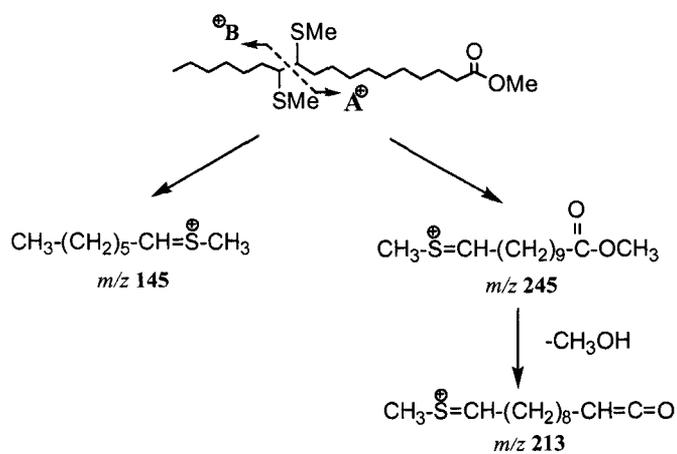
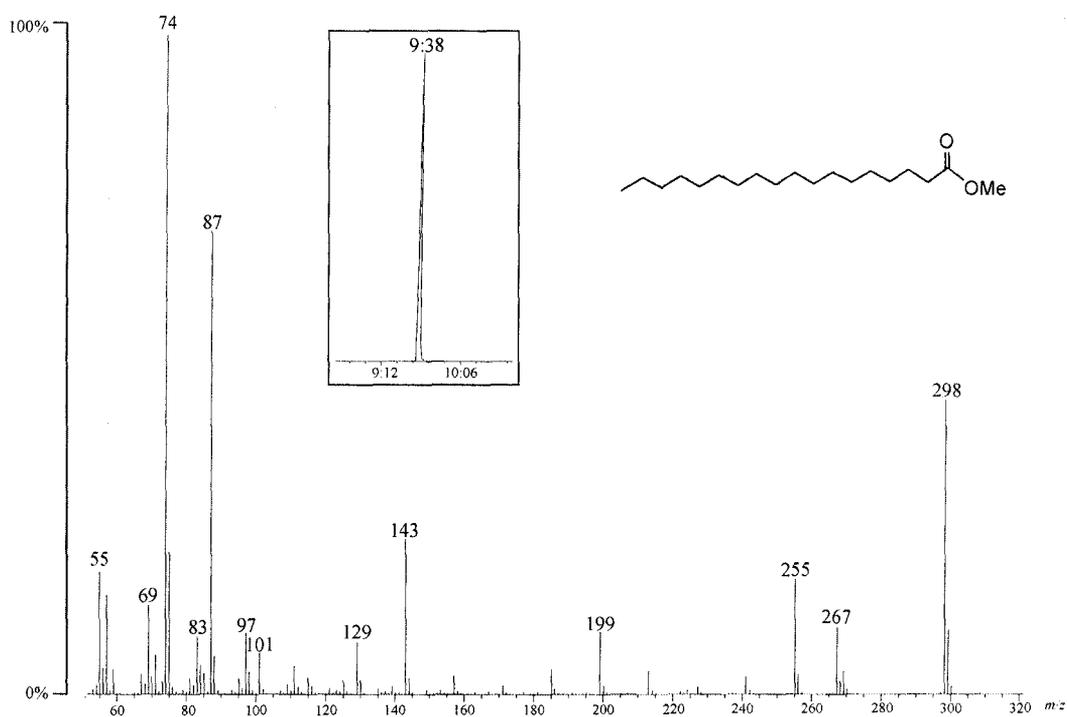


Figura 3.40. Esquema de fragmentación del bis-(metiltio) derivado del éster metílico correspondiente al ácido vacénico ( $C_{18:1\Delta 11}$ )

Por tanto, el ácido graso identificado en la fracción F3 es: Ácido octadec-11-enoico o ácido vacénico ( $C_{18:1\Delta 11}$ )

### Fracción F4

El análisis de los ésteres metílicos realizado sobre la fracción F4 muestra la presencia del ácido octadecanoico o ácido esteárico ( $C_{18:0}$ ). En la Figura 3.41 se muestran el espectro de masas y el pico cromatográfico a  $t_R = 9:38$  min.



**Figura 3.42.** Espectro de masas y cromatograma CGL-EM del éster metílico del ácido graso presente en la fracción F4 ( $t_R = 9:38$  min).

### 3.1.8. Estudio por RMN de la fracción F3

La fracción F3, compuesta principalmente por el factor de nodulación V (C<sub>18:1</sub>, NMe, Cb, S), se estudia por resonancia magnética nuclear. Se realizan los siguientes experimentos: <sup>1</sup>H-RMN (Figura 3.43), <sup>13</sup>C-RMN (Figura 3.44), DBF-COSY (Figura 3.45), HSQC editado (Figura 3.46), 1D-TOCSY (Figuras 3.47, 3.48 y 3.49), NOESY (Figura 3.50) y HMBC (Figura 3.51), llevados a cabo tal y como se describe en el apartado 2.3.6.9.

Las señales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del oligosacárido se asignan a partir de los experimentos <sup>1</sup>H-RMN (Figura 3.43), <sup>13</sup>C-RMN (Figura 3.44), DBF-COSY (Figura 3.45), HSQC editado (Figura 3.46) y 1D-TOCSY (Figuras 3.47, 3.48 y 3.49). Las asignaciones y constantes de acoplamiento se recogen en las Tablas 3.1 y 3.2.

El espectro <sup>1</sup>H-RMN (Figura 3.43) muestra dos regiones bien diferenciadas: una zona a campo alto donde se aprecian señales que pueden asignarse a protones de la cadena alifática del ácido graso (0-3 ppm) y otra zona (entre 3-5 ppm) que corresponde a la región característica de azúcares.

A  $\delta_H = 0,82$  ppm, aparece un triplete que corresponde a un metilo alifático y a  $\delta_H = 1,21$  ppm, un multiplete intenso que se asigna a los grupos metilenos del esqueleto de la cadena alifática. A  $\delta_H = 1,43$  ppm, aparece un multiplete para dos protones, y que puede identificarse con el grupo metileno en  $\beta$  respecto al grupo carbonilo del ácido graso; mientras que el metileno en  $\alpha$  al grupo carbonilo aparece a  $\delta_H = 2,24$  ppm. Un multiplete que aparece a  $\delta_H = 1,95$  ppm y que corresponde a cuatro protones, se asigna a los dos metilenos contiguos al doble enlace. Finalmente a  $\delta_H = 5,32$  ppm y  $^3J = 4,6$  Hz, aparece un multiplete que se corresponde con dos protones, y que se correlaciona en el espectro HSQC-ed con una señal a  $\delta_C = 130,0$  ppm; esta señal se asigna a los protones olefinicos del ácido graso insaturado. En la Figura 3.49, se muestra el subespectro 1D-TOCSY obtenido mediante excitación selectiva de la señal a  $\delta_H = 1,21$  ppm, en el que se identifica todo el sistema de espín del ácido graso.

A  $\delta_H = 2,71$  ppm y  $2,83$  ppm, aparecen dos singuletes que corresponden a los conformeros *cis* y *trans*, del grupo *N*-Me con respecto al átomo de oxígeno del carbonilo del ácido graso, respectivamente (Figura 3.43). El experimento 1D-NOESY (Figura 3.50) confirma que el grupo *N*-Me está situado en el terminal no reductor del oligosacárido. Aparecen, además, varios singuletes entre  $1,80$  y  $1,85$  ppm que corresponden a los grupos acetilos del oligosacárido

En la región de los protones anoméricos se muestra dos señales a campo bajo, la primera a  $\delta_H$  4,86 ppm, un doblete con  $J_{1,2} = 2,1$  Hz y correlacionado en el espectro HSQC (Figura 3.46) con una señal de carbono a  $\delta_C = 90,2$  ppm, que se asigna al protón anomérico  $\alpha$  del terminal reductor del oligosacárido; la segunda a  $\delta_H$  4,74 ppm ( $J_{1,2} = 8,2$  Hz) se correlaciona con una señal de carbono a 98,7 ppm y se asigna al protón y carbono anomérico  $\beta$  de la glucosamina terminal no reductora, desplazado a campo más bajo con respecto al resto de protones de anomería  $\beta$  como consecuencia de la sustitución del nitrógeno por un metilo en este residuo. Las señales a  $\delta_H$  4,31-4,45 ppm y  $\delta_C$  101,3-101,5 ppm se deben a los protones y carbonos  $\beta$  de los residuos de *N*-acetilglucosamina internos. Las señales entre  $\delta_H$  4,17-3,22 ppm se asignan al resto de protones de azúcar.

Finalmente, el espectro de  $^{13}C$ -RMN (Figura 3.44) muestra señales a  $\delta_C$  173,5, 169,4-169,6 y 156,6 ppm asignadas a los carbonos carbonílicos del ácido graso, acetilos y carbamoilo, respectivamente.

Con el fin de completar la asignación de las señales correspondientes a los terminales reductor y no reductor del oligosacárido se realizan experimentos de excitación selectiva 1D-TOCSY (Figuras 3.47 y 3.48).

La excitación selectiva del protón anomérico  $\alpha$  del terminal reductor del factor de nodulación se lleva a cabo mediante un tren de pulsos DANTE-Z, usando diferentes tiempos de mezcla isotrópicos (23, 46, 92 y 276 ms), lo que permite la asignación de todos los protones pertenecientes a ese sistema de espín (Figura 3.47). La señal correspondiente a C-4 está desplazada a campo bajo ( $\delta_C$  81,5 ppm), indicando que la posición en O-4 está sustituida. El carbono C-6 se identifica fácilmente gracias a su naturaleza metilénica, ya que aparece con signo negativo en el espectro HSQC-ed (Figura 3.46). H-6 y C-6 están desplazados a campo más bajo de su valor esperado, indicando que esta posición del azúcar también se encuentra sustituida. Estos resultados sugieren que el grupo sulfato, identificado en el análisis por Espectrometría de Masas, está unido al terminal reductor en O-6. Esta conclusión está de acuerdo con los resultados del análisis por metilación.

La selección del protón anomérico perteneciente a la glucosamina que forma el terminal no reductor del oligosacárido a  $\delta_H$  4,74 ppm, permite identificar todos los protones a este sistema de espín (Figura 3.48). El desplazamiento químico de C-4 a 70,1 ppm indica que esta posición no se encuentra sustituida. Además, los valores para H-6 y C-6 a  $\delta_H = 3,95$  y 4,17 y  $\delta_C = 62,9$  ppm, situados a campo más bajo de lo esperado, indican que la posición 6 del terminal no reductor se encuentra sustituida, en este caso por el grupo carbamoilo. Esta suposición se confirma cuando se realiza un experimento

HMBC (Figura 3.51) donde se observa un pico de cruce entre el carbono carbonílico del grupo carbamoilo y *H*-6 de este residuo ( $\delta_H = 3,95$  ppm). Esta conclusión es consistente con los resultados del experimento CID ES-Q-o-TOF realizado sobre el fragmento  $B_1$  ( $m/z$  483). En este mismo experimento pueden observarse las correlaciones *C*-4/*H*-1 de los azúcares enlazados mediante enlace (1→4).

De acuerdo con estos resultados, la estructura propuesta para el factor de nodulación mayoritario [V (C<sub>18:1</sub>, NMe, S, Cb)] presente en la fracción F3 se muestra en la Figura 3.52.

Residuos	Posición							
		1	2	3	4	5	6a	6b
→4)-6-O-NaSO <sub>3</sub> -α-D-GlcNAc <b>A</b>	$\delta_H$	4,86	3,59	3,29	3,29	3,77	3,97	3,79
	$J$	2,1 (1,2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	$\delta_C$	90,2	53,5	73,0	81,5	67,5	64,4	
→4)-6-O-NaSO <sub>3</sub> -β-D-GlcNAc <b>D</b>	$\delta_H$	4,43						
	$\delta_C$	95,0						
→4)-β-D-GlcNAc-(1→ <b>C</b>	$\delta_H$	4,31-4,45	3,44-3,60	3,45-3,58	3,20-3,40	3,20-3,27	3,61	3,36
	$\delta_C$	101,3-101,5	53,9-54,7	68,4-72,1	80,3-81,0	74,3-74,8	59,9	
6-O-Cb-β-D-GlcNMeAcil-(1→ <b>B</b>	$\delta_H$	4,74	3,36	3,52	3,23	3,50	4,17	3,95
	$J$	8,2 (1,2)	9,6 (2,3)	8,2 (3,4)	8,2 (4,5)	n.d. (5,6)	-11,1 (6a, 6b)	
	$\delta_C$	98,7	62,3	70,1	70,1	73,7	62,9	

**Tabla 3.1.** Desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (en ppm) y constantes de acoplamiento (en Hz) de los azúcares del factor de nodulación V (C<sub>18:1</sub>, NMe, S, Cb) presente en F3

Cadenas laterales	Posición							
	1	2	3	4-9	10,13	11,12	14-17	18
Ácido Graso (C <sub>18:1</sub> )	$\delta_H$	2,24	1,43	1,21	1,95	5,30	1,21	0,82
	$\delta_C$	173,5	32,5	24,6	22,0-31,0	26,5	130,0	22,0-31,0
Metilo	$\delta_H$	<i>cis</i> 2,71 <i>trans</i> 2,83						
	$\delta_C$	27,3						
Acetilo	$\delta_H$	1,80-1,85						
	$\delta_C$	169,4-169,6	22,0-22,8					
Carbamóilo	$\delta_C$	156,6						

**Tabla 3.2.** Desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (en ppm) de las cadenas laterales del factor de nodulación V (C<sub>18:1</sub>, NMe, S, Cb) presente en F3.

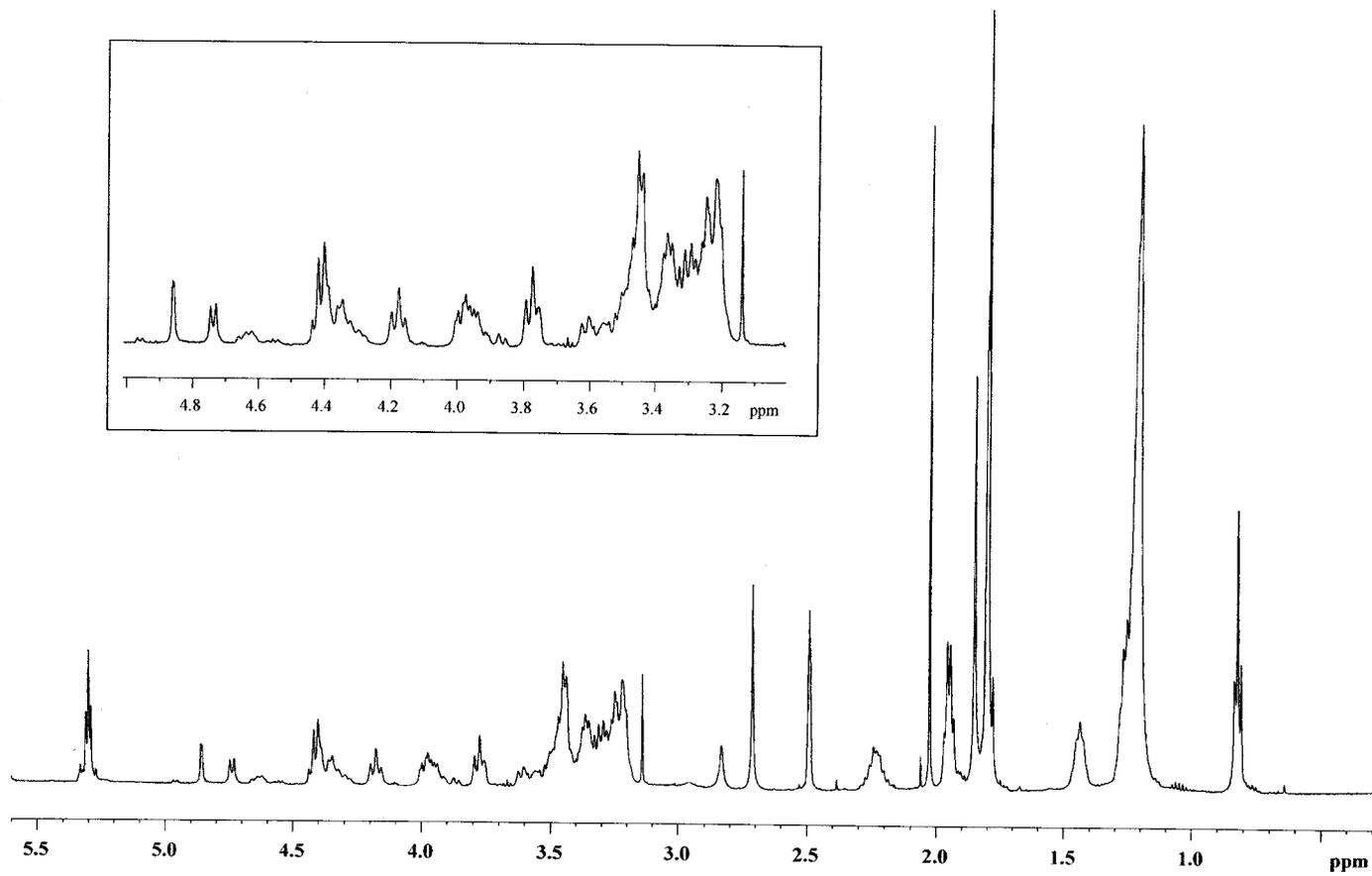
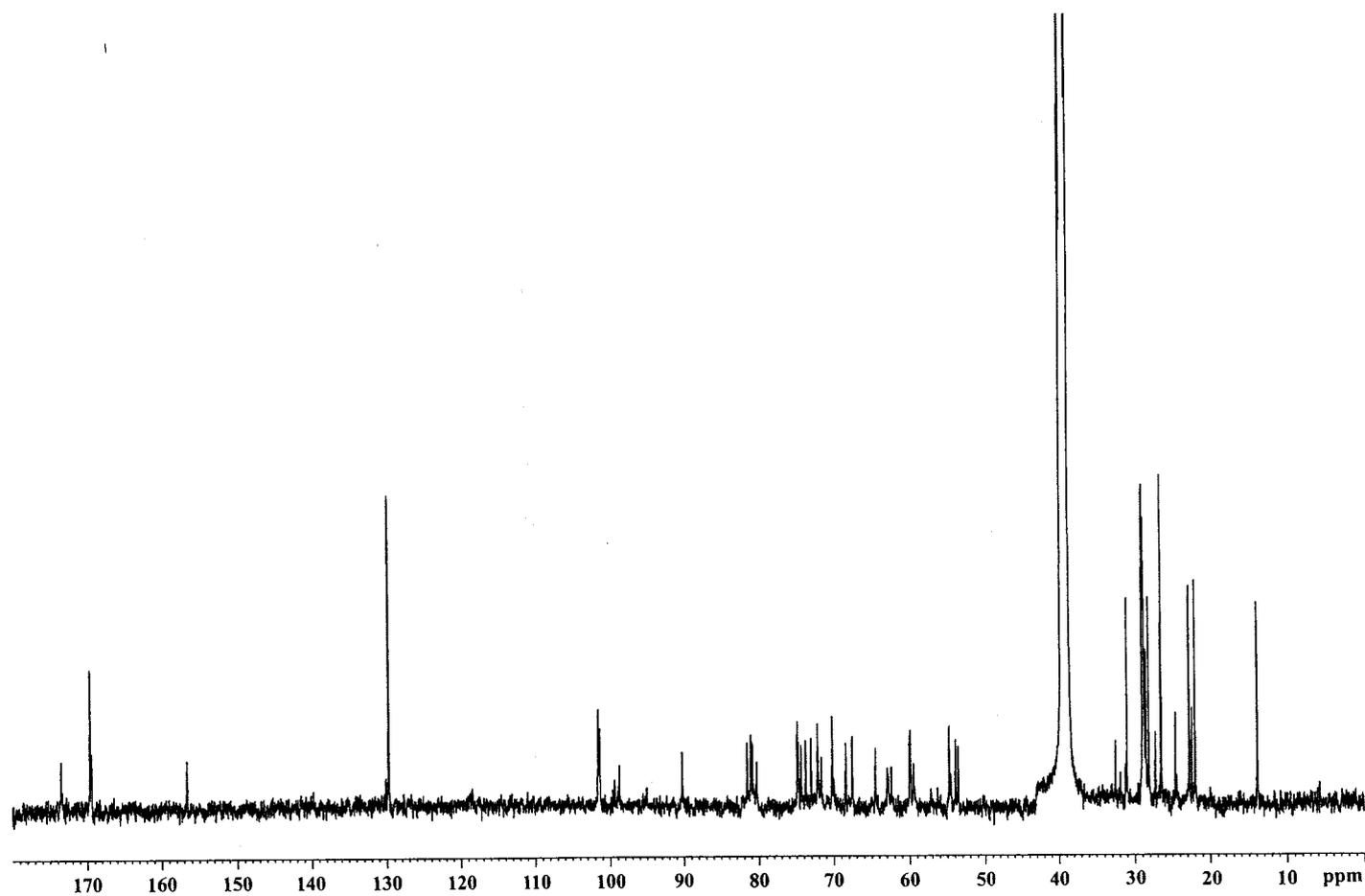
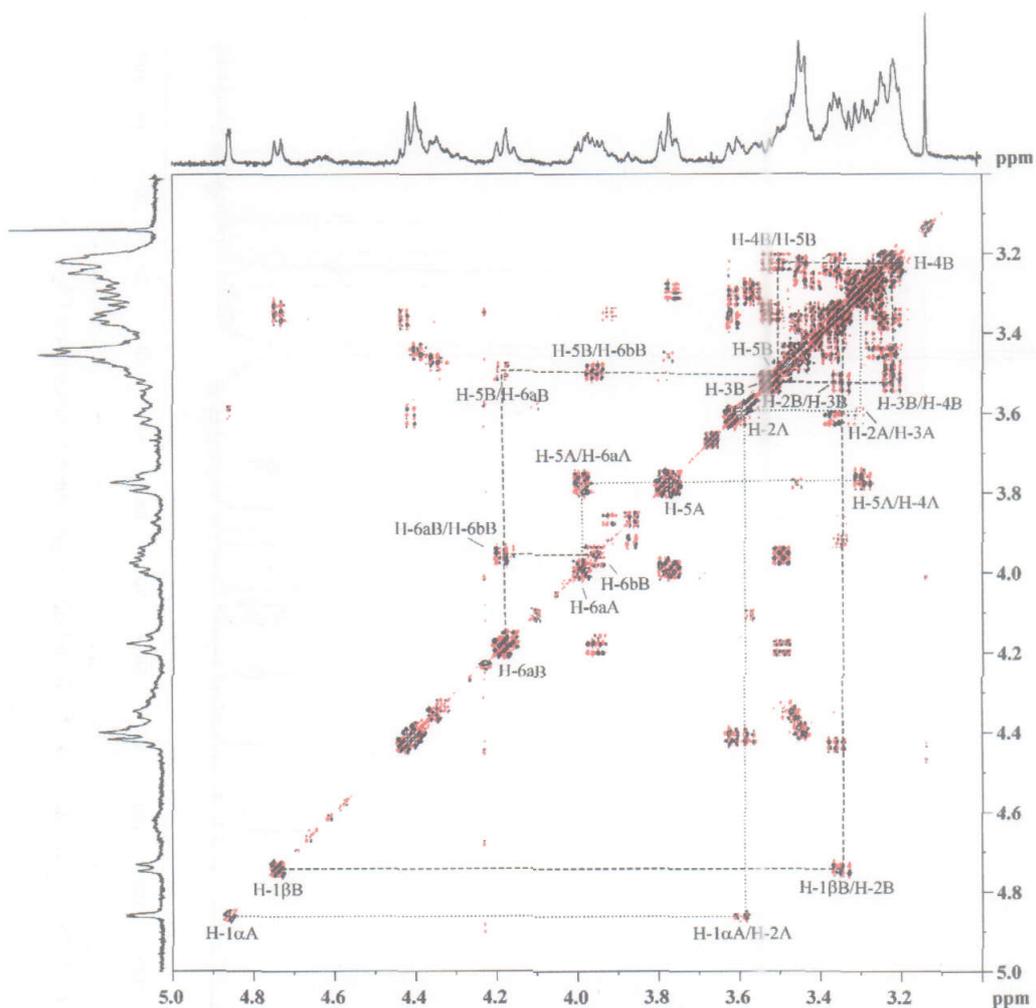


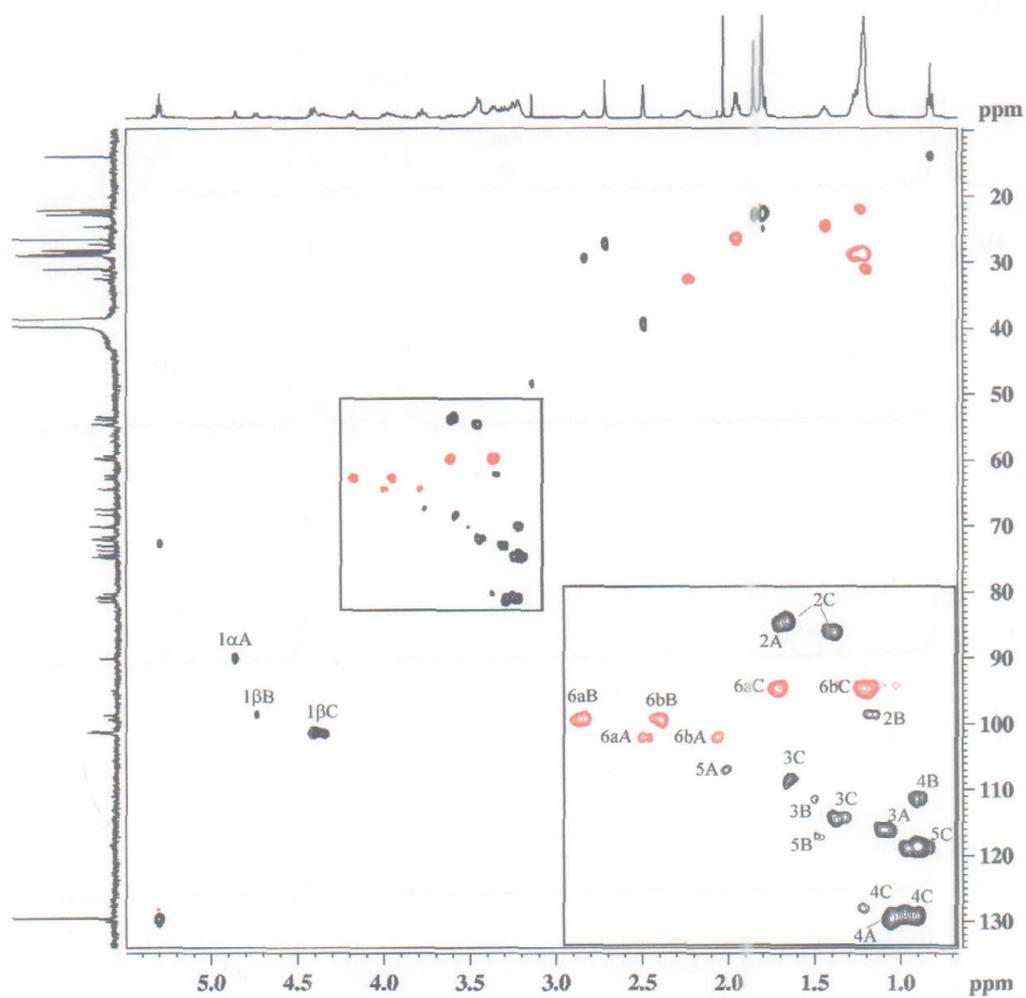
Figura 3.43. Espectro  $^1\text{H}$  RMN y ampliación, registrado a 500 MHz del oligosacárido mayoritario en F3.



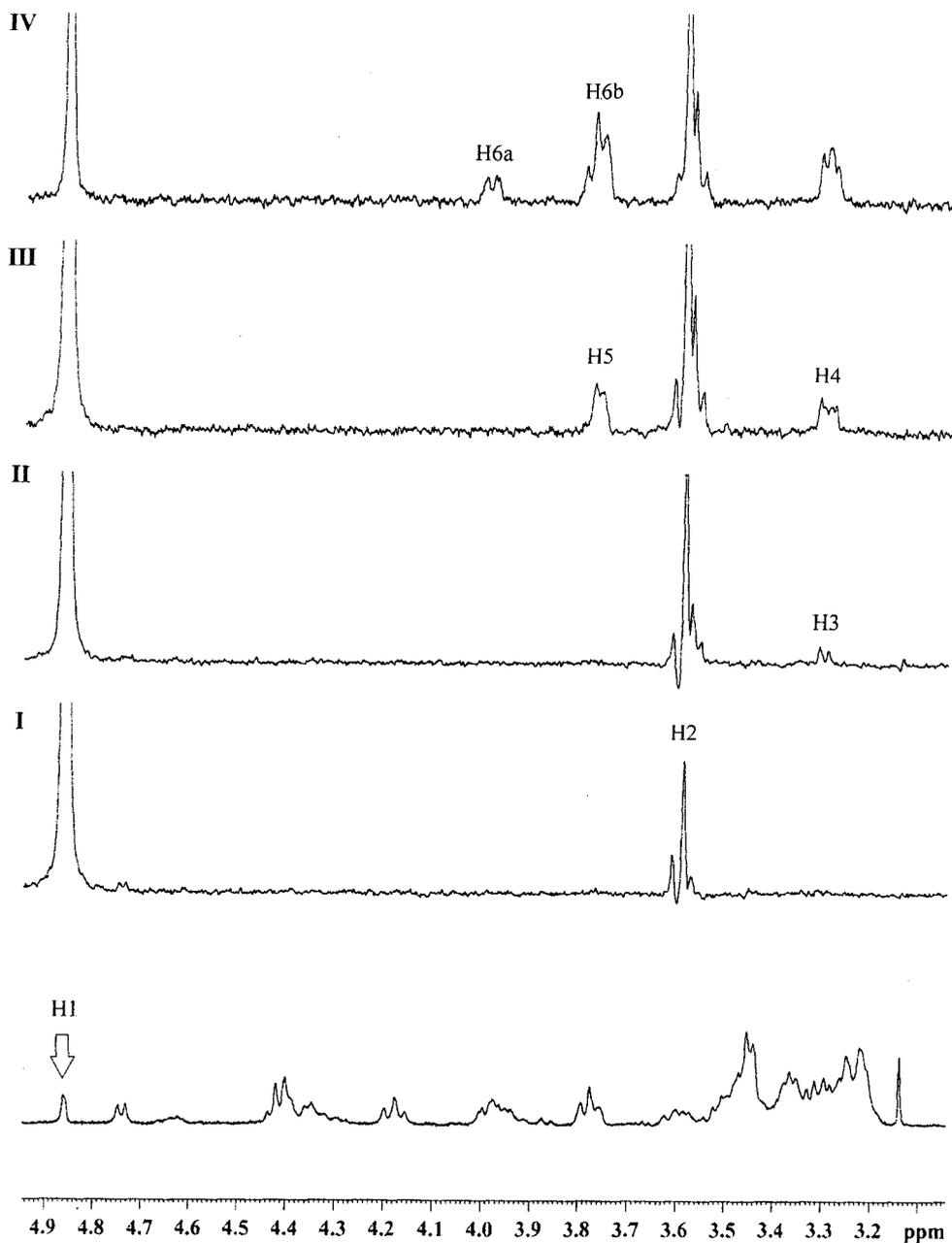
**Figura 3.44.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN registrado a 500 MHz del oligosacárido mayoritario en F3.



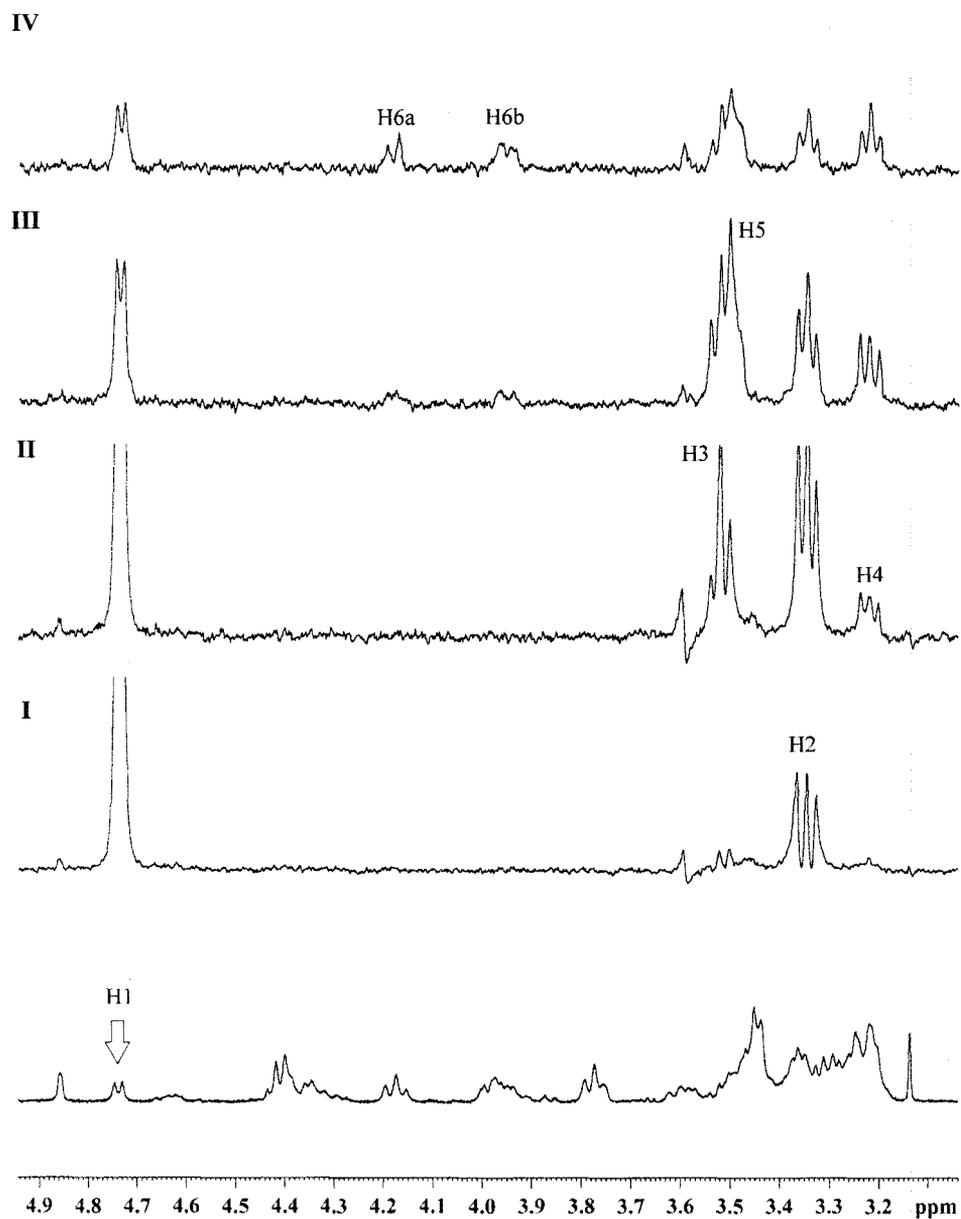
**Figura 3.45.** Espectro DBF-COSY del oligosacárido mayoritario presente en F3 registrado a 500 MHz.



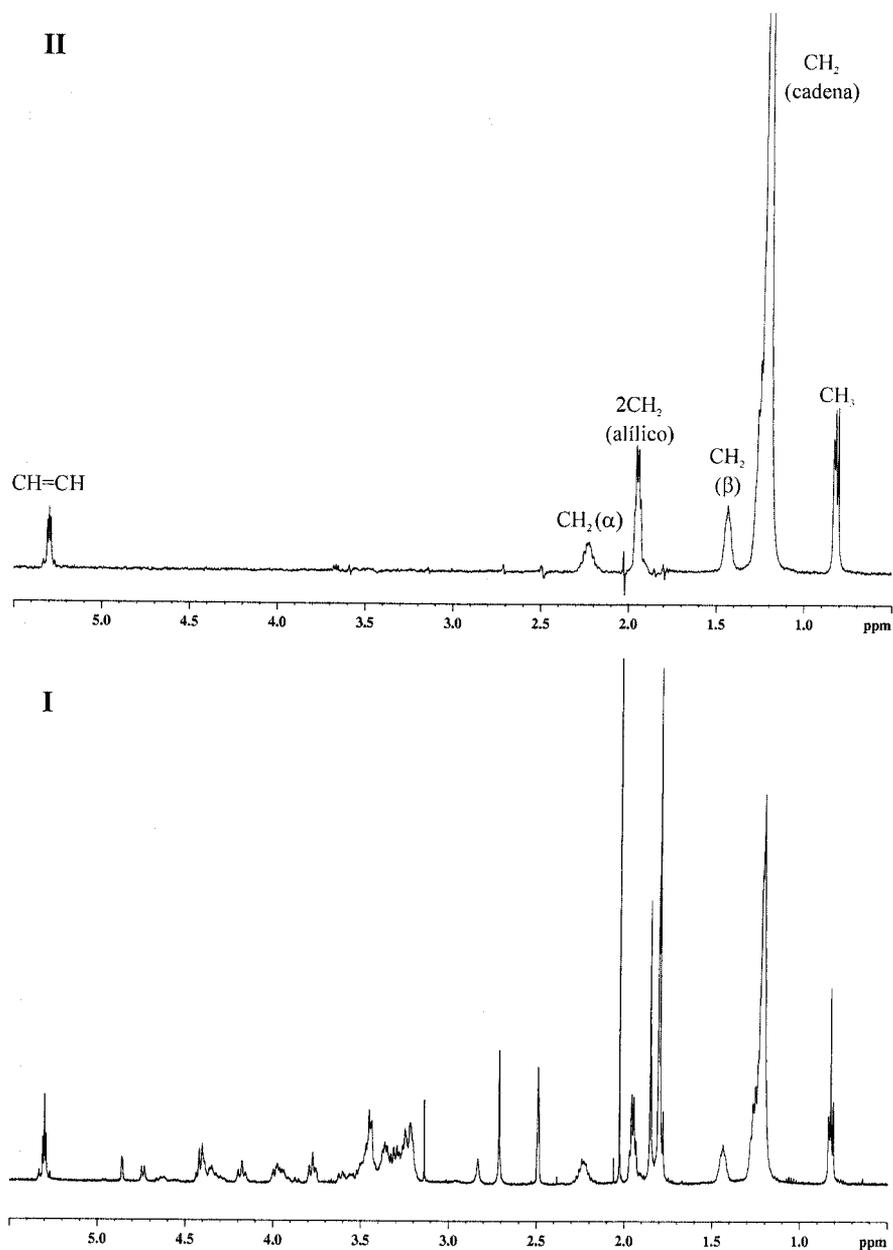
**Figura 3.46.** Espectro HSQC editado y ampliación, del oligosacárido mayoritario presente en F3 registrado a 500 MHz. Las señales en rojo corresponden a carbonos metilénicos.



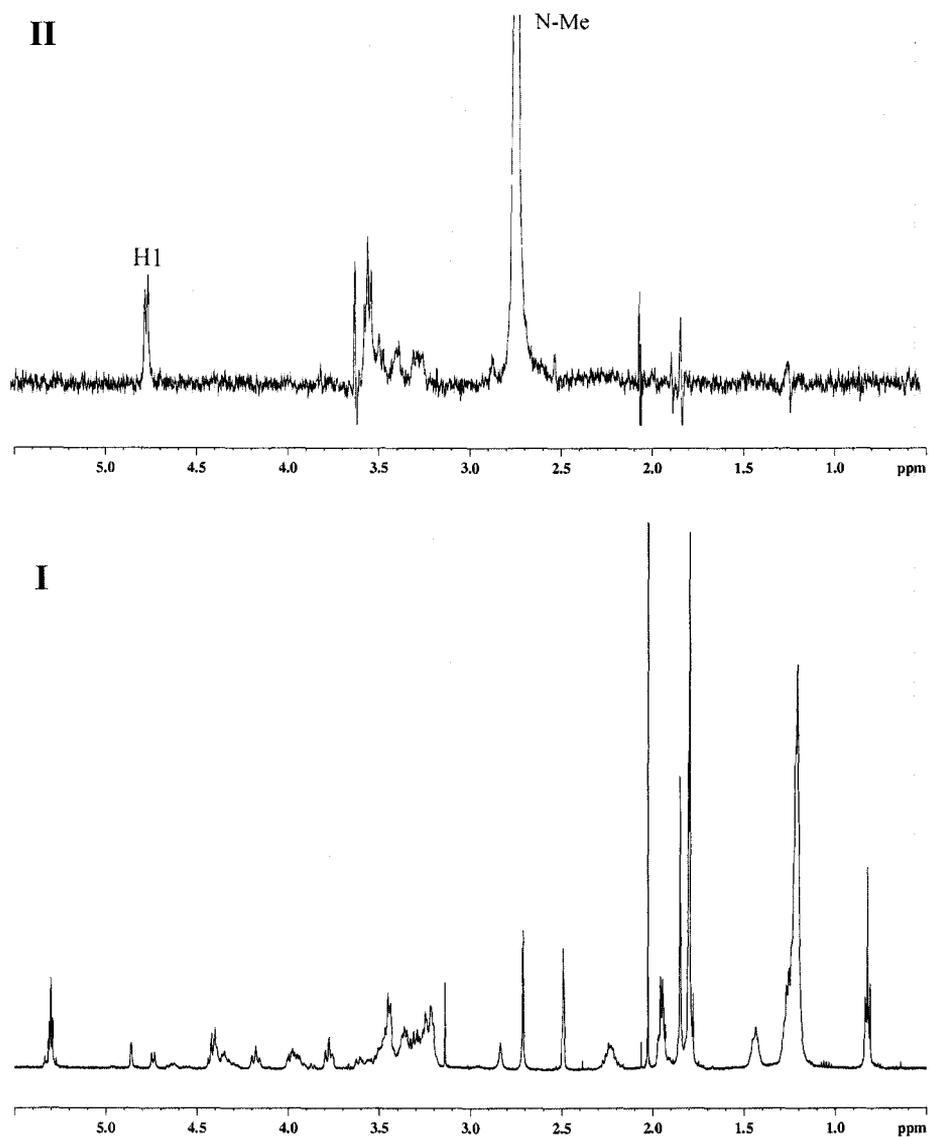
**Figura 3.47.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN y subspectros 1D-TOCSY registrados a 500 MHz de la fracción F3. La excitación selectiva de la señal a  $\delta_{\text{H}}$  4,86 ppm se ha realizado con diferentes tiempos de mezcla isotrópicos: 23, 46, 92 y 296 ms, (I, II, III y IV, respectivamente).



**Figura 3.48.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN y subspectros 1D-TOCSY registrados a 500 MHz de la fracción F3. La excitación selectiva de la señal a  $\delta_{\text{H}}$  4,74 ppm se ha realizado con diferentes tiempos de mezcla isotrópicos: 23, 46, 92 y 296 ms (I, II, III y IV, respectivamente).



**Figura 3.49.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del factor de nodulación mayoritario en F3 (I) y subspectro 1D-TOCSY (II) obtenido mediante excitación selectiva de la señal a  $\delta_{\text{H}}=1,21$  ppm (correspondiente a los metilenos de la cadena del ácido graso).



**Figura 3.50.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del factor de nodulación mayoritario en F3 (I) y subspectro 1D-NOESY (II), registrados a 500 MHz.

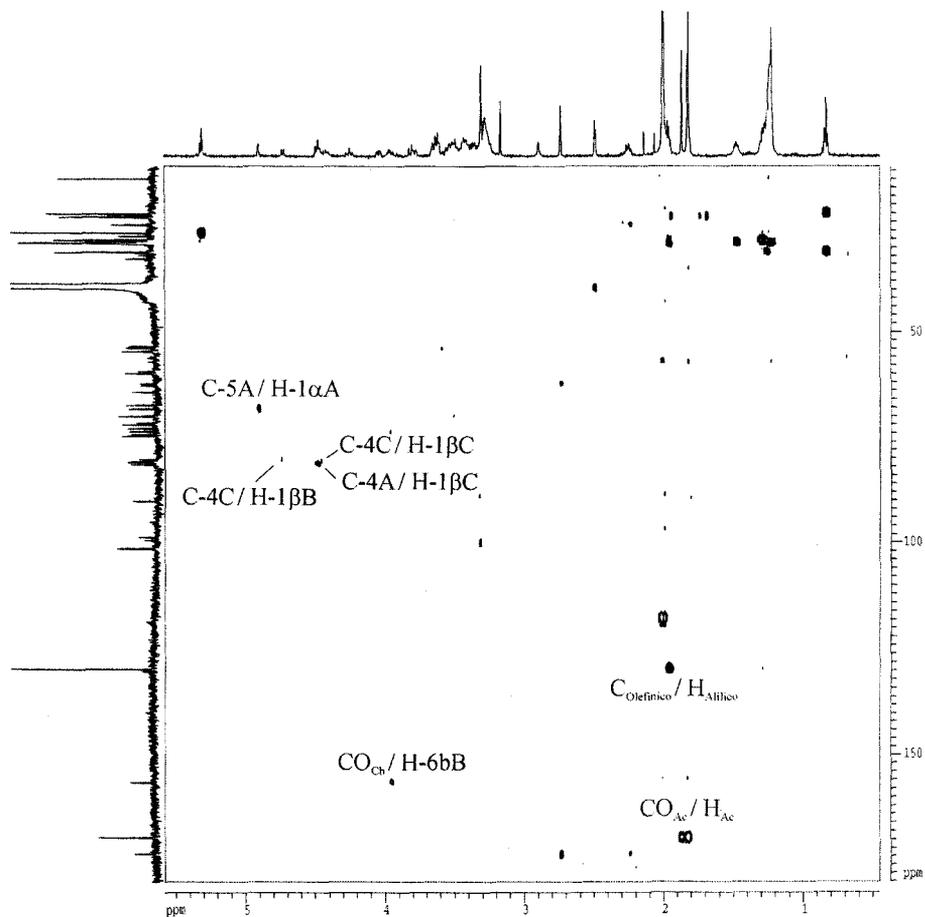


Figura 3.51. Espectro HMBC del factor de nodulación mayoritario en F3.

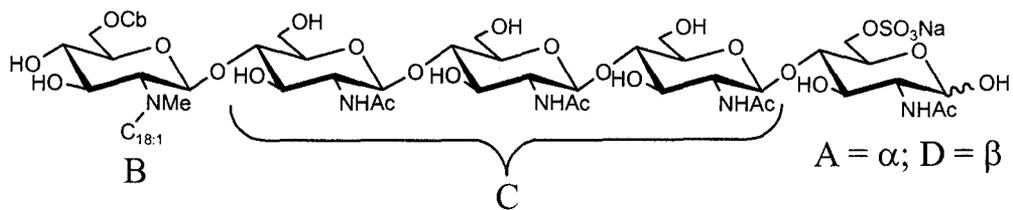


Figura 3.52. Estructura propuesta para V ( $C_{18:1}$ , NMe, S, Cb)

4. FACTORES DE NODULACIÓN DE  
*R. gallicum* bv. *gallicum* R602

#### 4.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN AISLADOS DE *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602.

*Rhizobium gallicum* está presente en suelos europeos, australianos<sup>95</sup> y africanos<sup>90</sup> y fue aislada por primera vez en Francia.<sup>89</sup> En este capítulo se describe la determinación estructural de los factores de nodulación producidos por la cepa *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602, bacteria que nodula en *Phaseolus vulgaris* (judía).

##### 4.1.1. Cultivo de bacterias y cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.

###### 4.1.1.1. Cultivo de bacterias.

El cultivo de *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602 se realiza según las condiciones descritas en apartado 2.1.1. Se emplea el medio mínimo B<sup>-41</sup> para el crecimiento de las células al que se añade genisteína para inducir la producción de los factores de nodulación.

###### 4.1.1.2 Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.

Los factores de nodulación se marcan con un isótopo radiactivo *in vivo* y se analizan por cromatografía en capa fina usando el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2. Se preparan dos cultivos inducidos con genisteína: cultivo **A** y cultivo **B**. El cultivo **A** se marca con 0,5 µCi de clorhidrato de <sup>14</sup>C-glucosamina y el cultivo **B** con 3 µCi de Mg<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>, que se depositan en la placa de cromatografía en capa fina. Se eluye con acetonitrilo:agua (1:1) y se revela tal y como se indica en el apartado 2.1.2.

Se detectan dos bandas que dan señal positiva al marcaje con <sup>14</sup>C-glucosamina y con Mg<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>, lo que indica que los factores de nodulación producidos por *R. gallicum* bv. *gallicum* R602 podrían estar sulfatados. La placa de c.c.f. obtenida se muestra en la Figura 4.1

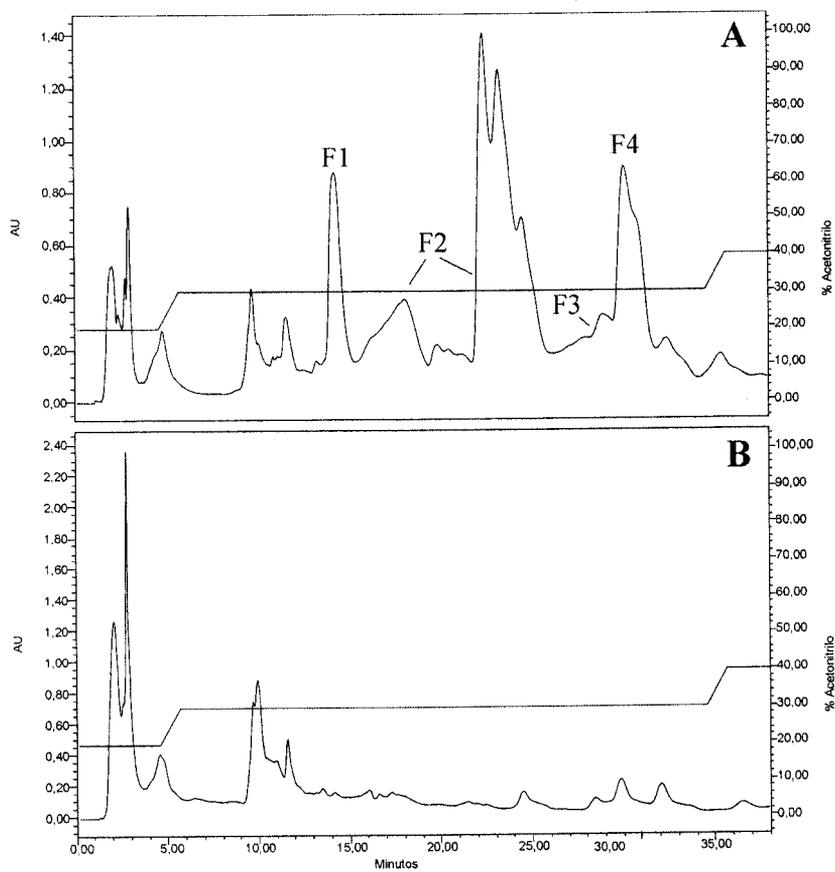


**Figura 4.1.** C.c.f del cultivo inducido con genisteína marcado con  $^{14}\text{C}$ -glucosamina (A) y con  $\text{Mg}^{35}\text{SO}_4$  (B)

#### 4.1.2. Aislamiento y purificación de los factores de nodulación.

Se emplea un cultivo crecido en medio mínimo B<sup>-</sup> e inducido con genisteína para el aislamiento de los factores de nodulación (10 l), y un cultivo no inducido como control negativo (5 l). Cada uno de ellos se extraen con *n*-butanol<sup>41</sup> y los extractos se tratan como se indica en el apartado 2.2.2.1. Se concentran a sequedad y se redisuelven en acetonitrilo al 60 %. Posteriormente, las disoluciones resultantes se diluyen con agua hasta el 20 % de acetonitrilo y se purifican por extracción en fase sólida. Las fracciones correspondientes a la elución con acetonitrilo al 20, 45 y 60 % se concentran y se liofilizan. Por último, la fracción del 45%, que es la que contiene mayoritariamente a los factores de nodulación, se cromatografía por HPLC según las condiciones descritas en el apartado 2.2.2.2.

Los cromatogramas de HPLC que se obtienen para la fracción al 45% del cultivo inducido (A) y no inducido (B) se muestran en la Figura 4.2.



**Figura 4.2.** Cromatogramas de HPLC de la fracción purificada con acetonitrilo al 45% **A.** cultivo inducido **B.** cultivo no inducido. Se indican las fracciones aisladas.

Se aíslan cuatro fracciones (F1-F4) que se eluyen al 30% de acetonitrilo. Posteriormente, se concentran y se liofilizan, obteniéndose las siguientes cantidades:

F1 ..... 800  $\mu$ g

F3 ..... 600  $\mu$ g

F2 ..... 2,2 mg

F4 ..... 500  $\mu$ g

#### 4.1.3. Análisis de azúcares.

El análisis de los azúcares que componen los factores de nodulación que produce *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602 se realiza a través de la formación de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, tal y como se describe en el apartado 2.3.1.1. Los derivados se analizan por CGL-EM según la instrumentación y las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 2.3.1.3. El cromatograma y los espectros de masas obtenidos para la fracción F2 se muestran en las Figuras 4.3, 4.4 y 4.5, respectivamente.

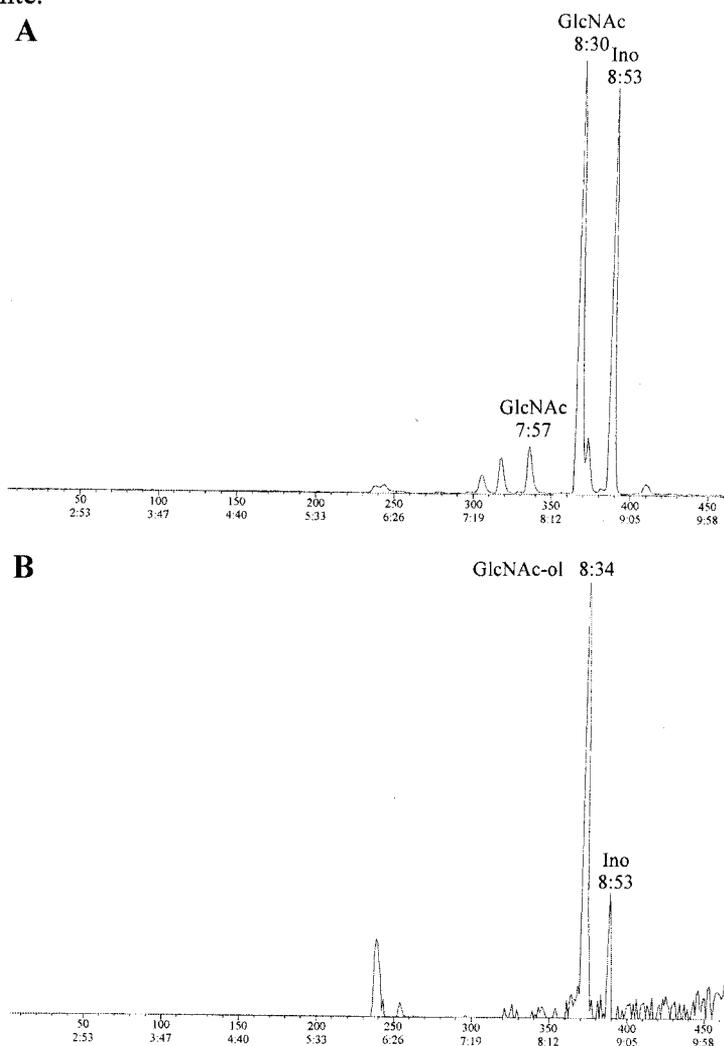


Figura 4.3. Cromatogramas de CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos procedentes de la fracción F2 siguiendo el ion a  $m/z$  173 (A) y  $m/z$  378 (B).

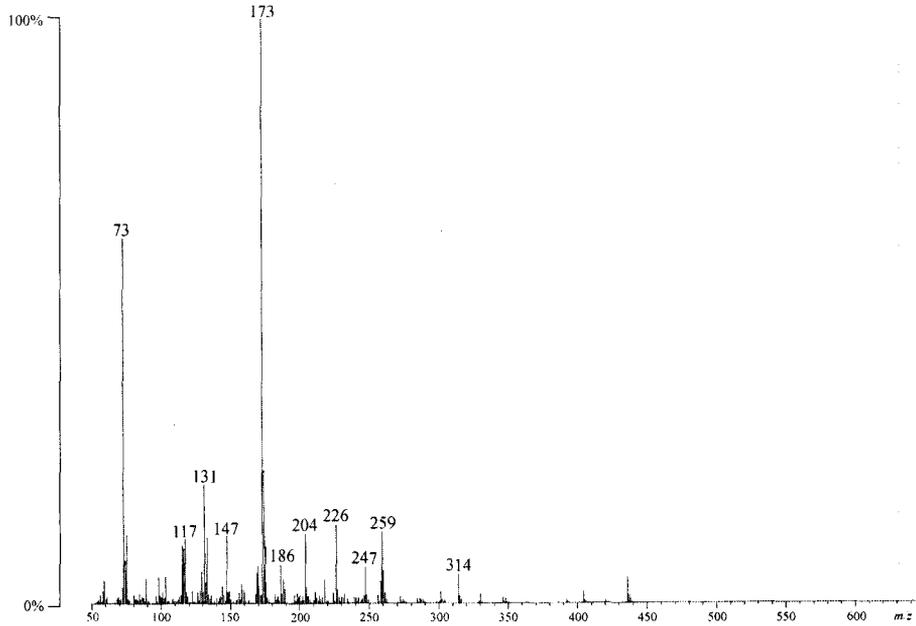


Figura 4.4. Espectro de masas del pico a  $t_R = 8:30$  min correspondiente al *O*-trimetilsililderivado del metil glicósido de la *N*-acetilglucosamina.

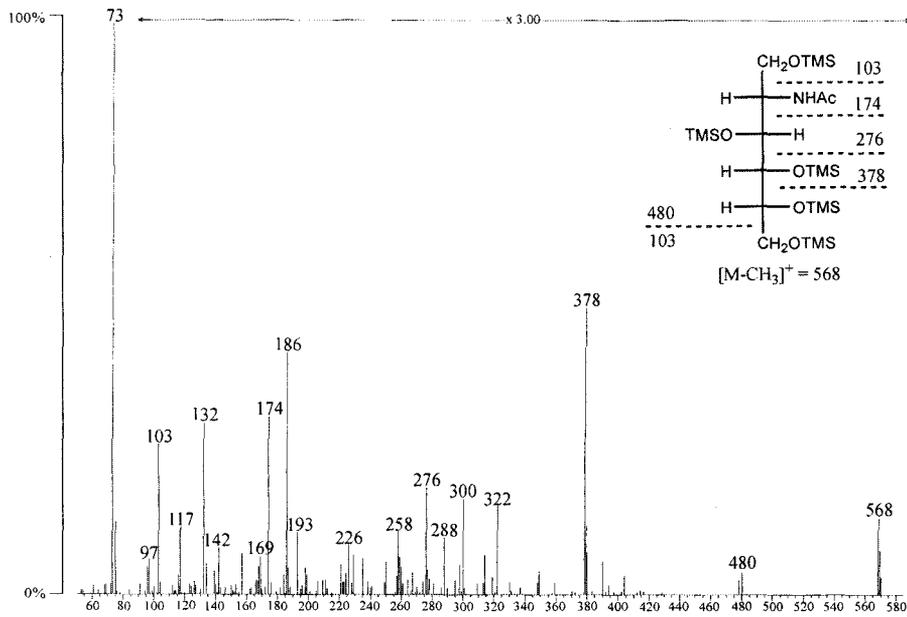


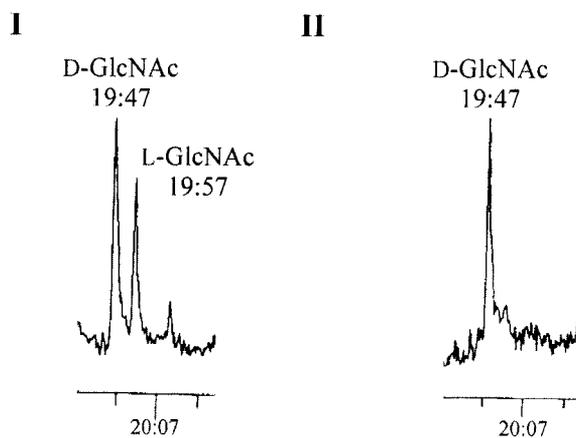
Figura 4.5. Espectro de masas del pico a  $t_R = 8:34$  min correspondiente al *O*-trimetilsililderivado del *N*-acetilglucosaminite. Se representa esquema de fragmentación.

En todas las fracciones analizadas se detecta la presencia de *N*-acetilglucosamina como pico mayoritario y *N*-acetilglucosaminitol como componente minoritario.

#### 4.1.4. Determinación de la configuración absoluta.

La determinación de la configuración absoluta de la *N*-acetilglucosamina componente de los factores de nodulación de *R. gallicum* bv. *gallicum* R602, se realiza a través de la formación de los butil glicósidos, tal y como se describe en el apartado 2.3.2.1.

En la Figura 4.6 se muestran los cromatogramas correspondientes a la formación de los *O*-trimetilsililderivados de los ( $\pm$ )-2-butil glicósidos (I) y (+)-2-butil glicósidos (II) de la fracción F2.



**Figura 4.6.** Cromatogramas de CGL-EM de los 2-butil 2 *N*-acetamido-2-desoxi-3,4,5-tri-*O*-trimetilsililglucósidos de F2, obtenidos al tratar la muestra con ( $\pm$ )-butan-2-ol (I) y (+)-butan-2-ol (II).

Por comparación con los datos obtenidos para monosacáridos patrones se concluye que la *N*-acetilglucosamina que compone los factores de nodulación de *R. gallicum* bv. *gallicum* R602 pertenece a la serie D.

#### 4.1.5. Estudio de los factores de nodulación mediante Espectrometría de Masas.

Las fracciones aisladas mediante HPLC de *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602 se estudian por Espectrometría de Masas. En este análisis se emplean las siguientes técnicas: FAB-MS, ES Q-o-TOF, MALDI Q-o-TOF y técnicas de Espectrometría de Masas en tándem (CID MALDI Q-o-TOF).

##### 4.1.5.1. Estudio por FAB.

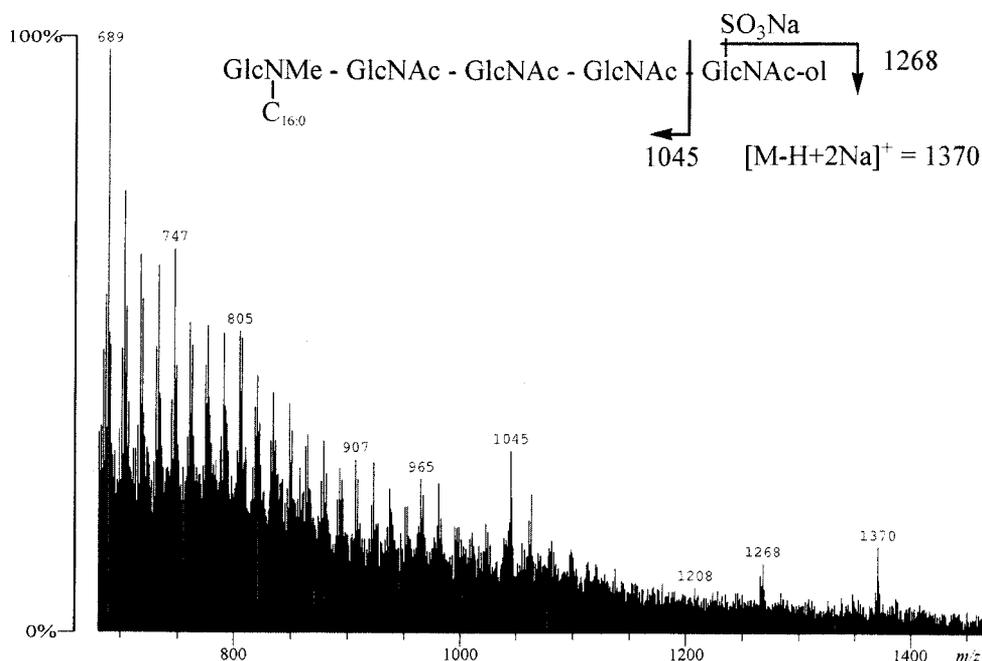
Las muestras aisladas se preparan para su análisis por FAB disolviéndolas en dimetilsulfóxido (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), tal y como se describe en el apartado 2.3.5.1.1. Se obtiene los siguientes resultados:

##### *Fracción F1*

El espectro FAB-MS de la fracción F1 se muestra en la Figura 4.7. Se observa un único ion pseudomolecular  $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$  a  $m/z$  1370. El espectro se registra en modo positivo y se utiliza la matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1). Este factor de nodulación se encuentra sulfatado,<sup>92</sup> ya que se observa la pérdida de 102 Th a  $m/z$  1268 correspondiente al ion  $[\text{M}+\text{Na}-\text{SO}_3\text{Na}]^+$ . No se identifica la serie de iones oxonios completa, salvo la señal a  $m/z$  1045, que se asigna al ion oxonio B<sub>5</sub> más Na.

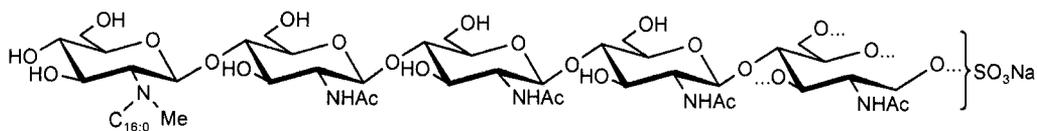
La diferencia de 325 Th (102+223 Th) entre el ion pseudomolecular  $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$  a  $m/z$  1370 y el ion-fragmento B<sub>4</sub> a  $m/z$  1045 indica que la unidad de *N*-acetilglucosaminitol, detectada en el análisis de azúcares, se encuentra sustituida por el grupo sulfato y constituye el aglicón del oligosacárido.

Cuando el espectro de FAB se realiza usando tioglicerol y NaI como matriz, no se observa ion-aducto con tioglicerol  $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}+\text{Tiog}]^+$ , indicando la presencia de un ácido graso saturado.<sup>93</sup>



**Figura 4.7.** Espectro de FAB de la fracción F1. Se representa esquema de fragmentación

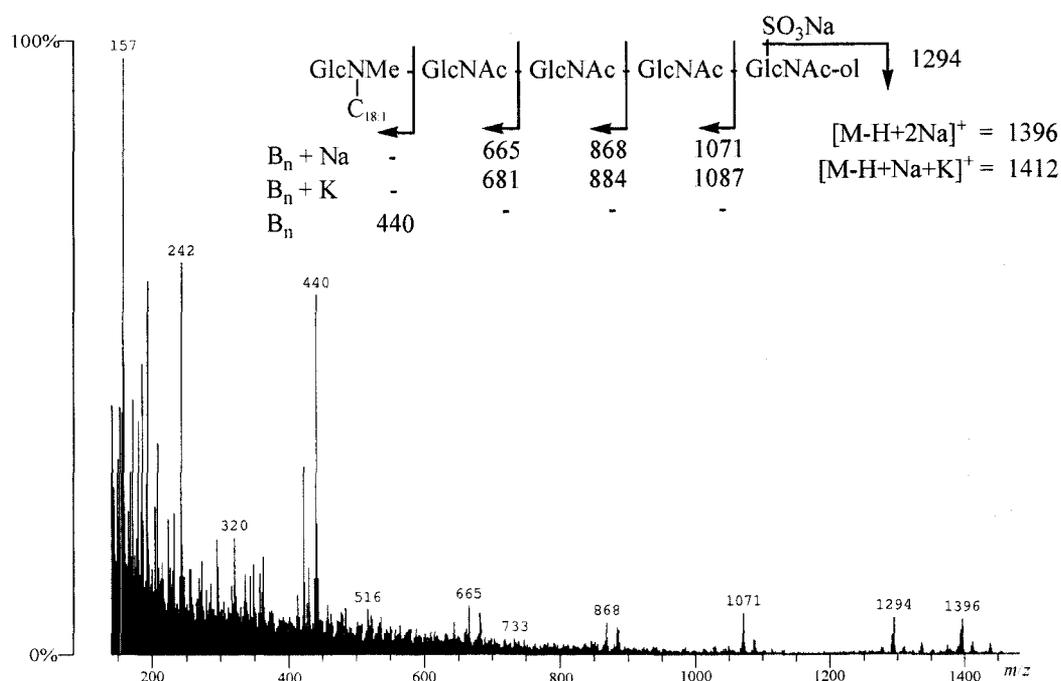
De acuerdo con estos resultados, se propone que el factor de nodulación de ion pseudomolecular a  $m/z$  1370 corresponde a un oligosacárido formado por tres unidades de *N*-acetilglucosamina, una unidad de *N*-acetilglucosaminitol sustituida por un grupo sulfato y una unidad de *N*-acilglucosamina como terminal no reductor que se encuentra sustituido por un grupo *N*-Me y un ácido graso saturado de dieciséis carbonos. La estructura propuesta para el factor de nodulación presente en la fracción F1 se muestra en la Figura 4.8. Su estructura se representa por: IV-GlcNAc-ol ( $C_{16:0}$ , NMe, S)



**Figura 4.8.** Factor de nodulación presente en la fracción F1: IV-GlcNAc-ol ( $C_{16:0}$ , NMe, S).

**Fración F2**

El espectro de FAB de esta fracción se muestra en la Figura 4.9. Se registra en modo positivo usando glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1) como matriz. Contiene señales correspondientes a los aductos de la molécula con sodio y con potasio. Así, las señales a  $m/z$  1396 y a  $m/z$  1412 se asignan a los iones pseudomoleculares  $[M-H+2Na]^+$  y  $[M-H+Na+K]^+$ , respectivamente.

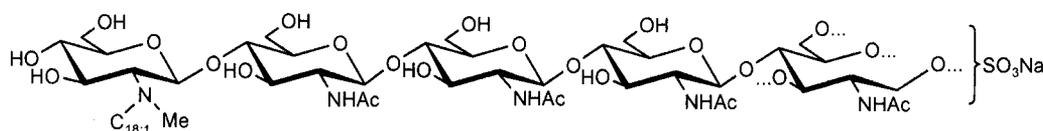


**Figura 4.10.** Espectro de FAB de la fracción F2. Se muestra el esquema de fragmentación, indicando la serie de iones oxonios.

La pérdida de 102, característica del grupo  $NaSO_3$ , se aprecia en la señal a  $m/z$  1294. De este dato se deduce que el factor de nodulación que contiene la fracción F2 está sulfatado. Al igual que en F1, la pérdida de 325 Th indica la presencia de N-acetilglucosaminitol sulfatado, como aglicón del oligosacárido. Además, se asignan la serie de iones oxonios procedente del ion pseudomolecular:  $m/z$  1071 y 1087 ( $B_4$  más Na y más K, respectivamente);  $m/z$  868 y 884 ( $B_3$  más Na y más K, respectivamente);  $m/z$  665 y 681 ( $B_2$  más Na y más K, respectivamente) y por último  $m/z$  440 asignado a  $B_1$ .

Cuando el espectro de FAB de la fracción F2 se realiza utilizando como matriz, tioglicerol y NaI como aditivo, se observa una señal a  $m/z$  1504 que corresponde al ion aducto  $[M-H+2Na+Tiog]^+$ , lo que indica la presencia de un ácido graso insaturado. La relación  $m/z$  de  $B_1$ , indica que este factor de nodulación lleva en el terminal no reductor un ácido graso monoinsaturado de dieciocho átomos de carbono y un grupo *N*-metilo.

De estos resultados se deduce que el componente de la fracción F2 es un lipooligosacárido de tres unidades de *N*-acetilglucosamina, una unidad de *N*-acilglucosamina y una unidad de *N*-acetilglucosaminitol sulfatada. El terminal no reductor contiene un grupo *N*-Me y el ácido graso  $C_{18:1}$  (Figura 4.11). Su estructura se resume como: IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:1}$ , NMe, S).



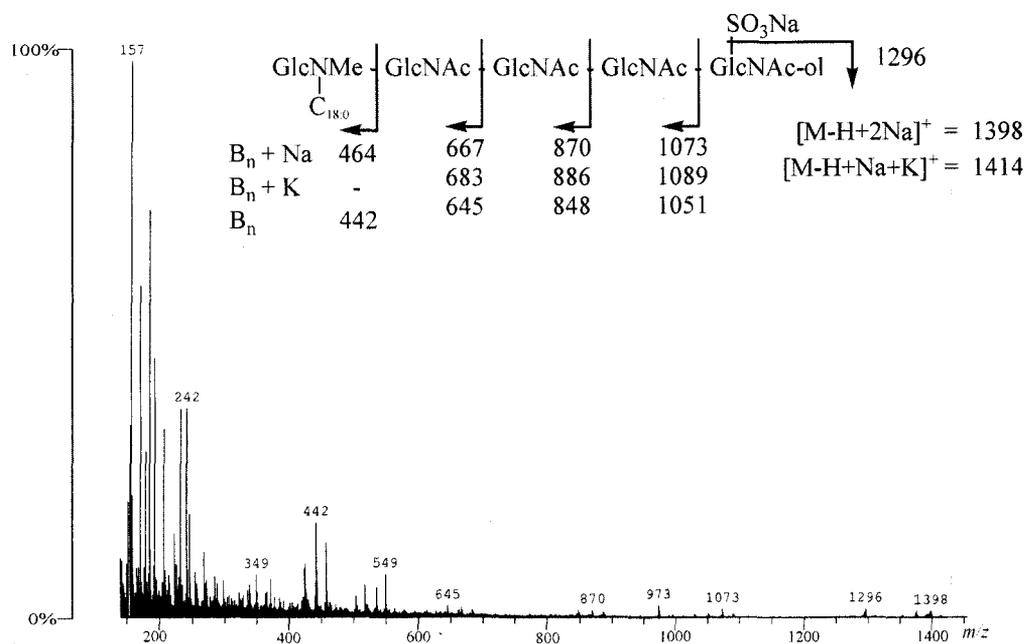
**Figura 4.11.** Factor de nodulación presente en la fracción F2: IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:1}$ , NMe, S).

### Fracción F3

En el espectro de FAB de la fracción F3 que se muestra en la Figura 4.12 aparece un único ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1398. El espectro se registra en modo positivo utilizando la matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1).

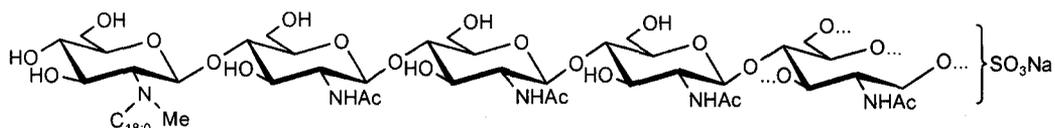
Los iones-fragmento  $B_n$  identificados son los siguientes:  $m/z$  1051, 1073 y 1089 ( $B_4$ ,  $B_4$  más Na y  $B_4$  más K, respectivamente);  $m/z$  848, 870 y 886 ( $B_3$ ,  $B_3$  más Na y  $B_3$  más K, respectivamente);  $m/z$  645, 667 y 683 ( $B_2$ ,  $B_2$  más Na y  $B_2$  más K, respectivamente) y por último a  $m/z$  442 y 464 ( $B_1$  y  $B_1$  más Na). Este factor de nodulación también se encuentra sulfatado. La pérdida de  $NaSO_3$  aparece a  $m/z$  1296.

La relación  $m/z$  de  $B_1$  indica que el terminal no reductor se encuentra sustituido por un ácido graso saturado de dieciocho carbonos y un grupo *N*-Me. El espectro de FAB realizado empleando la matriz tioglicerol y NaI no muestra ion-aducto con tioglicerol. Por tanto, este factor de nodulación se encuentra acilado por un ácido graso saturado.



**Figura 4.12.** Espectro de FAB de la fracción F3. Se muestra el esquema de fragmentación, indicando la serie de iones oxonios.

Se concluye que la molécula señal encontrada en esta fracción está compuesta por tres unidades de *N*-acetilglucosamina, una unidad de *N*-acetilglucosaminitol sulfatada y una unidad de *N*-acilglucosamina que forma el terminal no reductor del oligosacárido. Está sustituido por un ácido graso saturado de dieciocho átomos de carbono y un grupo *N*-metilo en el terminal no reductor. Su estructura se resume en: IV-GlcNAc-ol (C<sub>18:0</sub>, NMe, S). La estructura propuesta para el LCO presente en la fracción F3 es:



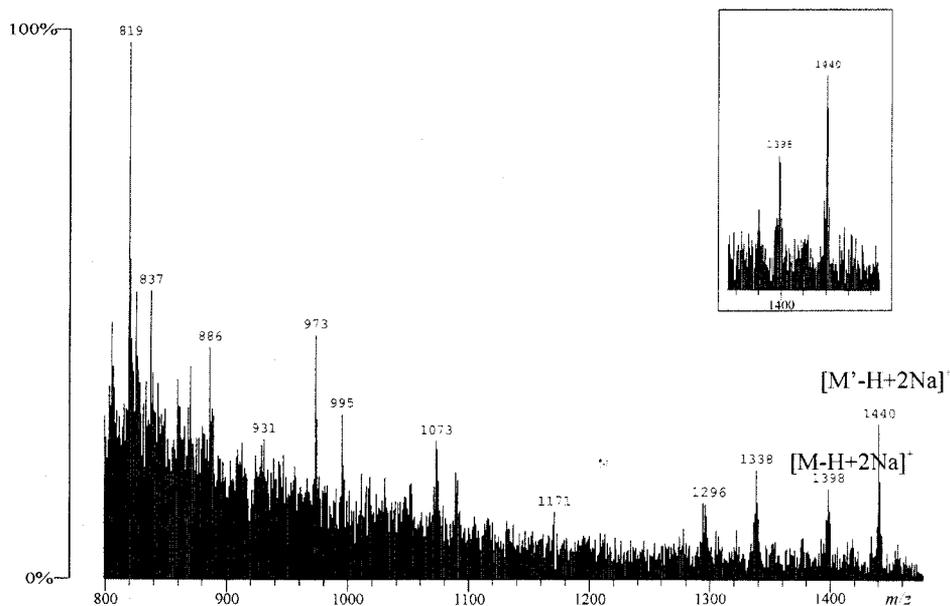
**Figura 4.13.** Factor de nodulación presente en la fracción F3: IV-GlcNAc-ol (C<sub>18:0</sub>, NMe, S).

### Fracción F4

El espectro de FAB de la fracción F4 se muestra en la Figura 4.14. Aparecen dos iones pseudomoleculares.

- $m/z$  1398, asignado a  $[M-H+2Na]^+$ . Este ion ya apareció en la fracción anterior y se corresponde con el factor de nodulación IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:0}$ , NMe, S).
- $m/z$  1440 asignado a  $[M'-H+2Na]^+$ , se diferencia del anterior en 42 Th y que podría corresponder al factor de nodulación anterior con un grupo acetilo descrito por: IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:0}$ , NMe, Ac, S).

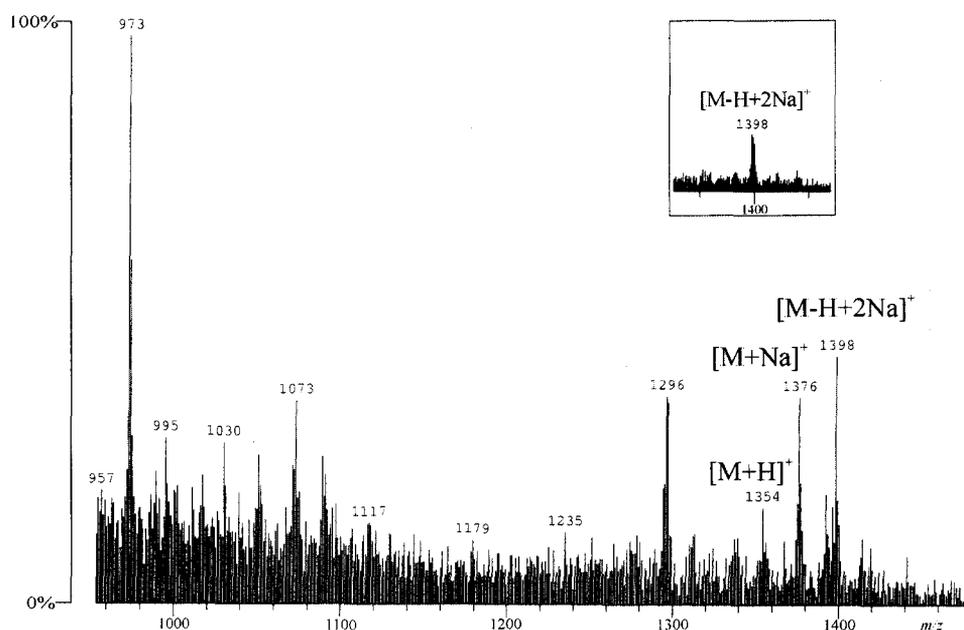
Se asignan, además, las señales a  $m/z$  1338 y 1296 a las pérdidas  $SO_3Na$  de los iones a  $m/z$  1440 y 1398, respectivamente. No se identifica la serie de iones oxonios completa para ninguno de los dos iones pseudomoleculares. Cuando el espectro de FAB se realiza usando tioglicerol y NaI (Figura 4.14) ninguno de los dos iones dan señal con tioglicerol  $[M-H+2Na+Tiog]^+$  y  $[M'-H+2Na+Tiog]^+$ , respectivamente, que indique la presencia de un ácido graso saturado en la dos moléculas.



**Figura 4.14.** Espectro de FAB de la fracción F4 realizado con glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico. En el recuadro se muestra la región pseudomolecular del espectro de FAB realizado con tioglicerol (con NaI)

Para comprobar la presencia del factor de nodulación acetilado, se realiza una des-*O*-acetilación de la fracción F4. La muestra (100 µg) se trata con NH<sub>4</sub>OH:MeOH (1:1) (100 µl) durante 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se evapora a sequedad y el sólido resultante se disuelve en DMSO para su posterior análisis por FAB. Los espectros de FAB que se obtienen se muestran en la Figura 4.15.

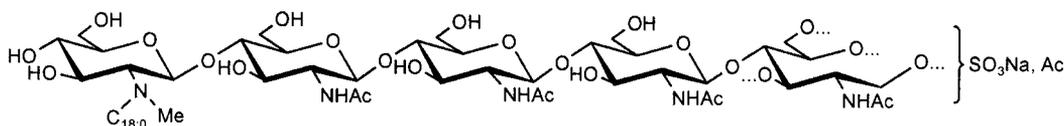
Después del tratamiento, la señal a *m/z* 1440 correspondiente al factor de nodulación acetilado desaparece. Las señales a *m/z* 1354, 1376 y 1398 se asignan a [M+H]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup> y [M-H+2Na]<sup>+</sup>, respectivamente, correspondientes a los factores de nodulación IV-GlcNAc-ol (C<sub>18:0</sub>, NMe, S) y IV-GlcNAc-ol (C<sub>18:0</sub>, NMe, Ac, S) después de desacetilar. También se asigna la señal a *m/z* 1296 a la pérdida de SO<sub>3</sub>Na y la señal 1073 al ion oxonio B<sub>4</sub> más Na.



**Figura 4.15.** Espectro de FAB de la fracción F4 des-*O*-acetilada realizado con glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico. En el recuadro se muestra la región pseudomolecular del espectro de FAB realizado con tioglicerol (con Na)

De estos resultados se deduce que el factor de nodulación presente en la fracción F4 y cuyo ion pseudomolecular aparece a *m/z* 1440 está acetilado. No se detecta la serie de iones oxonio en el espectro de FAB y por tanto no es posible localizar la posición exacta

del grupo acetilo dentro de la molécula. Se corresponde con IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:0}$ , NMe, Ac, S).



**Figura 4.16.** Factor de nodulación presente en la fracción F3 IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:0}$ , Me, S, Ac).

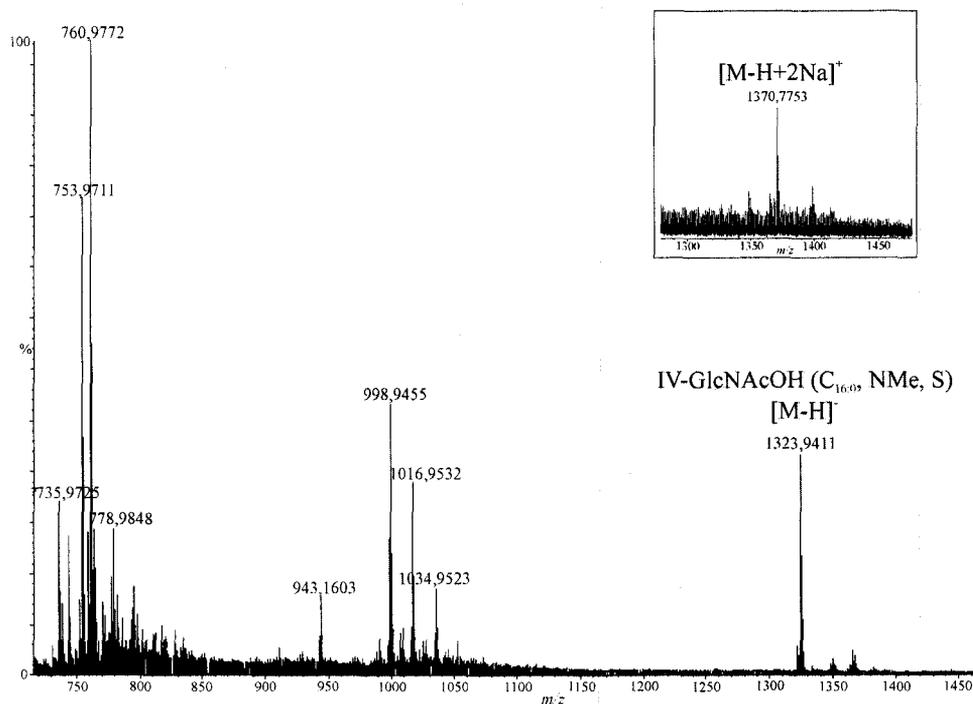
#### 4.1.5.2. Estudio por MALDI Q-o-TOF, ES Q-o-TOF y CID MALDI Q-o-TOF.

Las fracciones aisladas por HPLC de *R. gallicum* bv. *gallicum* R602 se estudiaron mediante MALDI Q-o-TOF, ES Q-o-TOF y CID MALDI Q-o-TOF.

Las muestras se preparan para su análisis por electrospray tal y como se indica en el apartado 2.3.5.1.2. Las muestras se disuelven en una disolución de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (50:50:0,1) (100  $\mu$ l) y se introducen en el espectrómetro de masas a un flujo de 1  $\mu$ l/min. Para el análisis por MALDI se utiliza el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico como matriz que co-cristaliza con la muestra previamente disuelta en acetonitrilo:agua:ácido fórmico (50:50:0,1) (100  $\mu$ l).

#### *Fracción F1*

El espectro de electrospray de la fracción F1 registrado en modo negativo y en modo positivo (recuadro) se muestra en la Figura 4.17. En ambos casos, sólo aparece un ion pseudomolecular en dicha fracción. El pico que aparece a  $m/z$  1324 en el espectro registrado en modo negativo se asigna a  $[M-H]^-$  y el pico que aparece a  $m/z$  1370 en el espectro registrado en modo positivo se asigna al ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$ .



**Figura 4.17.** Espectro de electrospray realizado en modo negativo de la fracción F1. Recuadro: Región pseudomolecular del espectro de ES de la fracción F1 registrado en modo positivo.

Con el fin de completar la asignación de los factores de nodulación producidos por *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602 se realiza el espectro de masas en tándem. El espectro MALDI CID Q-o-TOF que se obtiene por fragmentación del ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1370, se muestra en la Figura 4.18.

Se identifican tanto la serie de iones-fragmento  $Y_n$  (más Na) formada por los iones a  $m/z$ : 348, 751, 754 y 957; como algunos de los iones oxonios  $B_n$ :  $m/z$  842  $[B_3+Na]^+$  y  $m/z$  1045  $[B_4+Na]^+$ . Los iones a  $m/z$  1250 y 837 proceden de la pérdida de  $SO_3Na$  y  $H_2O$  del ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  y del ion-fragmento  $Y_4$ , respectivamente. La relación  $m/z$  del ion-fragmento  $Y_1$  demuestra claramente la presencia de glucosaminitol sulfatado como aglicón.

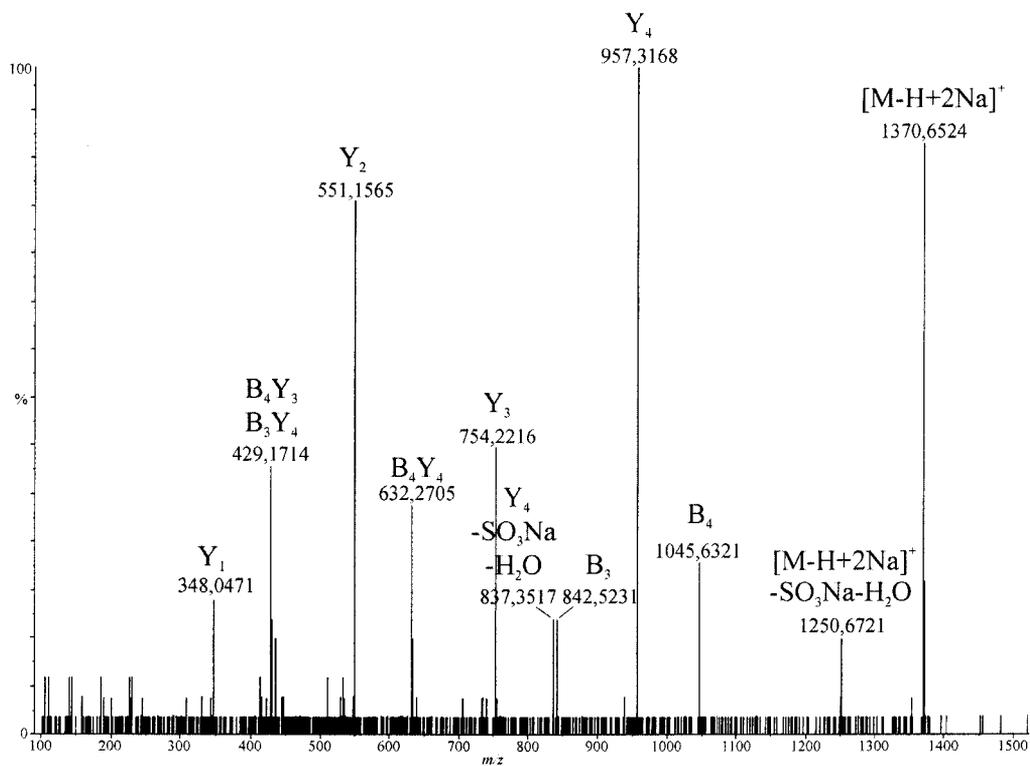


Figura 4.18. Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF del ion  $m/z$  1370. Los iones-fragmento están asignados.

En la Figura 4.19, se detalla el esquema de fragmentación y se representan todas las fragmentaciones encontradas procedentes de roturas simples dentro de la molécula.

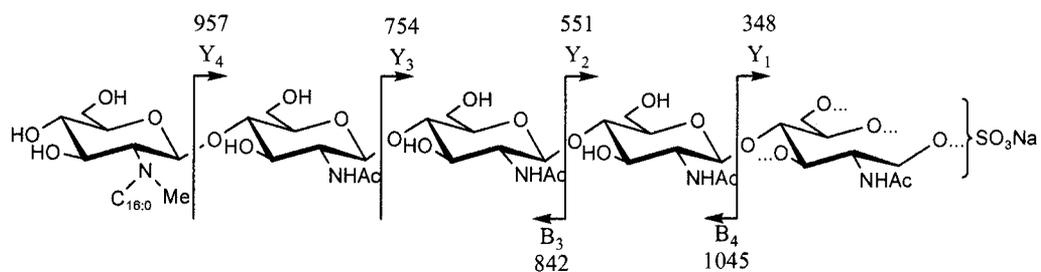


Figura 4.19. Esquema de fragmentación CID MALDI Q-o-TOF del factor de nodulación IV-GlcNAc-ol ( $C_{16:0}$ , NMe, S). Se muestra la asignación de los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  encontrados.

Por último, se identifican algunos iones-fragmento procedentes de roturas dobles: a  $m/z$  429 asignado a  $B_4Y_3$  y/o  $B_3Y_4$  y a  $m/z$  632 asignado a  $B_4Y_4$ .

Estos datos confirman que el factor de nodulación presente en la fracción F1 es un lipooligosacárido de tres unidades de *N*-acetilglucosamina, una unidad de *N*-acilglucosamina y una unidad de *N*-acetilglucosaminitol sustituida por un grupo sulfato. Además, este oligosacárido se encuentra sustituido en el terminal no reductor por un grupo *N*-metilo y un ácido graso saturado de dieciséis átomos de carbono.

### Fracción F2

El espectro de masas de ES Q-o-TOF de la fracción F2 (Figura 4.20) muestra los iones pseudomoleculares  $[M-H+2Na]^+$  y  $[M-H+Na+K]^+$  a  $m/z$  1396 y 1412, respectivamente. Se muestra, además, la región pseudomolecular del espectro de MALDI realizado en esta fracción, asignándose los iones a  $m/z$  1390, 1396 y 1412 a los iones pseudomoleculares  $[M+K]^+$ ,  $[M-H+2Na]^+$  y  $[M-H+Na+K]^+$ , respectivamente.

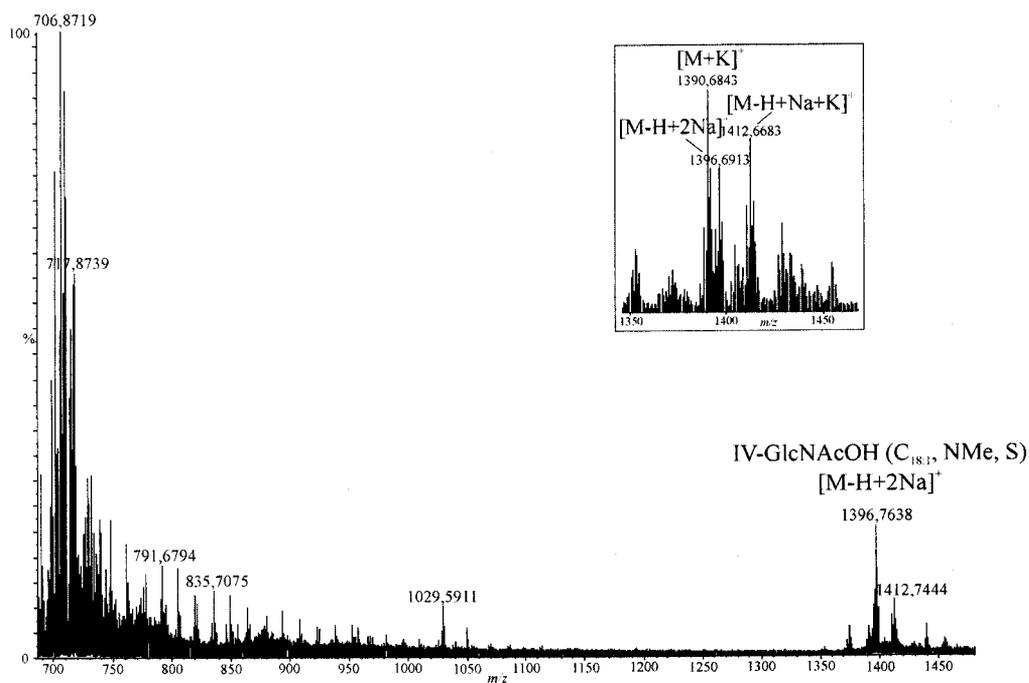


Figura 4.20. Espectro de electrospray de la fracción F2. Recuadro: Región pseudomolecular del espectro de MALDI.

Para comprobar los resultados obtenidos se realiza el espectro de masas CID MSMS. Se selecciona y fragmenta el ion pseudomolecular a  $m/z$  1396. Se identifican los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  producidos, así como algunos procedentes de roturas dobles dentro de la molécula (Figura 4.21).

La serie de iones  $B_n$  ( $B_n+Na$ ) está formada por los siguientes iones a  $m/z$ : 1071, 868, 665 y por último a  $m/z$  440 ( $B_1$ ); y la serie de iones  $Y_n$  (más Na) a  $m/z$ : 957, 754, 551 y 348. Los iones a  $m/z$  1276 y 837 provienen de la pérdida de  $SO_3Na$  y  $H_2O$  del ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  y del ion-fragmento  $Y_4$ , respectivamente. Por último, se identifican los siguientes iones tipo  $B_nY_n$ : a  $m/z$  226 que se asigna a  $B_2Y_4$ ,  $B_3Y_3$  y/o  $B_4Y_2$ , a  $m/z$  429 que se asigna a  $B_4Y_3$  y/o  $B_3Y_4$  y a  $m/z$  632 al ion-fragmento  $B_4Y_4$ .

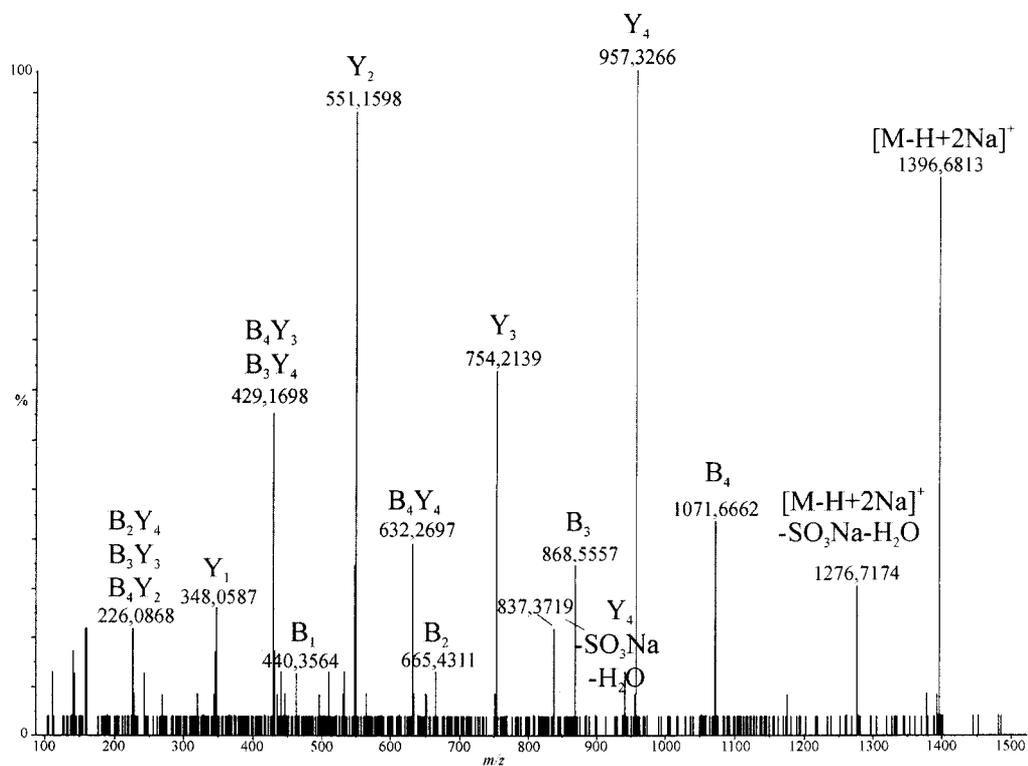
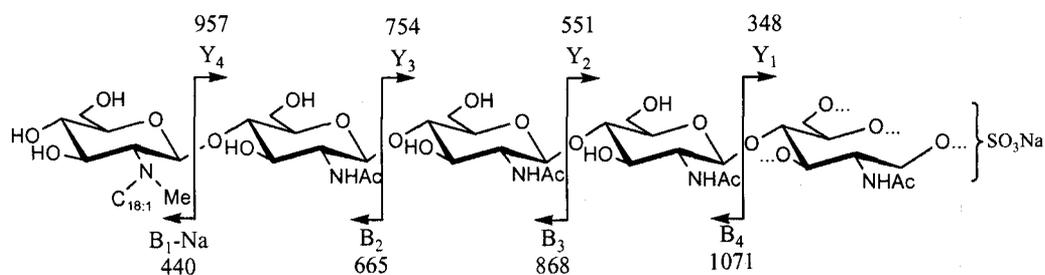


Figura 4.21. Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF del ion  $m/z$  1396

En la Figura 4.22 se muestra el esquema de fragmentación de la molécula señal presente en la fracción F2 de ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1396. Se

representan todas las fragmentaciones encontradas procedentes de roturas de los enlaces glicosídicos.



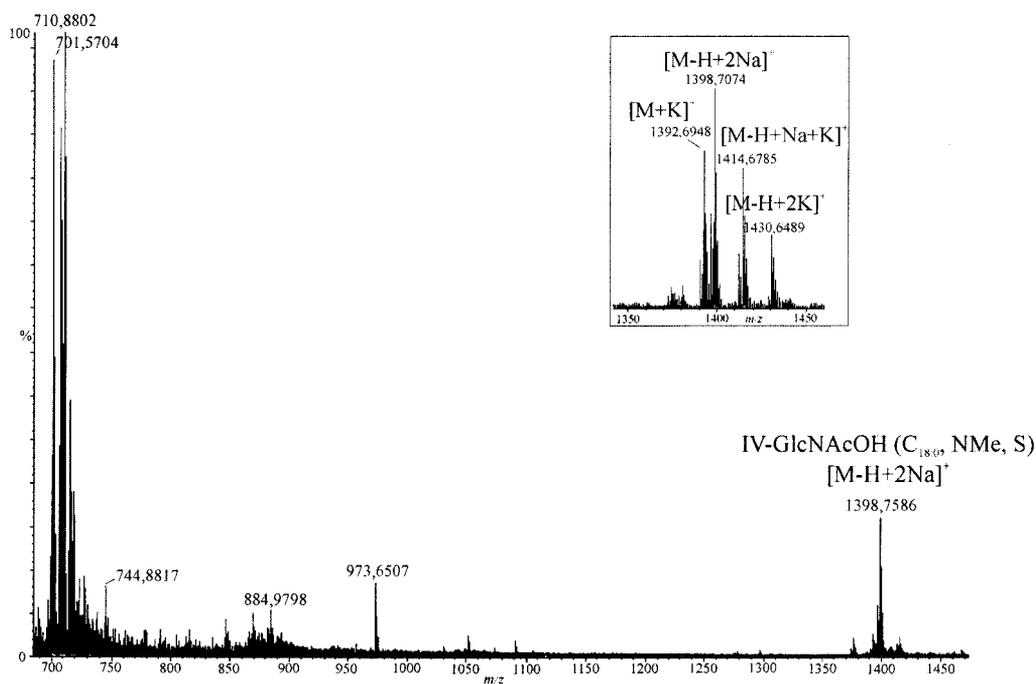
**Figura 4.22.** Esquema de fragmentación CID MALDI Q-o-TOF del factor de nodulación IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:1}$ , NMe, S). Se muestra la asignación de los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  encontrados.

El análisis de los datos obtenidos confirman que el grupo sulfato se encuentra localizado en la unidad de *N*-acetilglucosaminitol y el grupo *N*-metilo y el ácido graso ( $C_{18:1}$ ) en el terminal no reductor del oligosacárido.

### Fracción F3

El espectro de masas ES Q-o-TOF registrado en modo positivo de la fracción F3 se muestra en la Figura 4.23. En el recuadro, se muestra la región pseudomolecular del espectro de masas MALDI Q-o-TOF de esta misma fracción.

En el espectro de electrospray se identifica el ion pseudomolecular mayoritario a  $m/z$  1398, asignado a  $[M-H+2Na]^+$ , mientras que en el espectro MALDI se identifican, además:  $[M+K]^+$  a  $m/z$  1392;  $[M-H+Na+K]^+$  a  $m/z$  1414, y por último,  $[M-H+2K]^+$  a  $m/z$  1430. Todos estos iones corresponden al factor de nodulación IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:0}$ , NMe, S).



**Figura 4.23.** Espectro de electrospray realizado en modo positivo de la fracción F3. Recuadro: Región pseudomolecular del espectro de MALDI de la fracción F3 registrado en modo positivo.

El espectro CID MALDI Q-o-TOF obtenido por fragmentación del ion a  $m/z$  1398 se muestra en la Figura 4.24. Contiene diferentes tipos de iones-fragmento.

Los iones oxonios aparecen a  $m/z$  1073, 870, 667 y 464. Los iones-fragmento  $Y_n$  aparecen a  $m/z$  957, 754, 551 y 348. Los iones a  $m/z$  1278 y 837 provienen de la pérdida de  $\text{SO}_3\text{Na}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  del ion pseudomolecular  $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$  y del ion-fragmento  $Y_4$ , respectivamente. La serie de iones-fragmento procedentes de roturas dobles dentro del oligosacárido (tipo  $B_nY_n$ ) se han identificado a  $m/z$  226 asignado a  $B_2Y_4$ ,  $B_3Y_3$  y/o  $B_4Y_2$ , a  $m/z$  429 asignado a  $B_4Y_3$  y/o  $B_3Y_4$  y a  $m/z$  632 asignado a  $B_4Y_4$ .

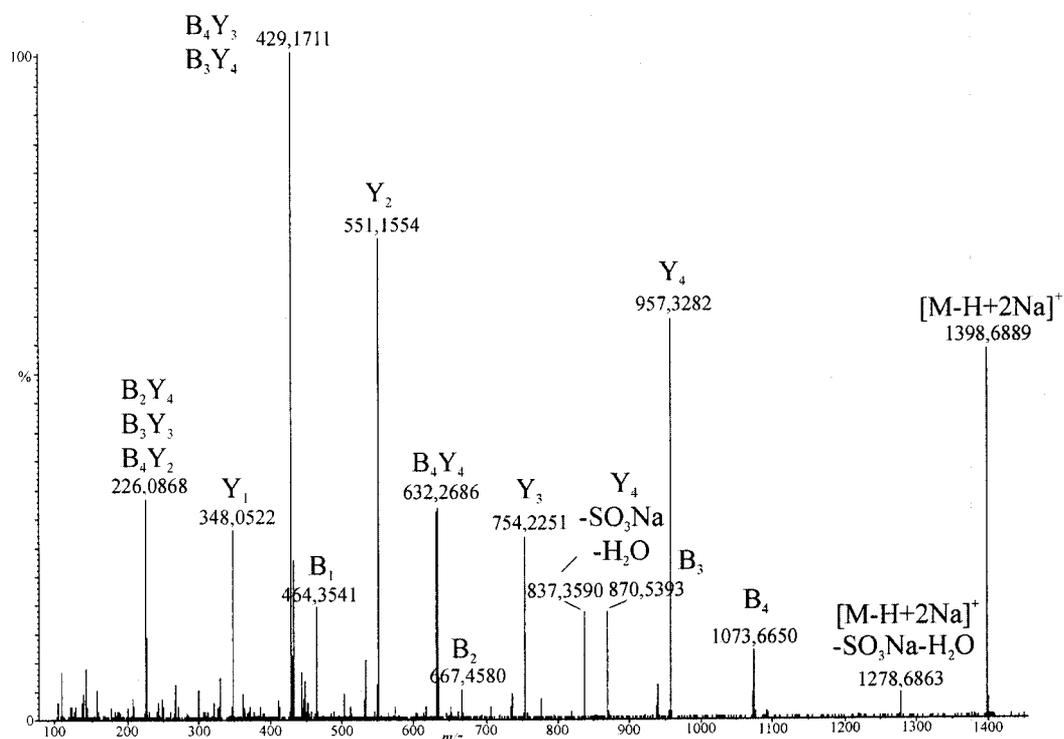


Figura 4.24. Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF del ion  $m/z$  1398

A continuación (Figura 4.25) se detalla su esquema de fragmentación y se representan todas las fragmentaciones encontradas procedentes de roturas simples dentro de la molécula.

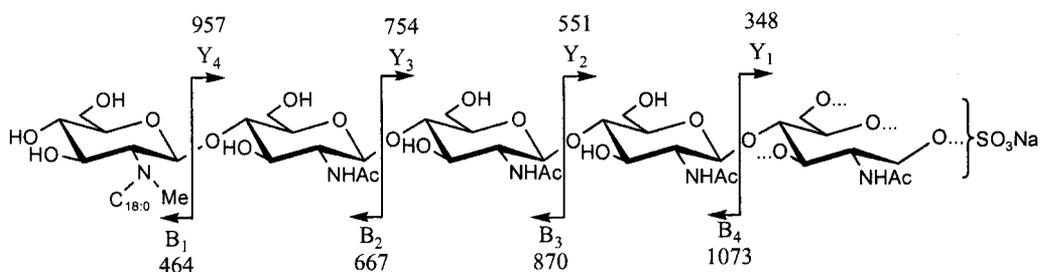


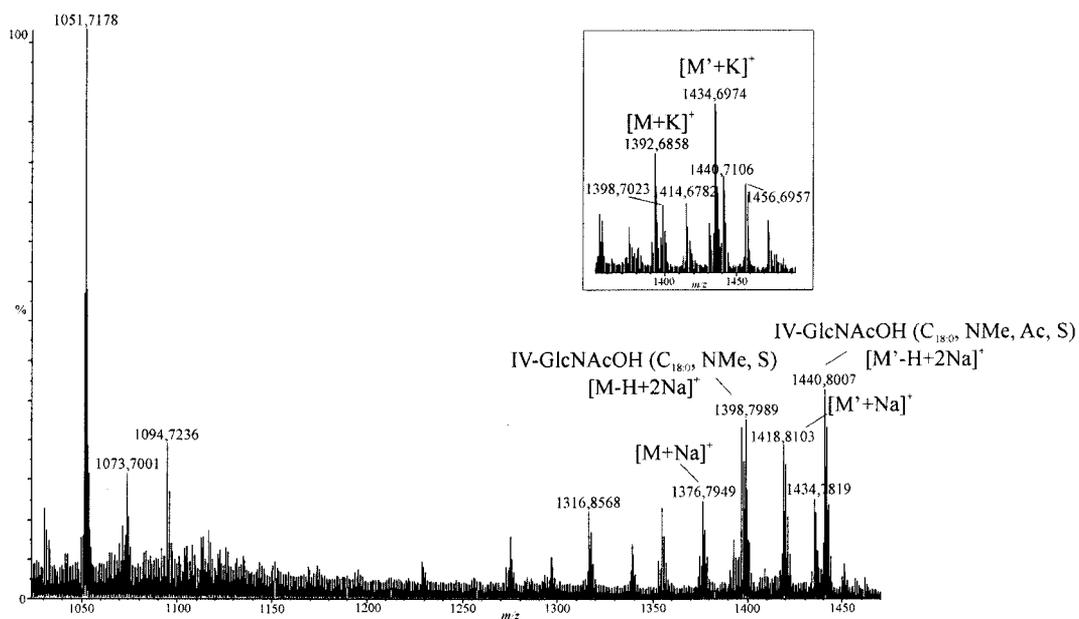
Figura 4.25. Esquema de fragmentación CID MALDI Q-o-TOF del factor de nodulación IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:0}$ , NMe, S). Se muestra la asignación de los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  encontrados.

De estos datos se concluye que el factor de nodulación en F3 se trata de un oligosacárido cuyo esqueleto está constituido por tres unidades de *N*-acetilglucosamina, una unidad de *N*-acilglucosamina y una unidad de *N*-acetilglucosaminitol sustituida por un grupo sulfato. En el terminal reductor se encuentran un grupo *N*-metilo y el ácido graso C<sub>18:0</sub>.

#### Fracción F4

El espectro de masas ES Q-o-TOF registrado en modo positivo de la fracción F4 se muestra en la Figura 4.26. En el recuadro, se muestra la región pseudomolecular del espectro de masas MALDI Q-o-TOF de esta misma fracción. Se identifican dos moléculas de reconocimiento:

- $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1398. Junto a este pico aparecen  $[M+K]^+$  a  $m/z$  1392 y  $[M-H+Na+K]^+$  a  $m/z$  1414.
- $[M'-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1440. Junto a este pico aparecen  $[M'+K]^+$  a  $m/z$  1334 y  $[M'-H+Na+K]^+$  a  $m/z$  1456.



**Figura 4.26.** Espectro de Electrospray realizado en modo positivo de la fracción F4. Recuadro: Región pseudomolecular del espectro de MALDI de la fracción F4 registrado en modo positivo.

El espectro de CID MALDI Q-o-TOF obtenido para la molécula señal presente en la fracción F4 y de ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1440, se muestra en la Figura 4.27. Contiene diferentes tipos de iones-fragmento. La serie de iones  $[B_n+Na]^+$  es:  $m/z$  1073, 870, 667 y 464 y la serie de iones  $[Y_n+Na]^+$ :  $m/z$  999, 796, 593 y 390.

Por último, se identifican algunos iones-fragmento procedentes de roturas dobles: a  $m/z$  226 asignado a  $B_2Y_4$ ,  $B_3Y_3$  y/o  $B_4Y_2$ , a  $m/z$  429 asignado a  $B_4Y_3$  y/o  $B_3Y_4$  y a  $m/z$  632 asignado a  $B_4Y_4$ .

De estos resultados, principalmente de la relación  $m/z$  del ion-fragmento  $Y_1$ , se deduce que el grupo acetilo y el grupo sulfato se encuentran localizado en la unidad de *N*-acetilglucosaminitol. Por otra parte, los iones a  $m/z$  1260 y 819 provienen de la pérdida de  $SO_3Na$ ,  $H_2O$  y  $CH_3COOH$  del ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  y del ion-fragmento  $Y_4$ , respectivamente. Además, también se identifica el pico a  $m/z$  533 como  $Y_2$  menos  $AcOH$ .

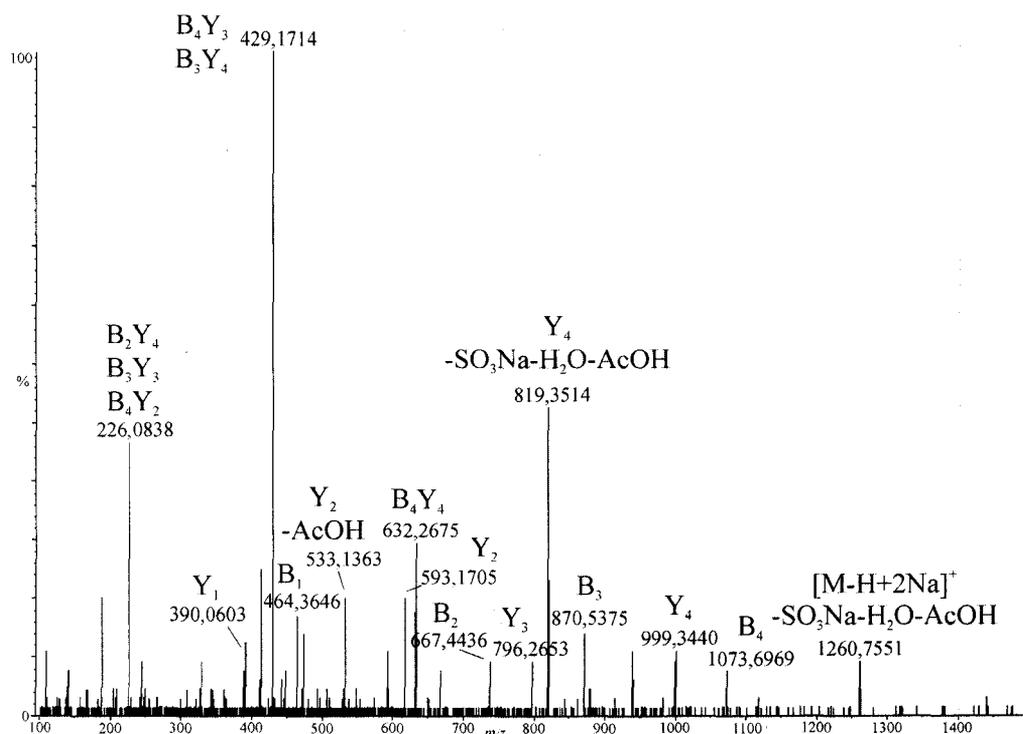
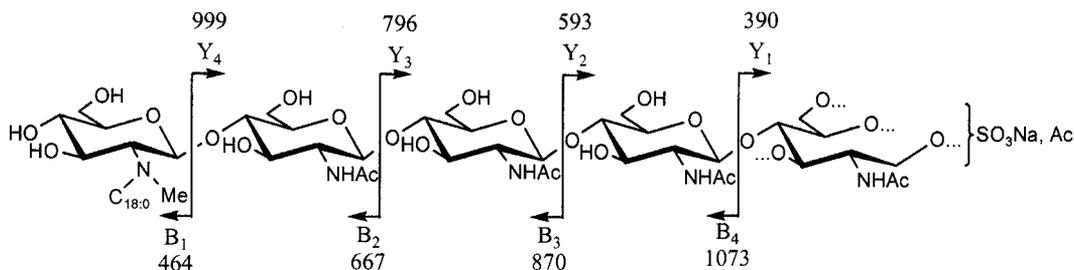


Figura 4.27. Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF del ion  $m/z$  1440.

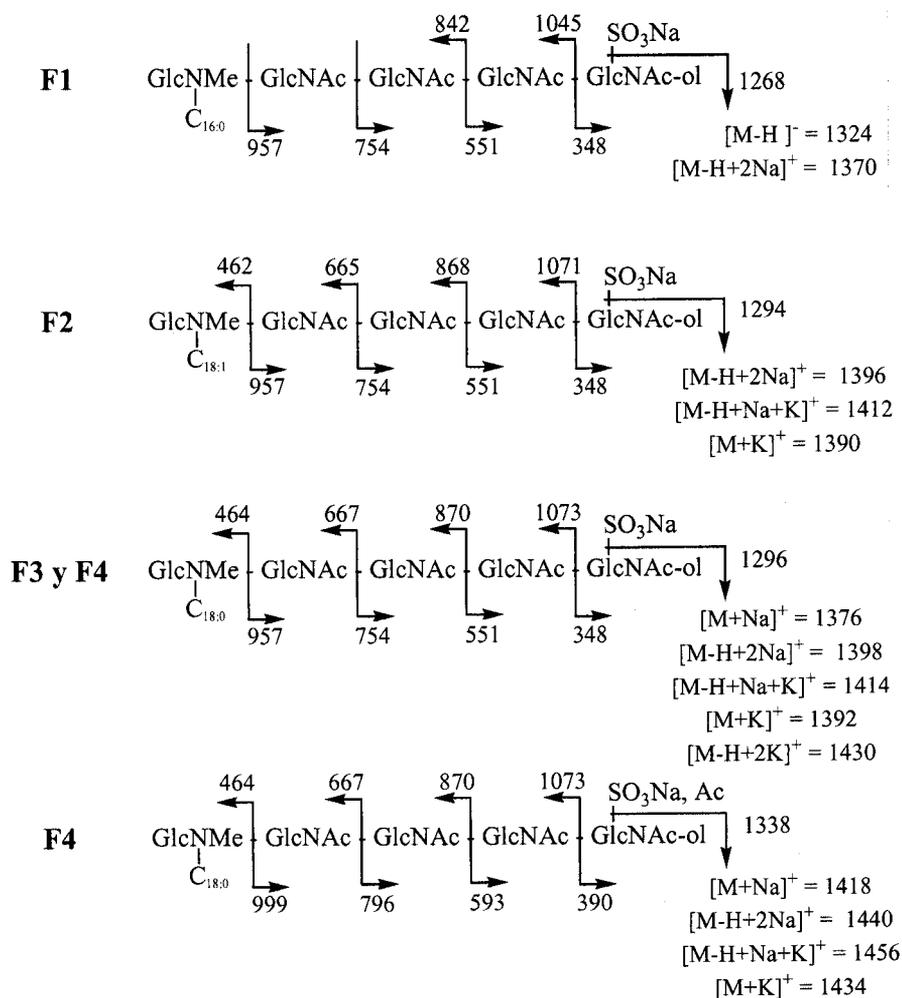
A continuación (Figura 4.28) se detalla su esquema de fragmentación y se representan todas las fragmentaciones encontradas procedentes de roturas simples dentro de la molécula.



**Figura 4.28.** Esquema de fragmentación CID MALDI Q-o-TOF del factor de nodulación IV-GlcNAc-ol (C<sub>18:0</sub>, NMe, Ac, S). Se muestra la asignación de los iones-fragmentos B<sub>n</sub> e Y<sub>n</sub> encontrados.

Los datos obtenidos confirman que se trata de un oligosacárido de tres unidades de *N*-acetilglucosamina, una unidad de *N*-acetilglucosaminitol y una unidad glucosamina acilada por un ácido graso saturado de dieciocho átomos de carbono. La unidad de GlcNAc-ol se encuentra sustituida por un grupo sulfato y un grupo acetilo y el terminal no reductor por un grupo *N*-metilo.

Los resultados del análisis por Espectrometría de Masas de los factores de nodulación producidos por la bacteria *R. gallicum* bv. *gallicum* R602 están recogidos en la siguiente figura:



**Figura 4.29.** Resultado del análisis por Espectrometría de Masas de las fracciones F1-F4.

#### 4.1.6. Análisis por metilación.

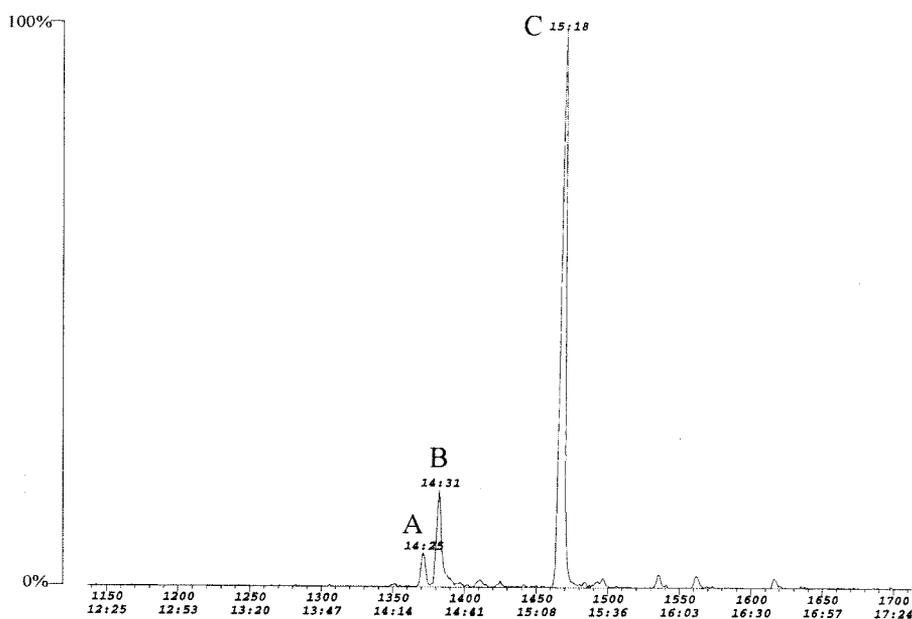
La metilación de la fracción F2 se realiza según el método de Ciucanu y Kerek<sup>54</sup> descrito en el apartado 2.3.3.1. Los acetatos de alditos parcialmente metilados obtenidos se analizan por CGL-EM según la instrumentación y las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 2.3.3.4. El proceso de metilación y el estudio de sus acetatos de alditos parcialmente metilados se realiza de la misma forma que para los factores de nodulación de *Rhizobium giardinii* bv. *giardinii* H152 salvo por una modificación: el

oligosacárido permetilado e hidrolizado se reduce con  $\text{NaBD}_4$ , en lugar de  $\text{NaBH}_4$ , con el objeto de marcar el carbono carbonílico y distinguir así los alditoles procedentes de las unidades de *N*-acetilglucosamina y de la unidad de *N*-acetilglucosaminitol presente en el oligosacárido. Finalmente, se acetila para su posterior análisis por CGL-EM.

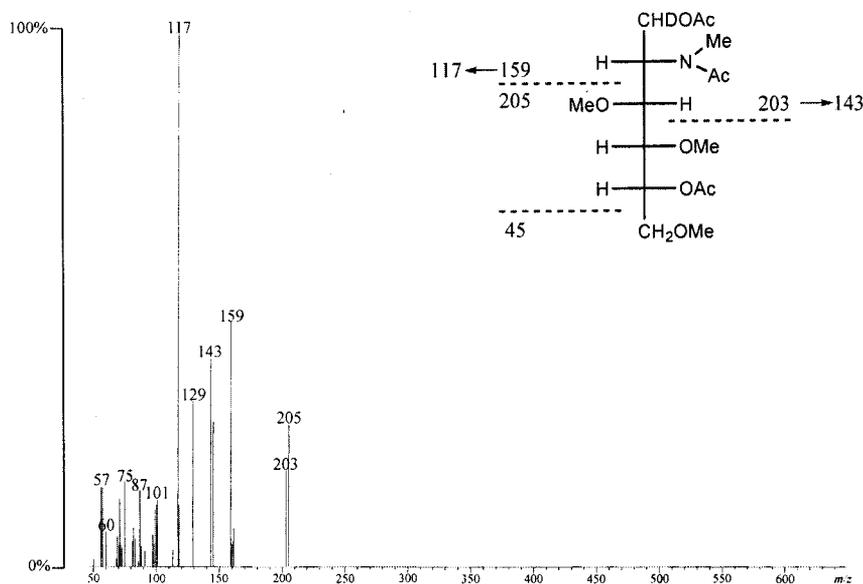
Los acetatos de alditoles parcialmente metilados que se identifican son:

- ♦ 1,5-di-*O*-acetil-1-deutero-3,4,6-tri-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente de un residuo de *N*-acetilglucosamina no sustituida que forma el terminal no reductor del oligosacárido (Pico A).
- ♦ 4,6-di-*O*-acetil-1,3,5-tri-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente de la unidad de *N*-acetilglucosaminitol sustituida en *O*-6 y en *O*-4 (Pico B).
- ♦ 1,4,5-tri-*O*-acetil-1-deutero-3,6-di-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente de los residuos de *N*-acetilglucosamina sustituida en *O*-4 (Pico C)

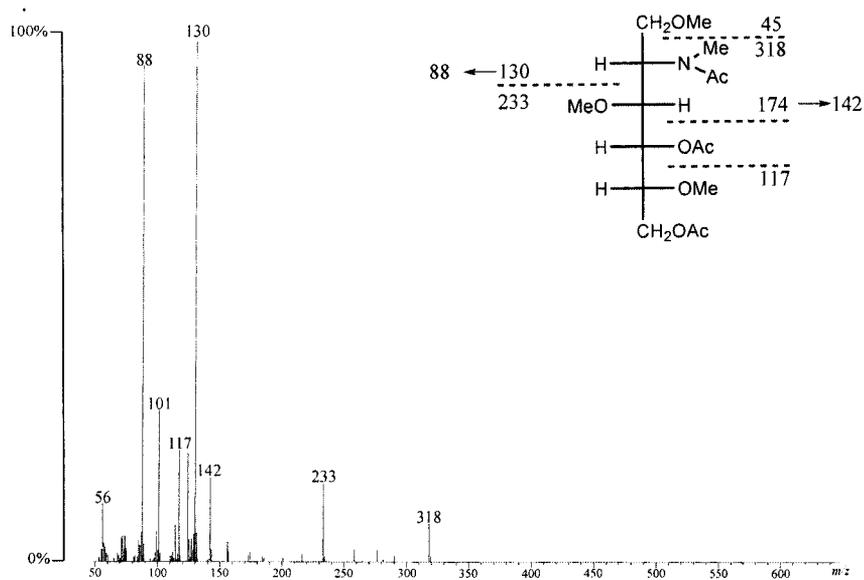
El cromatograma registrado por CGL-EM para la fracción F2 se muestra en la Figura 4.30. Los espectros de masas de los picos que aparecen en el cromatograma se detallan en las Figuras 4.31, 4.32 y 4.33.



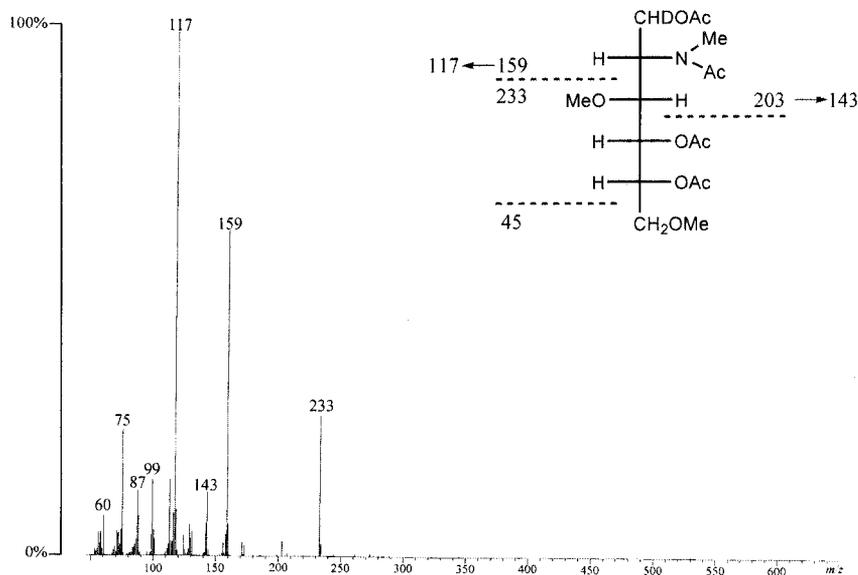
**Figura 4.30.** Cromatograma de CGL-EM de los acetatos de alditol parcialmente metilados del oligosacárido IV-GlcNAc-ol ( $\text{C}_{18:1}$ , NMe S).



**Figura 4.31.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,5-di-*O*-acetil-1-deutero-3,4,6-tri-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol procedente del análisis de metilación de la fracción F2 (Pico A)

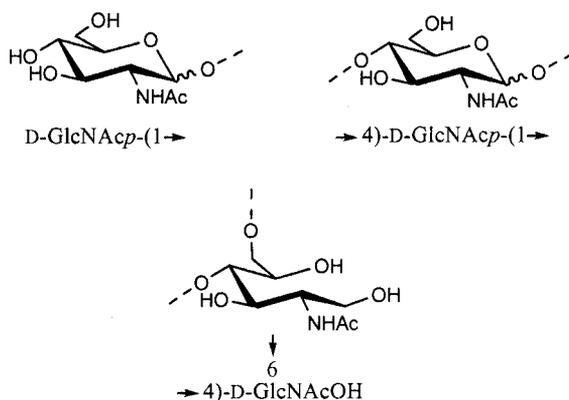


**Figura 4.32.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 4,6-di-*O*-acetil-1,3,5-tri-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol procedente del análisis de metilación de la fracción F2 (Pico B).



**Figura 4.33.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,4,5-tri-*O*-acetil-1-deutero-3,6-di-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol procedente del análisis de metilación de la fracción F2 (Pico C).

El oligosacárido presente en la fracción F2, identificado como IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:1}$ , NMe, S), presenta un residuo de glucosamina terminal (Figura 4.26), glucosamina sustituida en la posición 4 (Figura 4.27) y, por último, un residuo de glucosaminitol sustituido en las posiciones 4 y 6 (Figura 4.28). Si el enlace  $\beta(1 \rightarrow 4)$  se mantiene en todo el oligosacárido, estos datos podrían confirmar que el grupo sulfato se encuentra localizado en el *O*-6 de la unidad de glucosaminitol.



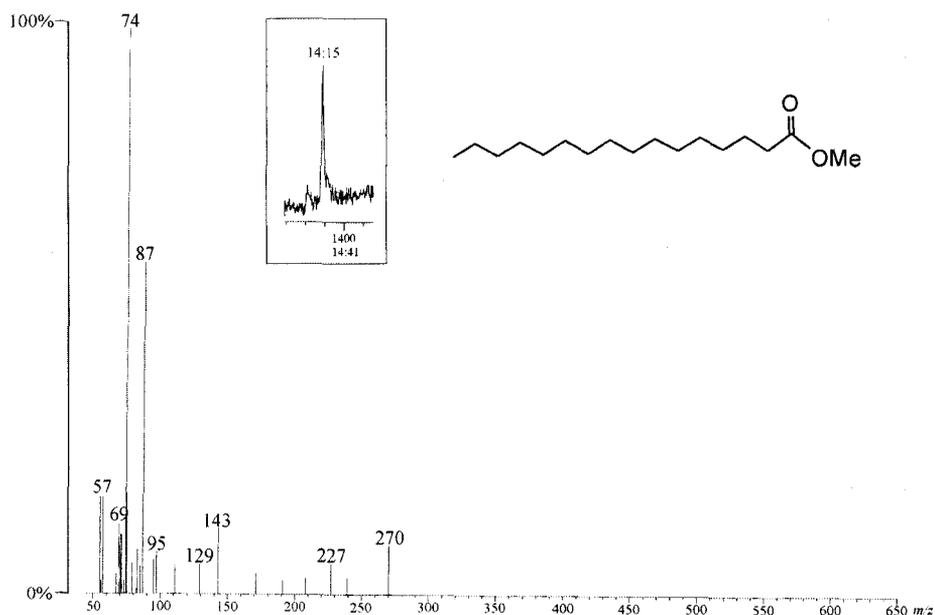
**Figura 4.34.** Unidades que componen al factor de nodulación IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:1}$ , NMe, S).

#### 4.7. Análisis e identificación de los ácidos grasos.

El análisis de los ácidos grasos presentes en las distintas fracciones aisladas se realiza según lo descrito en el apartado 2.3.4.1. Los ácidos grasos se analizan por CGL-EM mediante la formación de sus correspondientes ésteres metílicos. La localización del doble enlace en el caso de ácidos grasos insaturados (fracción F2) se realiza analizando los espectros de masas del bis-(metiltio) derivado, tal como se describe en el apartado 2.3.4.2.

##### *Fracción F1*

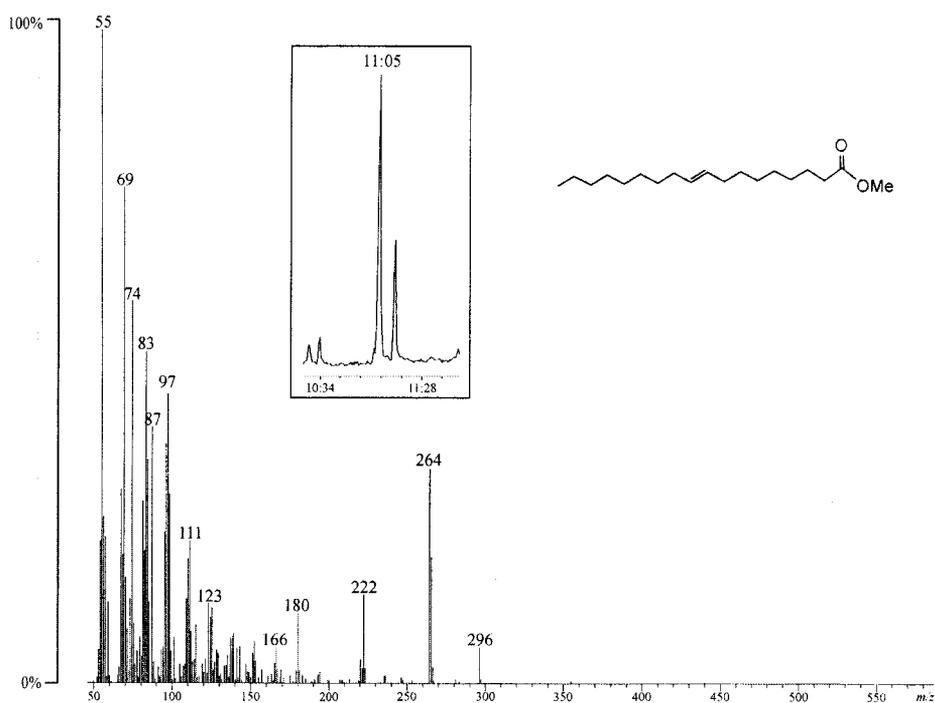
El cromatograma y espectro de masas del análisis de los ésteres metílicos de la fracción F1 se muestra en la Figura 4.35. Se observa un único pico con  $t_R = 14:15$  min. El dato del tiempo de retención junto con su espectro de masas permite identificarlo como el ácido hexadecanoico o ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ).



**Figura 4.35.** Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico o ácido palmítico ( $t_R = 14:15$  min). Recuadro: Ampliación del cromatograma CGL-EM obtenido para la fracción F1.

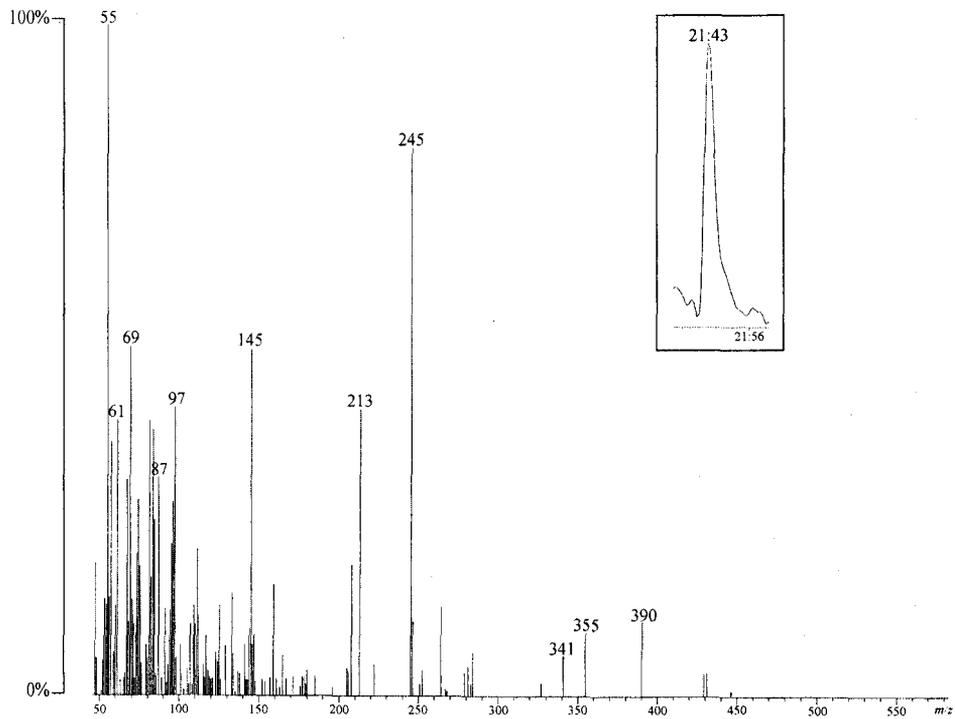
**Fracción F2**

El cromatograma y espectro de masas del análisis de los ésteres metílicos de la fracción F2 se muestra en la Figura 4.36. El pico cromatográfico tiene un  $t_R = 11:05$  min. Este dato junto con su espectro de masas permite identificarlo como el ácido octadecenoico ( $C_{18:1}$ ).



**Figura 4.36.** Espectro de masas del éster metílico del ácido octadecenoico ( $t_R = 11:05$  min). Recuadro: Ampliación del cromatograma CGL-EM obtenido para la fracción F2.

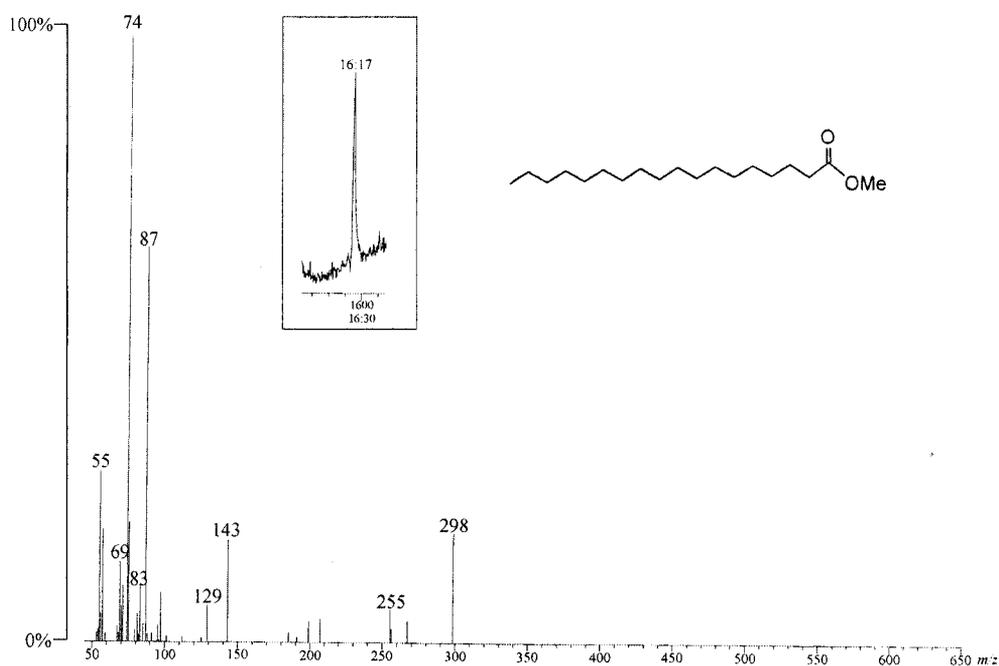
Para localizar la insaturación se prepara el bis-(metilto) derivado del éster metílico. El espectro de masas y el cromatograma que se obtiene se muestran en la Figura 4.37. De estos datos se deduce que se trata del metil éster del ácido octadec-11-enoico o ácido vacénico.



**Figura 4.37.** Espectro de masas del bis-(metilitio) derivado del éster metílico del ácido vacénico ( $C_{18:1\Delta 11}$ ). Recuadro: Ampliación del cromatograma CGL-EM obtenido para la fracción F2.

### ***Fracción F3 y F4***

El análisis de los ésteres metílicos de las fracciones F3 y F4 muestra la presencia de un único ácido graso en ambas fracciones. El dato del tiempo de retención ( $t_R = 16:17$  min) y su espectro de masas permite identificarlo como el metil éster del ácido octadecanoico o ácido esteárico ( $C_{18:0}$ ). El cromatograma y espectro de masas del análisis de los ésteres metílicos de la fracción F4 se muestra en la Figura 4.38.



**Figura 4.38.** Espectro de masas del éster metílico del ácido octadecanoico o ácido esteárico ( $t_R = 16:17$  min). Recuadro: Ampliación del cromatograma CGL-EM obtenido para la fracción F4.

#### 4.1.8. Estudio por RMN de la fracción F2.

La fracción F2, que contiene la molécula señal IV-GlcNAc-ol ( $C_{18:1}$ , NMe, S), se estudia por resonancia magnética nuclear. Se realizan los experimentos  $^1H$ -RMN,  $^{13}C$ -RMN, DQF-COSY, TOCSY, HSQC y NOESY, tal como se indica en el apartado 2.3.6.

Dada la escasa cantidad disponible no es posible realizar la asignación completa del factor de nodulación aunque sí asignar las señales correspondientes al terminal no reductor y algunas señales de los residuos internos del oligosacárido, además del ácido graso y los grupos *N*-Me y *N*-Ac. Las asignaciones se recogen en las Tablas 4.1 y 4.2.

En el espectro de  $^1H$ -RMN (Figura 4.39) se observan a campo alto señales correspondientes al grupo acilo. El triplete a  $\delta_H = 0,84$  ppm se asigna a un grupo metilo alifático y el multiplete a  $\delta_H = 1,28$  ppm se asigna a los grupos metilenos del esqueleto

del ácido graso. La señal a  $\delta_H = 1,46$  ppm se asigna al grupo metileno que está en  $\beta$  con respecto al grupo carbonilo del ácido graso; el grupo metileno en  $\alpha$  aparece  $\delta_H = 2,25$  ppm. El multiplete que aparece a  $\delta_H = 1,97$  ppm se asigna a los grupos metilenos contiguos al doble enlace. Por último, la señal a  $\delta_H = 5,33$  ppm corresponde a los protones olefinicos del ácido graso insaturado que se correlaciona con una señal a  $\delta_C = 130,0$  ppm en el espectro HSQC. En el experimento DQF-COSY (Figura 4.40) se muestra la asignación realizada.

El singulete a  $\delta_H = 2,73$  ppm corresponde al grupo *N*-Me y se correlaciona en el experimento HSQC (Figura 4.41) con una señal a  $\delta_C = 27,29$  ppm. El experimento NOESY confirma que el grupo *N*-Me se encuentra localizado en el terminal no reductor (Figura 4.42).

En la región de los protones anoméricos (entre 4-5 ppm) se muestra una señal a  $\delta_H = 4,67$  ppm que se asigna al protón anomérico con configuración  $\beta$  del terminal no reductor. Igualmente se asignan los protones anoméricos  $\beta$  ( $\delta_H = 4,45$ - $4,39$  ppm) de las unidades centrales además de una señal a  $\delta_H = 4,55$  ppm a campo más bajo que puede corresponder al protón anomérico  $\beta$  de la unidad de *N*-acetilglucosamina enlazada a la unidad de *N*-acetilglucosaminitol.

Los sistemas de espín de las diferentes unidades se asignan gracias a los experimentos DQF-COSY y TOCSY (Figuras 4.40 y 4.42, respectivamente). El resultado se muestra en la Tabla 4.I. La estructura propuesta para el factor de nodulación presente en la fracción F2 se muestra en la Figura 4.43.

Residuos	Posición							
		1	2	3	4	5	6a	6b
$\beta$ -D-GlcNMeAcil-(1→ A	$\delta_H$	4,67	3,37	3,53	3,16	3,30	3,73	3,41
	$\delta_C$	-	-	-	-	-	60,52	-
→4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→ B	$\delta_H$	4,55	3,53	3,67	3,27?	3,10?	-	-
	$\delta_C$	-	54,47	-	-	-	-	-
→4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→ C	$\delta_H$	4,45-4,39	3,63-3,48	3,28?	3,25?	-	-	-
	$\delta_C$	101,47	54,83	-	80,98-81,22	-	-	-

**Tabla 4.I.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (en ppm) de los azúcares del factor de nodulación IV-GlcNAc ( $\text{C}_{18:1}$ , NMe, S) presente en F2.

Cadenas laterales		Posición							
		1	2	3	4-9	10,13	11,12	14-17	18
Ácido Graso (C <sub>18:1</sub> )	$\delta_H$		2,25	1,46	1,28	1,97	5,33	1,28	0,84
	$\delta_C$	-	32,69	24,60	29,01	26,53	129,59	29,01	13,86
Metilo	$\delta_H$	2,23							
	$\delta_C$	27,29							
Acetilo	$\delta_H$		1,82						
	$\delta_C$	-	22,87						

**Tabla 4.2.** Desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (en ppm) de las cadenas laterales del factor de nodulación IV-GlcNAc-ol (C<sub>18:1</sub>, NMe, S) presente en F2.

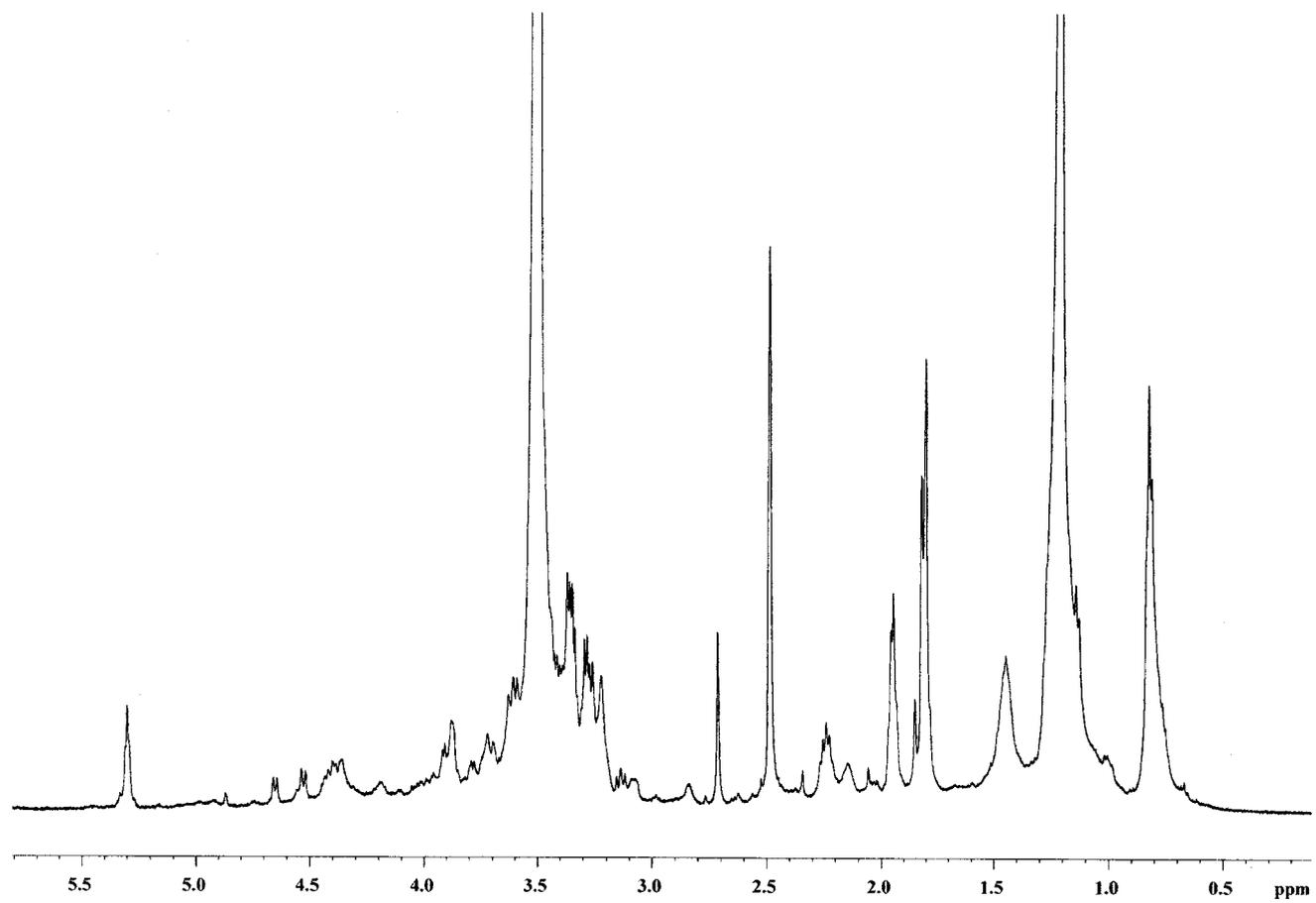


Figura 4.39. Espectro  $^1\text{H}$  RMN registrado a 500 MHz del oligosacárido presente en F2.

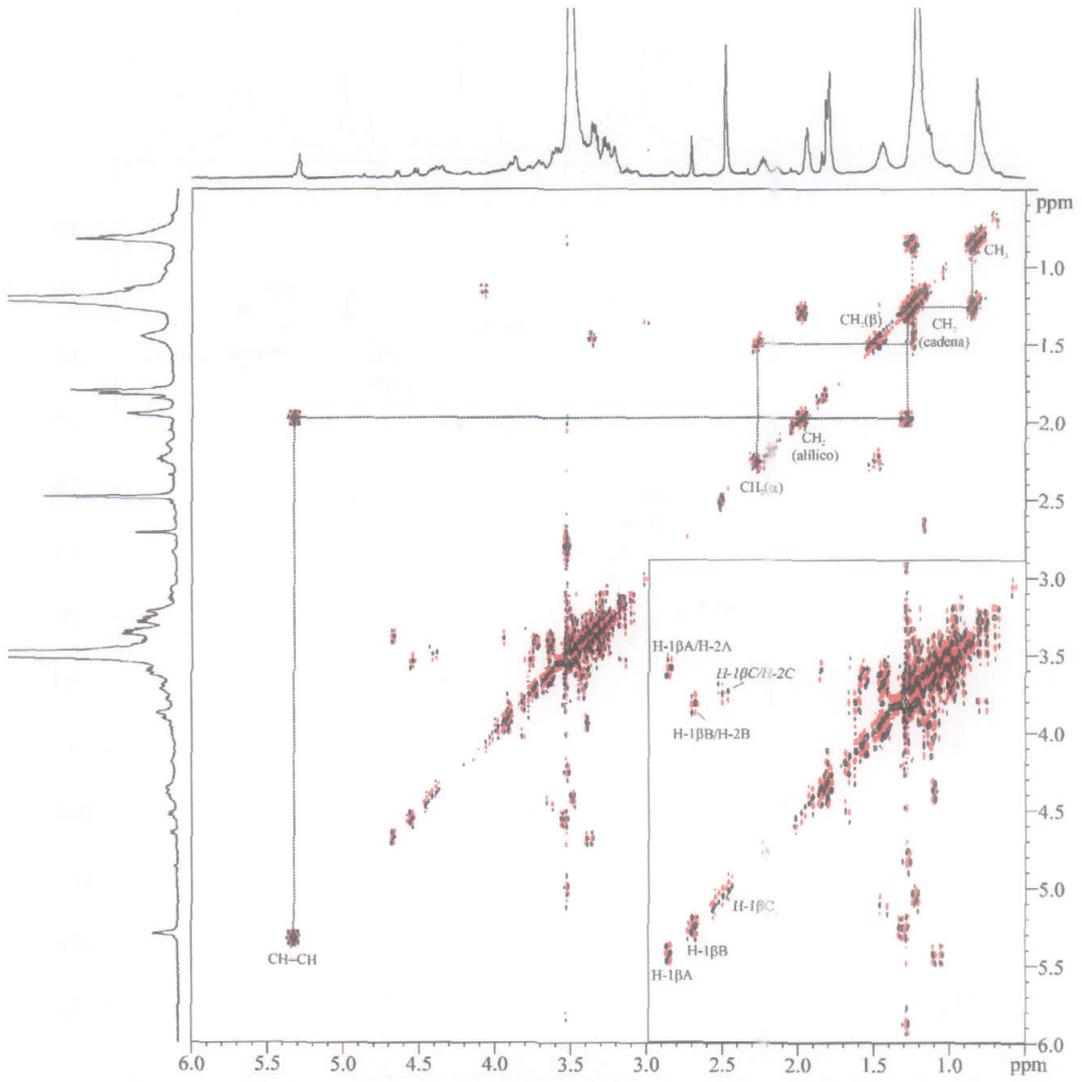


Figura 4.40. Espectro DQF-COSY de la fracción F2 registrado a 500 MHz.

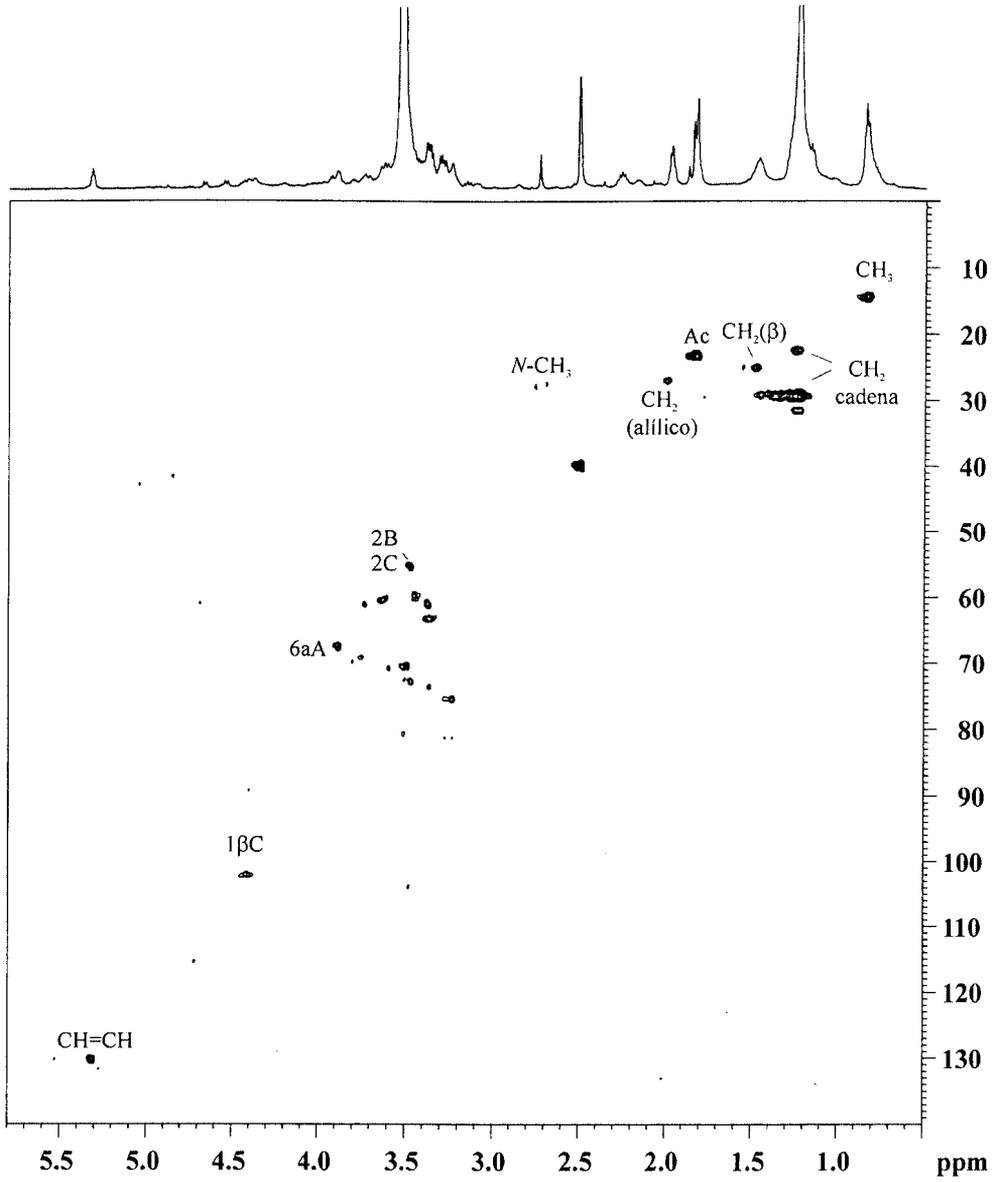


Figura 4.41. Espectro HSQC de la fracción F2 registrado a 500 MHz.

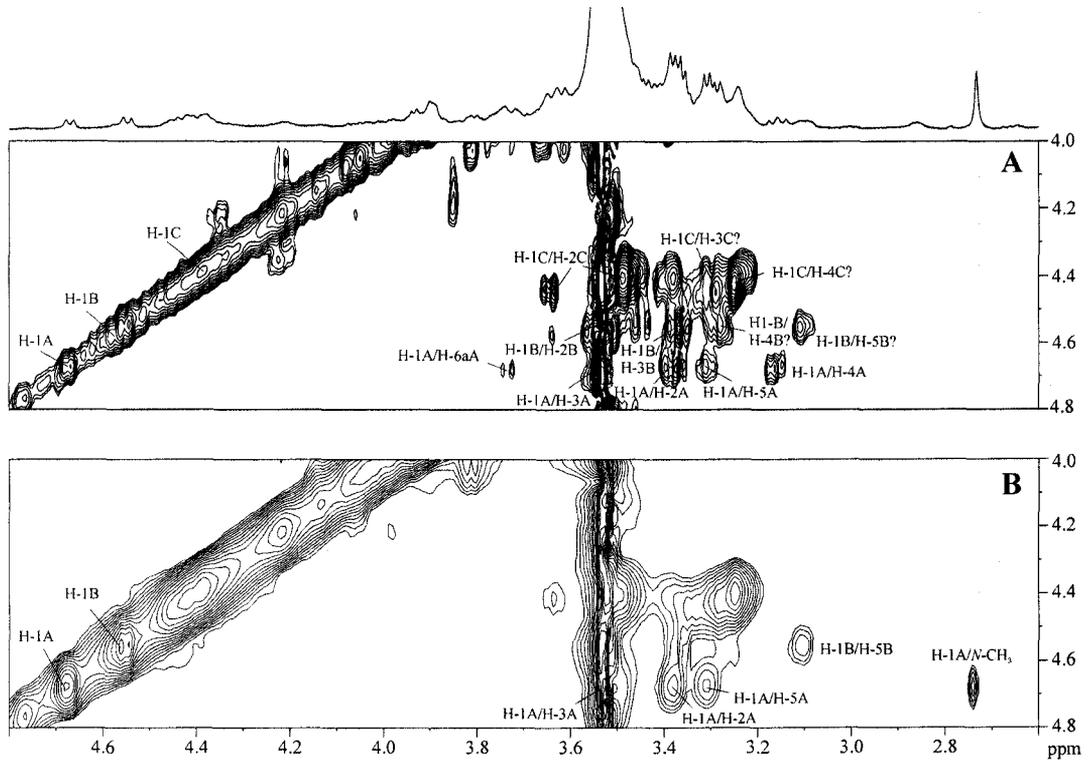


Figura 4.42. Espectros TOCSY (A) y NOESY (B) de la fracción F2 registrados a 500 MHz

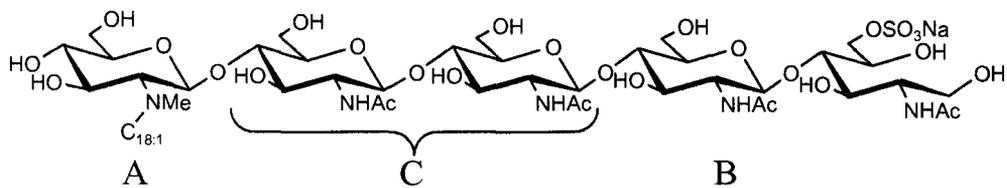


Figura 4.43. Estructura propuesta para IV-GlcNAc-ol (C<sub>18:1</sub>, NMe, S)

5. INFLUENCIA DEL pH ÁCIDO EN LOS FACTORES DE  
NODULACIÓN DE *R. tropici* CIAT899

## 5.1. INFLUENCIA DEL pH ÁCIDO EN LA PRODUCCIÓN DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN DE *Rhizobium tropici* CIAT899.

Las bacterias están expuestas a variaciones en su medioambiente natural, incluyendo la limitación de nutrientes y/o exposición a condiciones físicas forzadas, tales como temperaturas elevadas, acidez, osmolaridad alta o shock oxidativo.<sup>96-102</sup> La acidez del suelo afecta tanto a la resistencia rizobiana como a la rizosfera de las plantas, así como a la eficiencia de la nodulación, especialmente en áreas tropicales.<sup>103-107</sup> Los suelos muy ácidos suelen tener bajos niveles de fósforo, calcio, molibdeno y altas concentraciones de aluminio y manganeso, que son, a menudo, tóxicos tanto para la bacteria como para la planta. Bajo estas condiciones, la nodulación se afecta más que el propio crecimiento de la planta hospedadora o la fijación biológica de nitrógeno.<sup>96,108,109</sup>

*Rhizobium tropici* es una especie que se caracteriza por establecer procesos simbióticos con diferentes leguminosas entre ellas, *Phaseolus vulgaris* (judía). Se ha aislado en suelos de América del Sur, Francia<sup>110</sup> y varios países africanos.<sup>111</sup> *Rhizobium tropici* CIAT899 es una cepa que presenta alta tolerancia a la acidez (pH<5), a la presencia de metales pesados y a una elevada concentración de sal, siendo capaz de crecer a una temperatura de 37 °C. Además, es un buen competidor para ocupar los nódulos de judía en suelos ácidos.<sup>112,113</sup> Constituye, por tanto, un sistema idóneo para el estudio de sus propiedades simbióticas en medios acidificados.<sup>114,115</sup> En este capítulo se describe la influencia del pH ácido en la formación de los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899.

### 5.1.1. Cultivo de bacterias y cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.

#### 5.1.1.1. Cultivo de bacterias.

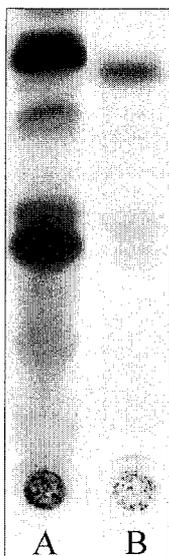
Se preparan dos cultivos de *Rhizobium tropici* CIAT899 crecidos a pH 7,0 y pH 4,6, respectivamente. En ambos casos, el medio de cultivo que se utiliza para crecer las células es el medio mínimo B<sup>-</sup> (apartado 2.1.1). El cultivo en medio ácido se consigue adicionando una disolución reguladora de ácido cítrico 26 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,6 mM (tampón citrato-fosfato) ajustándose el medio a pH 4,6. Posteriormente el medio se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Una vez enfriado se vuelve a medir el pH para comprobar que éste no varía en más de 0,1 unidades. En el caso del cultivo de *R. tropici* CIAT899 a pH neutro se sigue el mismo procedimiento para el crecimiento de células que se muestra en el apartado 2.1.1.

En ambos casos la bacteria se crece en presencia y en ausencia de apigenina que es el flavonoide inductor de la producción de los factores de nodulación para esta bacteria.

#### 5.1.1.2. Cromatografía en capa fina de los factores de nodulación.

Los factores de nodulación se marcan radiactivamente *in vivo* y se analizan por cromatografía en capa fina, empleando el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2. Se preparan dos cultivos, uno en medio neutro y otro en medio ácido (en 1 ml de medio de cultivo mínimo B' cada uno) que se marcan radiactivamente con la adición de 0,2  $\mu$ Ci de  $^{14}$ C-hidrocloruro de glucosamina. Ambos cultivos se inducen con apigenina para la producción de los factores de nodulación. Posteriormente, los cultivos se dejan crecer hasta la fase estacionaria. Las moléculas-señal se extraen con *n*-butanol saturado en agua (0,5 ml). La fase *n*-butanólica se evapora a sequedad y el residuo resultante se resuspende en *n*-butanol (40  $\mu$ l), depositándose sobre la placa de cromatografía en capa fina (10  $\mu$ l). Los factores de nodulación se eluyen con una mezcla acetonitrilo:agua (1:1).

La placa de c.c.f. obtenida para los dos cultivos, ácido y neutro, inducidos se muestra en la Figura 5.1. Se observa un aumento significativo en el número y en la concentración de las bandas presentes en la cepa crecida en condiciones ácidas (A) con respecto al medio neutro (B).

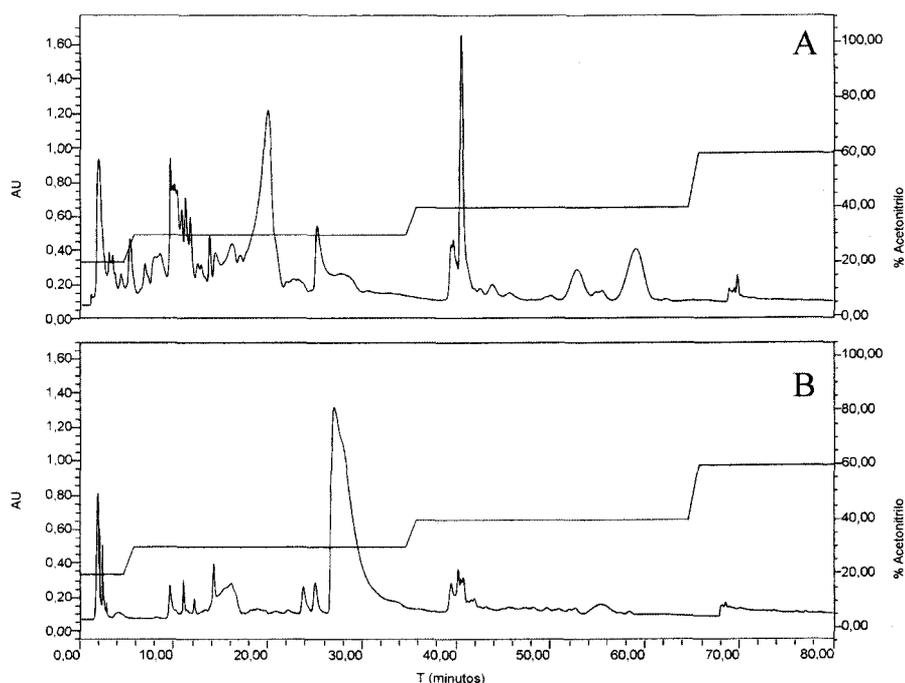


**Figura 5.1.** Cromatografía en capa fina de *Rhizobium tropici* CIAT899 pH 4,6 (A) y pH 7 (B).

### 5.1.2. Aislamiento y purificación de los factores de nodulación

Dos cultivos inducidos para la producción y aislamiento de los factores de nodulación a pH neutro y ácido (10 l cada uno) y dos cultivos no inducidos a pH neutro y ácido (5 l cada uno), se tratan según se indica en el apartado 2.2.1.<sup>41</sup> Los extractos butanólicos se concentran a sequedad en el rotavapor a 50 °C y se redisuelven en acetonitrilo al 60% (5 ml/l de cultivo) dejándose en agitación durante 12 horas. Posteriormente, las muestras se diluyen con agua hasta 20% en acetonitrilo. Estas disoluciones se purifican mediante extracción en fase sólida (apartado 2.2.2.1). Las fracciones correspondientes a la elución con acetonitrilo al 20, 45 y 60 % se concentran y se liofilizan. Las fracciones del 45% (cultivo a pH ácido y neutro) se cromatografían por HPLC según las condiciones descritas en el apartado 2.2.2.2.

Los cromatogramas de HPLC obtenidos para la fracción del 45% en acetonitrilo de *R. tropici* CIAT899 inducido con apigenina a pH ácido (A) y pH neutro (B) se muestran en la Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Cromatogramas de HPLC del extracto butanólico inducido con apigenina. A. pH 4,6. B. pH 7,0. Se especifica el gradiente empleado en porcentaje de acetonitrilo.

En los cromatogramas de HPLC (Figura 5.2) se observa un importante aumento en el número y áreas de los picos cromatográficos. Dado el cambio significativo producido, se procede al aislamiento y purificación de los factores de nodulación excretados en ambos medios.

Se aíslan un total de diecisiete fracciones del cultivo a pH neutro distribuidas en tres zonas de diferente polaridad; Las ocho primeras fracciones se eluyen con 30% de acetonitrilo, otras ocho con 40% de acetonitrilo y la última al 60%. Del cultivo en medio ácido se aíslan dieciséis fracciones distribuidas en tres zonas de polaridad diferente, siete de las cuales se eluyen con 30% de acetonitrilo, ocho al 40% y una al 60%. Las fracciones se nombran según su tiempo de retención en la cromatografía líquida de alta resolución. Dado el elevado número de fracciones y puesto que en cada una de ellas existe una enorme variabilidad estructural y que además, en algunos casos un mismo factor de nodulación aparece en fracciones cromatográficas distintas, el estudio de las moléculas-señal presentes en ambos cultivos se va a realizar por tipo de oligosacárido aislado.

### 5.1.3. Análisis estructural de los factores de nodulación por Espectrometría de Masas.

El análisis estructural de los LCOs producidos por *Rhizobium tropici* CIAT899 fue publicado por Folch-Mallol *et al* en 1996.<sup>19</sup> En este estudio se identificaron un total de dieciséis factores de nodulación diferentes que se caracterizan por ser oligosacáridos constituidos por cuatro y/o cinco unidades de glucosamina y sustituidos por un grupo sulfato localizado en el O-6 del terminal reductor y por un grupo N-Me en el terminal no reductor. Además se identificó un nuevo tipo de factor de nodulación que tiene como terminal reductor una unidad de manosa. El resultado de este estudio se recoge en la Tabla 5.1, donde además se representan los iones pseudomoleculares junto con los iones oxonios identificados.

Dado que en el análisis por Espectrometría de Masas de los factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio ácido se han empleado técnicas más sensibles que las utilizadas por Folch-Mallol *et al*, y dado que en ese trabajo no se empleó la bacteria nativa, sino un mutante FITA de *R. tropici* CIAT899 (mutante en nodD capaz de activar la transcripción de los genes de nodulación en ausencia de inductor), se decidió volver a analizar los factores de nodulación de esta cepa producidos en condiciones neutras, usando la nueva metodología para así poder establecer sin lugar a dudas la influencia del pH ácido en la formación de los factores de nodulación producidos por esta cepa.

Las fracciones aisladas por HPLC de *Rhizobium tropici* CIAT899 a pH 4,6 y a pH 7,0 se preparan para su análisis por Espectrometría de Masas tal como se indica en el apartado 2.5.

[M-H] <sup>-</sup> o [M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	Fragmentos B <sub>1</sub> ( <i>m/z</i> )	Estructura
1306	---	V(C <sub>16:1</sub> , S)
1320	---	V(C <sub>16:1</sub> , NMe, S)
1322	1023, 820, 617, 414	V(C <sub>16:0</sub> , NMe, S)
1334	1035, 832, 629, 426	V(C <sub>18:1</sub> , S)
1348	1049, 846, 643, 440	V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)
1145	846, 643, 440	IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)
1308	---	V(C <sub>16:0</sub> , S)
1350	1051, 848, 645, 442	V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)
1147	848, 645, 442	IV(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)
1376	1077, 874, 671, 468	V(C <sub>20:1</sub> , NMe, S)
1378	1079, 876, 673, 470	V(C <sub>20:0</sub> , NMe, S)
1215	1035, 832, 629, 426	IV-Man(C <sub>18:1</sub> )
1256	1035, 832, 629, 426	V(C <sub>18:1</sub> )
1270	1049, 846, 643, 440	V(C <sub>18:1</sub> , NMe)
1053	832, 629, 426	IV(C <sub>18:1</sub> )
1067	---	IV(C <sub>18:1</sub> , NMe)

**Tabla 5.1.** Factores de nodulación de *R. tropici* CIAT899 encontrados por Folch-Mallol *et al* (1996) mediante FAB.

Todas las estructuras de los LCOs están propuestas en base a los resultados de análisis de azúcares y/o metilación por CGL-EM de algunas de las fracciones aisladas por HPLC, y fundamentalmente a partir de los resultados de FAB, MALDI-TOF, ES Q-o-TOF, MALDI Q-o-TOF y del análisis por Espectrometría de Masas en tándem (CID MALDI Q-o-TOF y CID ES Q-o-TOF). El empleo de estas técnicas permite identificar 69 oligosacáridos diferentes en los dos cultivos analizados, 56 factores de nodulación diferentes producidos en condiciones ácidas y 29 en condiciones neutras, siendo sólo 16 de estas estructuras comunes en ambas condiciones.

En general, todos los factores de nodulación aislados procedentes de *R. tropici* CIAT899 a pH 7,0 y a pH 4,6 presentan la estructura típica de las moléculas de reconocimiento consistente en: un esqueleto lineal de cuatro a cinco unidades de GlcN sustituido por diferentes ácidos grasos en el terminal no reductor (insaturados, saturados o hidroxilados), pudiendo llevar, además, sustituyentes en el terminal reductor y/o en el no reductor del oligosacárido. La mayoría de los oligosacáridos aislados en ambas condiciones son similares a los factores de nodulación descritos por Folch-Mallol *et al* para esta cepa.

En total, se identifican hasta seis tipos diferentes de factores de nodulación entre los dos cultivos de *Rhizobium tropici* CIAT899 analizados:

El primer tipo lo forman oligosacáridos sin sustituir, el segundo tipo lo constituyen LCOs sustituidos por un grupo sulfato en el terminal reductor, el tercero está formado por factores de nodulación sustituidos en el terminal no reductor por un grupo *N*-metilo que pueden a su vez, estar sulfatados o no (son los más abundantes). Estos tres primeros tipos están presentes tanto en medio ácido como en medio neutro. El cuarto tipo presenta una unidad de manosa como terminal reductor y sólo se detecta en condiciones neutras. El quinto tipo se produce únicamente en condiciones neutras y se caracterizan por tener un grupo carbamoilo como sustituyente en el terminal no reductor (con o sin manosa como terminal reductor). Por último, el sexto tipo se produce solamente en medio ácido y tiene dos grupos sulfatos como sustituyentes, uno en el terminal reductor y otro en el no reductor.

En la Tabla 5.2 se muestra todos los factores de nodulación identificados, junto con los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$ .

Estructura	[M+Na] <sup>+</sup> m/z	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 4,6	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 7,0
V (C <sub>22:1</sub> )	1334	-	B <sub>n</sub> 1113, 910, 707, 504 Y <sub>n</sub> 244, 447, 650, 853
V(C <sub>20:0</sub> )	1308	B <sub>n</sub> 1087, 884, 681, 478 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853	B <sub>n</sub> 1087, 884, 681, 478
V(C <sub>20:1</sub> )	1306	B <sub>n</sub> 1085, 882, 679, 476	B <sub>n</sub> 1085, 882, 679, 476 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853
V(C <sub>18:0</sub> )	1280	B <sub>n</sub> 1059, 856, 653, 450	-
V(C <sub>18:1</sub> )	1278	B <sub>n</sub> 1057, 854, 651, 448	-
V(C <sub>16:0</sub> )	1252	B <sub>n</sub> 1031, 828, 625, 422	-
V(C <sub>14:0-OH</sub> )	1240	B <sub>n</sub> 1019, 816, 613, 410	-
V (C <sub>14:0</sub> )	1224	-	B <sub>n</sub> 1003, 800, 597, 394 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853
V(C <sub>14:1</sub> )	1222	B <sub>n</sub> 1001, 798, 595, 392	-
IV (C <sub>22:0-OH</sub> )	1149	-	B <sub>n</sub> 928, 725, 522
IV(C <sub>20:0-OH</sub> )	1121	B <sub>n</sub> 900, 697, 494	-
IV (C <sub>20:0</sub> )	1105	B <sub>n</sub> 884, 681, 478	-
IV(C <sub>20:1</sub> )	1103	+	-
IV(C <sub>18:0-OH</sub> )	1093	B <sub>n</sub> 872, 669, 466 Y <sub>n</sub> 244, 447, 650	-
IV(C <sub>18:1</sub> )	1075	B <sub>n</sub> 854, 651, 448	+
IV(C <sub>16:0-OH</sub> )	1065	B <sub>n</sub> 844, 641, 438	-
IV(C <sub>16:0</sub> )	1049	B <sub>n</sub> 828, 625, 422	+

**Tabla 5.2.** Factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 en condiciones neutras y ácidas. Se indica los iones-fragmento tipo B<sub>n</sub> e Y<sub>n</sub>.

Estructura	[M+Na] <sup>+</sup> m/z	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 4,6	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 7,0
IV(C <sub>14:0</sub> -OH)	1037	B <sub>n</sub> 816, 613, 410	-
IV(C <sub>14:0</sub> )	1021	B <sub>n</sub> 800, 597, 394 Y <sub>n</sub> 244, 447, 650	-
IV(C <sub>10:0</sub> )	965	B <sub>n</sub> 744, 541, 338	-
-----			
V(C <sub>20:0</sub> , S)	1410	B <sub>n</sub> 1087, 884, 681 Y <sub>n</sub> 549, 752, 955	+
V(C <sub>20:1</sub> , S)	1408	B <sub>n</sub> 1085, 882, 679, 476 Y <sub>n</sub> 549, 752, 955	B <sub>n</sub> 1085, 882, 679, 476 Y <sub>n</sub> 549, 752, 955
V(C <sub>18:0</sub> , S)	1382	B <sub>n</sub> 1059, 856, 653, 450	-
V(C <sub>18:1</sub> , S)	1380	B <sub>n</sub> 1057, 854, 651, 448	-
V(C <sub>16:0</sub> , S)	1354	B <sub>n</sub> 1031, 828, 625, 422	-
IV(C <sub>20:0</sub> , S)	1207	B <sub>n</sub> 884, 681, 478	-
IV(C <sub>20:1</sub> , S)	1205	-	B <sub>n</sub> 882, 679, 476
IV(C <sub>18:0</sub> , S)	1179	B <sub>n</sub> 856, 653, 450	-
-----			
V(C <sub>20:0</sub> -OH, NMe, S)	1440	B <sub>n</sub> 1117, 914, 711, 508	-
V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	1396	B <sub>n</sub> 1073, 870, 667, 464 Y <sub>n</sub> 346, 549, 752, 955	+
V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	1394	B <sub>n</sub> 1071, 868, 665, 462 Y <sub>n</sub> 549, 752, 955	B <sub>n</sub> 1071, 868, 665, 462 Y <sub>n</sub> 549, 752, 955
V(C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	1368	B <sub>n</sub> 1045, 842, 639, 436 Y <sub>n</sub> 549, 752, 955	-
V(C <sub>16:1</sub> , NMe, S)	1366	+	+
V(C <sub>22:0</sub> -OH, NMe)	1366	-	B <sub>n</sub> 1145, 942, 739, 536

**Tabla 5.2 (continuación).** Factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 en condiciones neutras y ácida. Se indica los iones-fragmentos tipo B<sub>n</sub> e Y<sub>n</sub>.

Estructura	[M+Na] <sup>+</sup> m/z	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 4,6	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 7,0
V(C <sub>14:0</sub> , NMe, S)	1340	B <sub>n</sub> 1017, 814, 611, 408	-
V(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe)	1338	B <sub>n</sub> 1117, 914, 711, 508	-
V(C <sub>20:1-OH</sub> , NMe)	1336	-	B <sub>n</sub> 1115, 912, 709, 506 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853
V(C <sub>20:0</sub> , NMe)	1322	B <sub>n</sub> 1108, 898, 695, 492 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853	B <sub>n</sub> 1108, 898, 695, 492 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853
V(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)	1310	B <sub>n</sub> 1089, 886, 683, 480 Y <sub>n</sub> 244, 447, 650, 853	-
V(C <sub>18:0</sub> , NMe)	1294	B <sub>n</sub> 1073, 870, 667, 464	+
V(C <sub>18:1</sub> , NMe)	1292	B <sub>n</sub> 1071, 868, 665, 462	+
V(C <sub>16:0-OH</sub> , NMe)	1282	B <sub>n</sub> 1061, 858, 655, 452	-
V(C <sub>16:0</sub> , NMe)	1266	B <sub>n</sub> 1045, 842, 639, 436	B <sub>n</sub> 1045, 842, 639, 436 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853
V(C <sub>16:1</sub> , NMe)	1264	B <sub>n</sub> 1043, 840, 637, 434 Y <sub>n</sub> 244, 447, 650, 853	-
V(C <sub>14:0-OH</sub> , NMe)	1254	B <sub>n</sub> 1033, 830, 627, 424	-
V(C <sub>14:0</sub> , NMe)	1238	B <sub>n</sub> 1017, 814, 611, 408 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853	+
IV(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe, S)	1237	B <sub>n</sub> 914, 711, 508	-
V(C <sub>12:0</sub> , NMe)	1210	-	B <sub>n</sub> 989, 786, 583, 380 Y <sub>n</sub> 447, 650, 853
IV(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	1193	B <sub>n</sub> 870, 667, 464	+
IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	1191	+	-
V(C <sub>10:0</sub> , NMe)	1182	B <sub>n</sub> 961, 758, 555, 352	-

**Tabla 5.2 (continuación).** Factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 en condiciones neutras y ácidas. Se indica los iones-fragmento tipo B<sub>n</sub> e Y<sub>n</sub>.

Estructura	[M+Na] <sup>+</sup> m/z	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 4,6	<i>R. tropici</i> CIAT899 pH 7,0
IV(C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	1165	B <sub>n</sub> 842, 639, 436	-
IV(C <sub>14:0</sub> , NMe, S)	1137	B <sub>n</sub> 814, 611, 408	-
IV(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe)	1135	B <sub>n</sub> 914, 711, 508	-
IV(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)	1107	B <sub>n</sub> 886, 683, 480	-
IV(C <sub>18:0</sub> , NMe)	1091	B <sub>n</sub> 870, 667, 464	-
IV(C <sub>18:1</sub> , NMe)	1089	B <sub>n</sub> 868, 665, 462	B <sub>n</sub> 868, 665, 462 Y <sub>n</sub> 244, 447, 650
IV(C <sub>16:0</sub> , NMe)	1063	-	+
IV(C <sub>16:1</sub> , NMe)	1061	B <sub>n</sub> 840, 637, 434	-
IV(C <sub>14:0-OH</sub> , NMe)	1051	B <sub>n</sub> 830, 627, 424	-
IV(C <sub>14:0</sub> , NMe)	1035	B <sub>n</sub> 814, 611, 408 Y <sub>n</sub> 447, 650	-
IV(C <sub>14:1</sub> , NMe)	1033	B <sub>n</sub> 812, 609, 406 Y <sub>n</sub> 447, 650	-
IV (C <sub>10:0</sub> , NMe)	979	B <sub>n</sub> 758, 555, 352	-
IV-Man (C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)	1186	-	B <sub>n</sub> 1006, 803, 600, 397
IV-Man (C <sub>12:0</sub> , NMe)	1169	-	B <sub>n</sub> 989, 786, 583, 380 Y <sub>n</sub> 406, 609, 812
IV-Man (C <sub>18:1</sub> , NMe)	1251	-	B <sub>n</sub> 1071, 868, 665, 462
V(C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)	1227	-	B <sub>n</sub> 1006, 803, 600, 397
V(C <sub>10:0-OH</sub> , NMe, Cb)	1241	-	B <sub>n</sub> 1020, 817, 614, 411
V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S, S)	1496	B <sub>n</sub> 1173, 970, ---, --- Y <sub>n</sub> 549, 752, 955	-

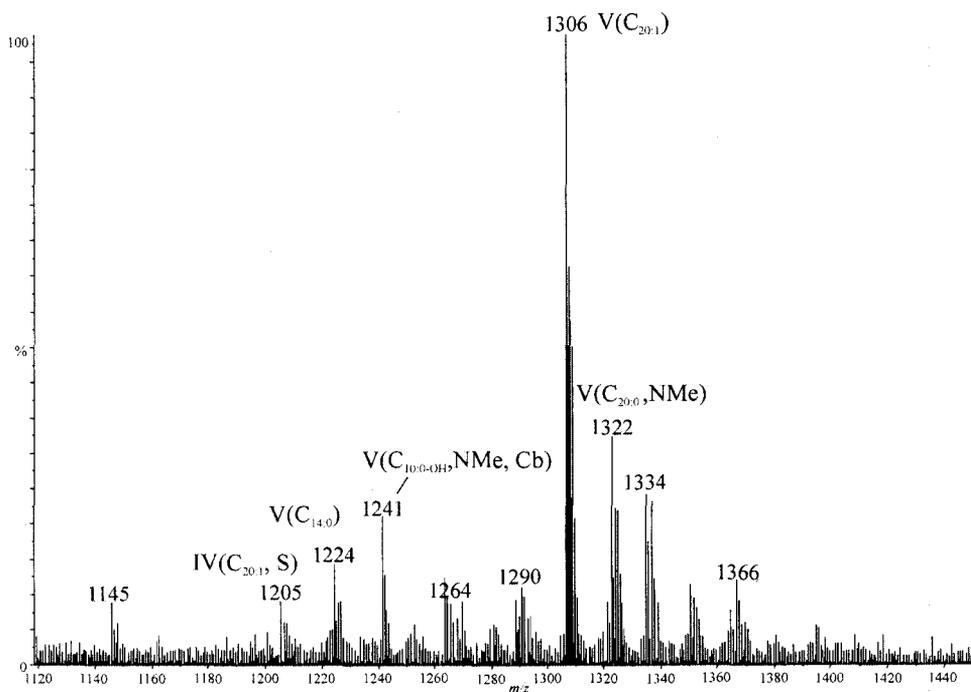
**Tabla 5.2 (continuación).** Factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 en condiciones neutras y ácidas. Se indica los iones-fragmento tipo B<sub>n</sub> e Y<sub>n</sub>

Los seis tipos de factores de nodulación identificados por Espectrometría de Masas son los siguientes:

### 1) Factores de nodulación sin sustituir.

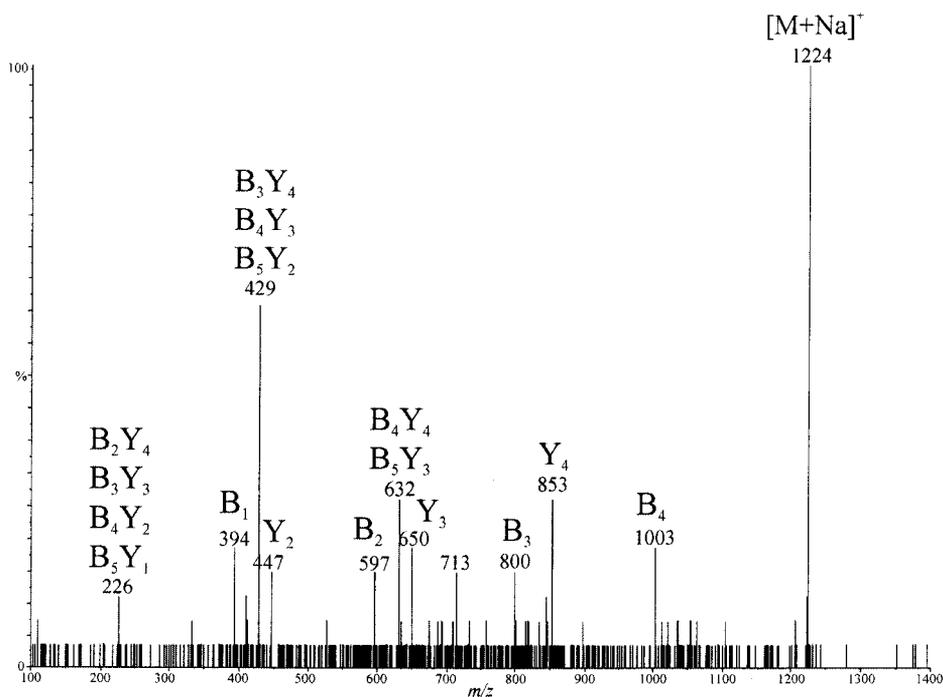
Constituyen el primer tipo de moléculas de reconocimiento identificado y a su vez el más sencillo. Se producen tanto a pH neutro como a pH ácido en muy baja proporción hasta el punto de que sólo pueden ser identificados cuando las fracciones se analizan mediante MALDI Q-o-TOF o Es Q-o-TOF.

Son estructuras simples que no presentan ningún sustituyente en el esqueleto del oligosacárido, si bien, pueden presentar diversos sustituyentes *N*-acilos que varían de un medio a otro. El espectro de masas MALDI Q-o-TOF de la fracción F55 del cultivo a pH neutro se muestra en la Figura 5.3. En éste se identifican alguna de estas moléculas.



**Figura 5.3.** Espectro de masas MALDI Q-o-TOF de la fracción F55 de *R. tropici* CIAT899 en condiciones neutras

Dada la imposibilidad de realizar estudios por metilación, ácidos grasos y/o RMN debido a la escasa cantidad disponible, estos oligosacáridos se caracterizan en base al espectro tándem obtenido. Los espectros CID contienen los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  que permiten identificar el factor de nodulación aislado. Por ejemplo, en la Figura 5.4 se muestra el espectro CID-MSMS del ion pseudomolecular a  $m/z$  1224 presente en la fracción F55 de *R. tropici* CIAT899 a pH neutro.

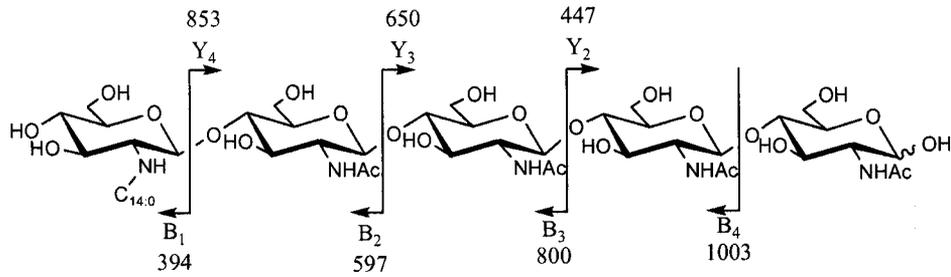


**Figura 5.4.** Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF de  $[M+Na]^+$  a 1224 Th.

La serie de iones  $[B_n+Na]^+$  encontrada es:  $m/z$  394, 597, 800 y 1003; y la serie  $[Y_n+Na]^+$  es:  $m/z$  447, 650 y 853. Además, se identifican algunos iones-fragmento procedentes de roturas dobles dentro del oligosacárido (tipo  $B_nY_n$ ): la señal a  $m/z$  226 se asigna a  $B_2Y_4$ ,  $B_3Y_3$ ,  $B_4Y_2$  y/o  $B_5Y_1$ , la señal a  $m/z$  429 se asigna a  $B_4Y_3$ ,  $B_3Y_4$  y/o  $B_5Y_2$  y la señal a  $m/z$  632 se asigna a  $B_4Y_4$  y/o  $B_5Y_3$ .

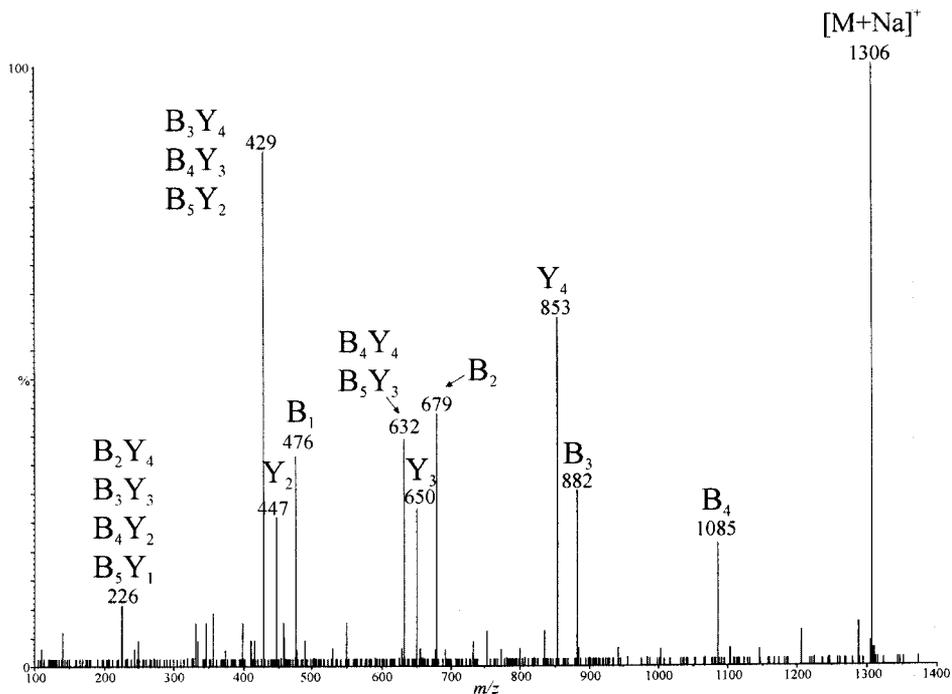
Del análisis de este espectro de masas CID se concluye que se trata de un oligosacárido de cuatro unidades de GlcNAc y una unidad de *N*-acilglucosamina como terminal no reductor. El valor de  $B_1$  parece indicar que se encuentra acilado en el terminal no reductor por un ácido graso saturado de catorce átomos de carbono. No presenta sustituyentes en el esqueleto. Su estructura se representa como V ( $C_{14:0}$ ). Este LCO sólo

se identifica a pH 7 y no a pH 4,6, sin embargo se ha encontrado su homólogo de cuatro unidades de glucosamina en ambas condiciones. El esquema de fragmentación para esta molécula se muestra en la Figura 5.5:



**Figura 5.5.** Esquema de fragmentación del factor de nodulación V (C<sub>14:0</sub>).

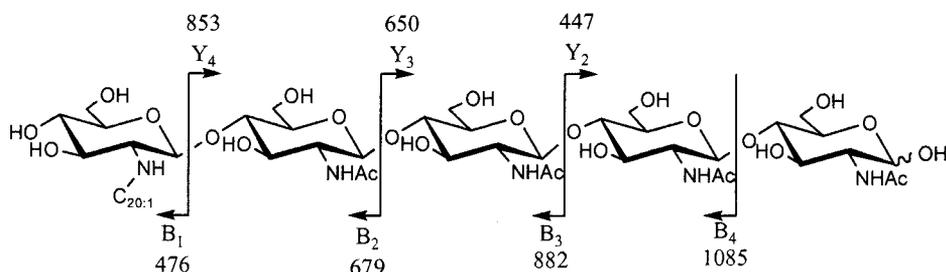
El espectro de masas CID del factor de nodulación cuyo ion pseudomolecular  $[M+Na]^+$  aparece en el espectro de masas a  $m/z$  1306 de la fracción F55 del cultivo en medio neutro se muestra en la Figura 5.6.



**Figura 5.6.** Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF de  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1306.

La serie de iones-fragmento  $[B_n+Na]^+$  es:  $m/z$  476, 679, 882 y 1085; y la serie de iones-fragmento  $[Y_n+Na]^+$  es:  $m/z$  447, 650 y 853. La serie de iones-fragmento procedentes de roturas dobles dentro del oligosacárido se identifican a  $m/z$  226 ( $B_2Y_4$ ,  $B_3Y_3$ ,  $B_4Y_2$  y/o  $B_5Y_1$ ), a  $m/z$  429 ( $B_3Y_4$ ,  $B_4Y_3$  y/o  $B_5Y_2$ ) y a  $m/z$  632 ( $B_4Y_4$  y/o  $B_5Y_3$ ).

Al igual que el factor de nodulación anterior, éste no presenta modificaciones en su esqueleto. El valor de  $B_1$  se corresponde con un residuo de masas de una glucosamina terminal *N*-acilada por un ácido graso monoinsaturado de 20 carbonos. Su estructura se representa como V ( $C_{20:1}$ ). El esquema de fragmentación viene representado en la Figura 5.7.



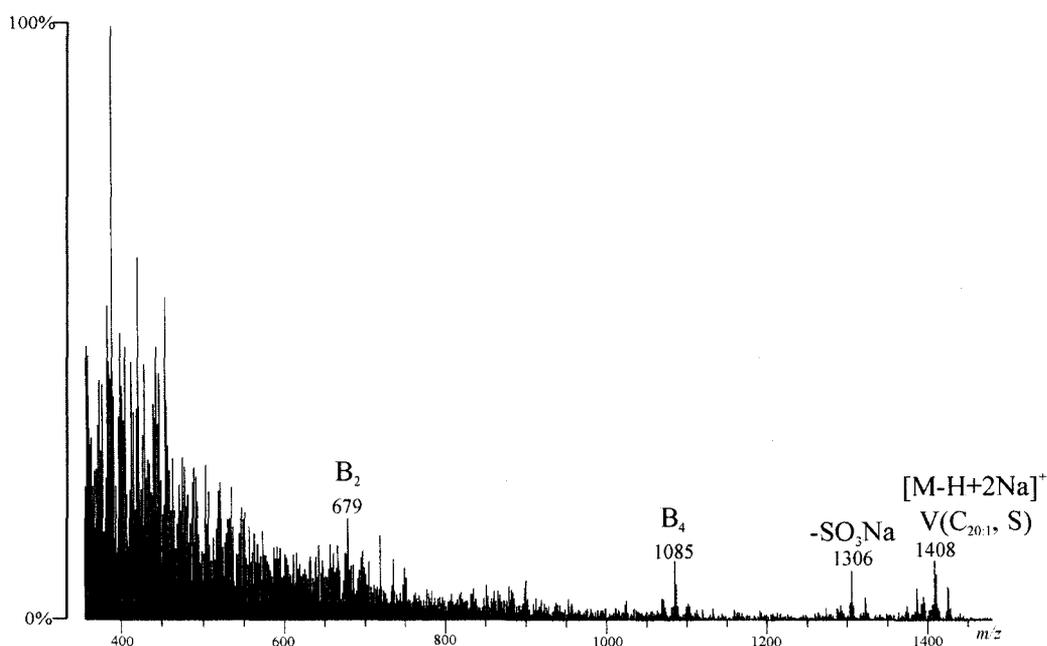
**Figura 5.7.** Esquema de fragmentación del factor de nodulación V ( $C_{20:1}$ ).

## 2) Factores de nodulación sulfatados.

Un segundo tipo de factores de nodulación presente en los dos cultivos de *R. tropici* CIAT899 analizados es el formado por lipooligosacáridos que presentan un grupo sulfato en el terminal reductor del oligosacárido. Todas las fracciones sulfatadas analizadas muestran en sus espectros de FAB las señales correspondientes a los aductos de la molécula (como sal sódica) con sodio y con potasio  $[M-H+2Na]^+$  y  $[M-H+Na+K]^+$ , respectivamente, junto con la pérdida de 102 Th (ion-fragmento característico en factores de nodulación sulfatados en el terminal reductor).<sup>92</sup>

Como ejemplo, en la Figura 5.8 se muestra el espectro FAB de la fracción F24 de HPLC de *R. tropici* CIAT899 a pH neutro, que contiene mayoritariamente un LCO de ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1408. Se emplea la matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobenílico (1:1) para la obtención del espectro y se registra en modo positivo. Se identifican también el ion pseudomolecular  $[M-H+Na+K]^+$  a  $m/z$  1424, la pérdida del grupo sulfato a 1306 Th y algunos de los iones oxonios a  $m/z$  1085 y 679. Su estructura se

representa como V ( $C_{20:1}$ , S). Este oligosacárido también se identifica en condiciones ácidas.



**Figura 5.8.** Espectro de FAB de la fracción F24 de *R. tropici* CIAT899 a pH 7 realizado con glicerol: alcohol m-nitrobencílico.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos se realiza el espectro CID MALDI Q-o-TOF. Se selecciona y se fragmenta el ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  de  $m/z$  1408 (Figura 5.9).

La serie de iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  muestran que el grupo sulfato se encuentra localizado en el terminal reductor del oligosacárido. La serie  $[Y_n+Na]^+$  es:  $m/z$  549, 752 y 955; y la serie  $[B_n+Na]^+$  es:  $m/z$  476, 679, 882 y 1085. Por último, se identifican iones-fragmento procedentes de doble rotura dentro del factor de nodulación (tipo  $B_nY_n$ ): la señal a  $m/z$  429 se asigna a  $B_4Y_3$  y/o  $B_3Y_4$  y la señal a  $m/z$  632 se asigna a  $B_4Y_4$ ; y otro procedente de rotura de anillo,  $^{0,2}A_5$  a  $m/z$  1307.

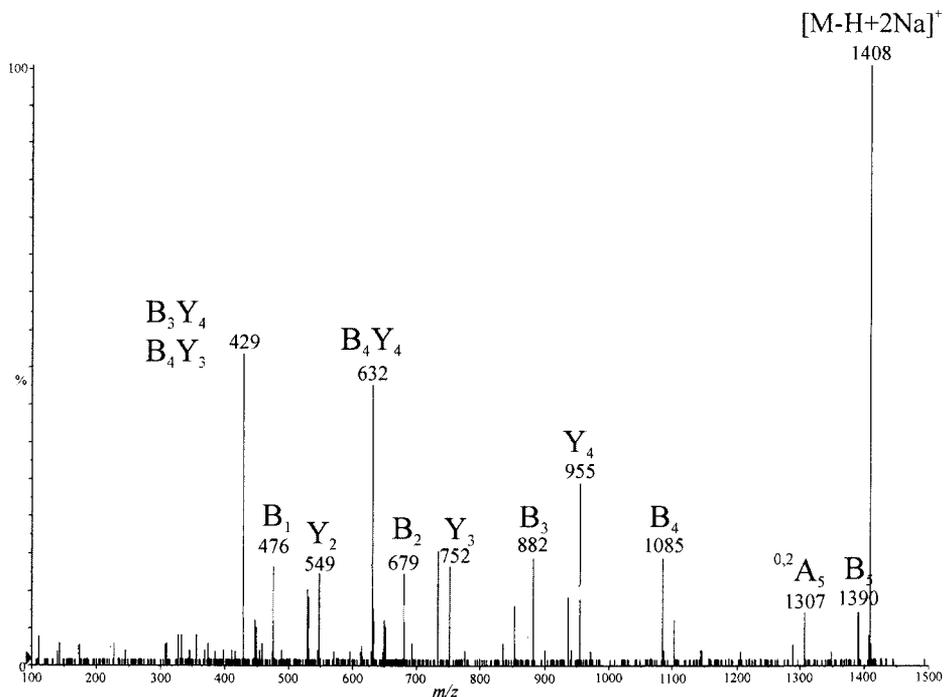


Figura 5.9. Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF de  $[M-H+2Na]^+ = 1408$ .

Analizando estos resultados se deduce que se trata de un oligosacárido formado por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de glucosamina *N*-acilada por el ácido graso  $C_{20:1}$ . Además, dada la diferencia entre el ion pseudomolecular y el valor del ion  $B_4$ , junto con el valor de  $Y_1$ , se deduce que el grupo sulfato identificado se encuentra en el terminal reductor del factor de nodulación. El esquema de fragmentación de este factor de nodulación se muestra en la Figura 5.10.

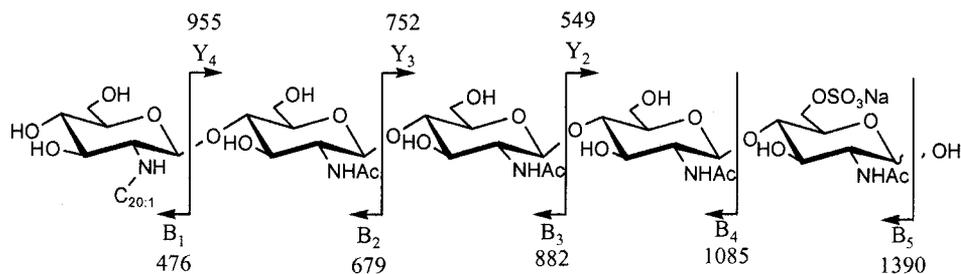
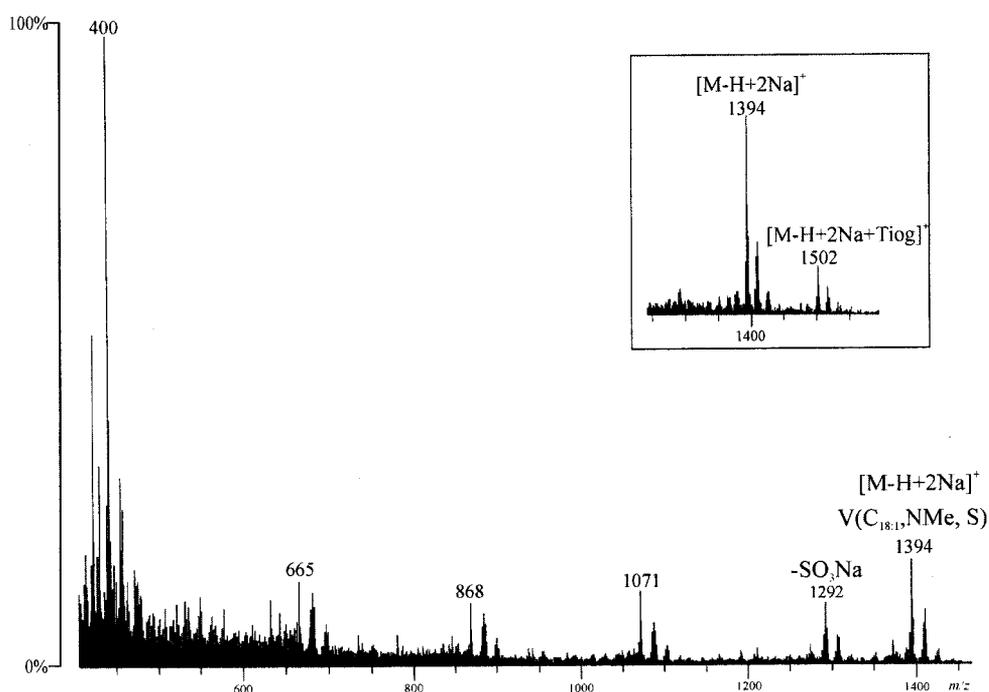


Figura 5.10. Esquema de fragmentación del factor de nodulación V ( $C_{20:1}$ , S)

### 3) Factores de nodulación conteniendo *N*-Me.

Un tercer tipo de molécula de reconocimiento analizada es el de aquellos LCOs que presentan un grupo *N*-Me en el terminal no reductor del oligosacárido. Además, puede llevar también un grupo sulfato en el terminal reductor.

El espectro de FAB de la fracción F20 del cultivo en medio ácido empleando la matriz glicerol: alcohol *m*-nitrobencílico (1:1) y la región pseudomolecular del espectro de FAB realizado con tioglicerol (en el recuadro) se muestran en la Figura 5.11.

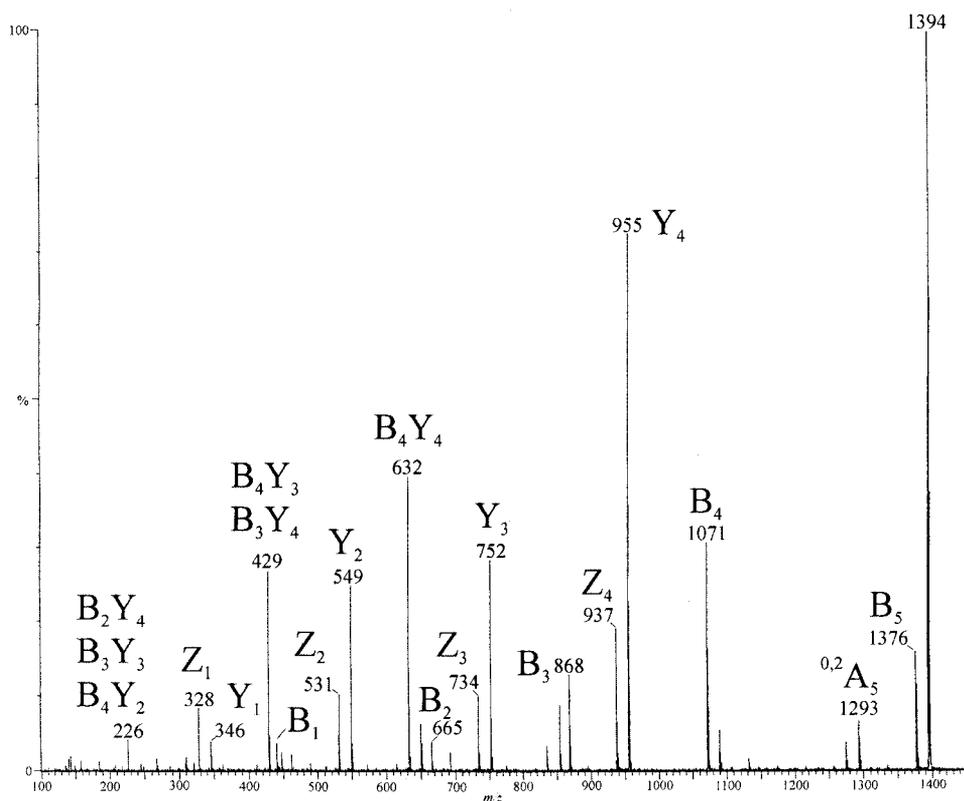


**Figura 5.11.** Espectro de FAB de la fracción F20 realizado con glicerol:alcohol nitrobencílico. En el recuadro se muestra la región pseudomolecular del espectro de FAB realizado con tioglicerol (con NaI).

El ion pseudomolecular  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1394 se asigna al factor de nodulación  $V(C_{18:1}, NMe, S)$ . Se asignan, además, la serie de iones oxonios  $[B_n+Na]^+$  a  $m/z$  462, 665, 868 y 1071, junto con la pérdida del grupo sulfato a  $m/z$  1292. En el recuadro se representa la región pseudomolecular del espectro de FAB empleando como matriz

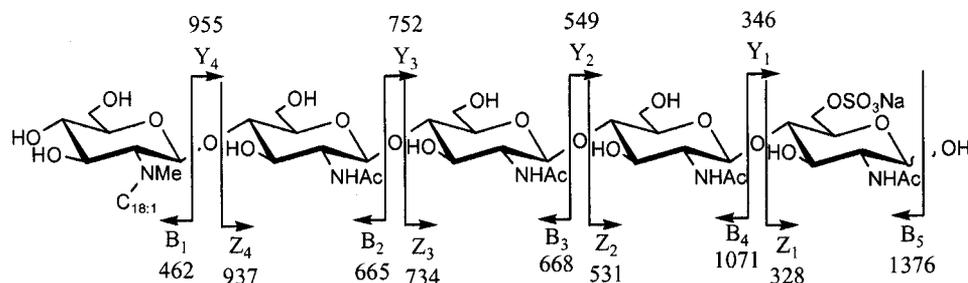
tioglicerol (con NaI); el ion-aducto con tioglicerol  $[M-H+2Na+Tiog]^+$  a  $m/z$  1502 confirma la presencia de un ácido graso insaturado en la estructura.<sup>92,93</sup>

El espectro de CID-MSMS del ion a  $m/z$  1394 presente en la fracción F42 del cultivo en medio ácido se muestra en la Figura 5.12.



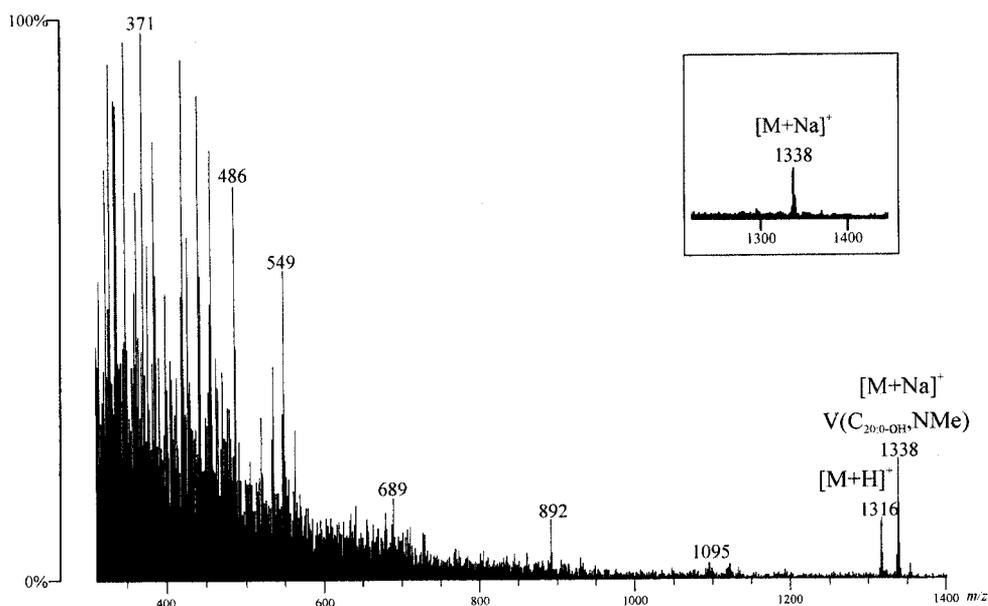
**Figura 5.12.** Espectro de masas CID ES Q-o-TOF del ion a  $m/z$  1394

La serie de iones  $[B_n+Na]^+$  e  $[Y_n+Na]^+$  están constituidos por los iones a  $m/z$  462, 665, 868 y 1071 y a  $m/z$  346, 549, 752 y 955, respectivamente. Además, también se identifican la serie de iones-fragmento tipo  $[Z_n+Na]^+$  a  $m/z$  328, 531, 734 y 937 y otros iones procedentes de dobles roturas dentro de la molécula a  $m/z$  226, 429 y 632. El ion a  $m/z$  1293 se asigna al ion-fragmento  $^{0,2}A_5$  procedente de rotura de anillo. El esquema de fragmentación se representa en la siguiente figura:



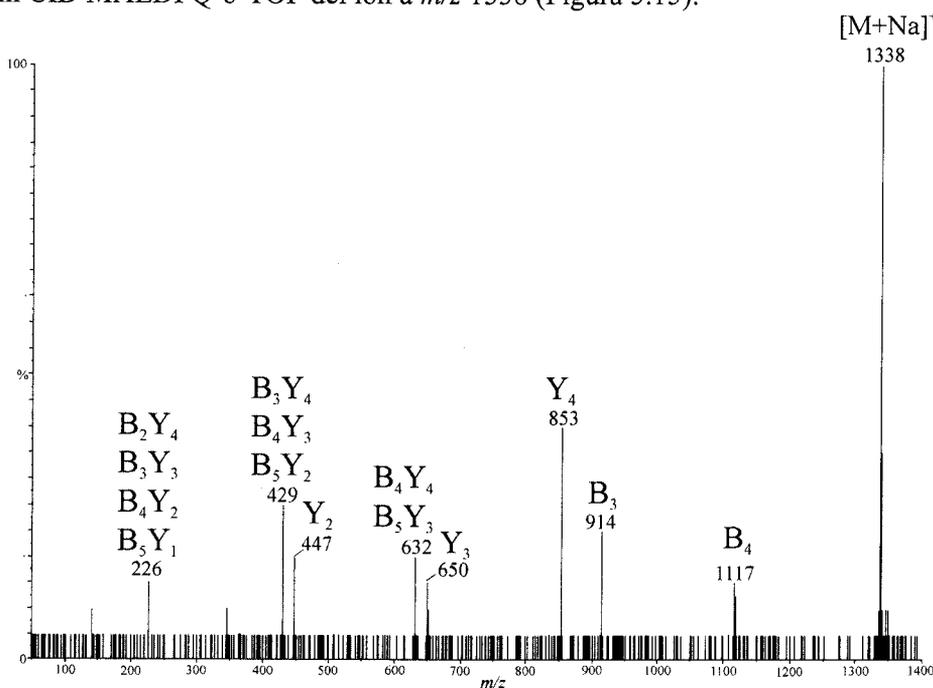
**Figura 5.13.** Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF de  $[M-H+2Na]^+$  a  $m/z$  1394.

El espectro de FAB de la fracción F47 de *R. tropici* a pH ácido realizado usando como matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1) se muestra en la Figura 5.14. Presenta como pico más intenso en la zona de 1000-2000 el ion a  $m/z$  1338, que se asigna al ion pseudomolecular  $[M+Na]^+$ , y otro a  $m/z$  1316 que se asigna a  $[M+H]^+$ . Pueden corresponder con el factor de nodulación V ( $C_{20:0-OH}$ , NMe). En el recuadro se presenta la región pseudomolecular del espectro de FAB realizado con tioglicerol (con NaI).



**Figura 5.14.** Espectro de FAB de la fracción F47 realizado con glicerol:alcohol nitrobencílico (1:1). En el recuadro se muestra la región pseudomolecular del espectro de FAB realizado con tioglicerol (con NaI).

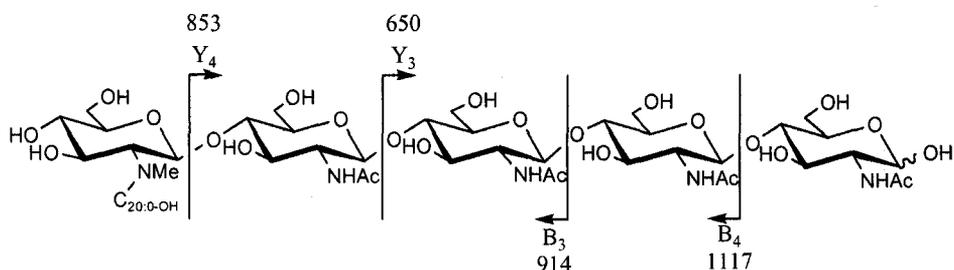
La serie de iones oxonio más Na procedente del ion pseudomolecular aparece a  $m/z$  1095, 892, 689 y 486. Cuando el espectro de FAB de esta fracción se realiza utilizando tioglicerol como matriz y NaI como aditivo no se observa el ion-aducto con tioglicerol. Por tanto, este factor de nodulación lleva en el terminal no reductor un ácido graso saturado. Para confirmar la asignación realizada se realiza, el espectro de masas tándem CID MALDI Q-o-TOF del ion a  $m/z$  1338 (Figura 5.15).



**Figura 5.15** Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF de  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1338.

Se obtienen la serie de iones-fragmento  $[B_n+Na]^+$  a  $m/z$  914 y 1117; y la serie  $[Y_n+Na]^+$  a  $m/z$  650 y 853. Además, también se asignan la serie de iones-fragmento  $B_nY_n$ : a  $m/z$  226 ( $B_2Y_4$ ,  $B_3Y_3$ ,  $B_4Y_2$  y/o  $B_5Y_1$ ), a  $m/z$  429 ( $B_4Y_3$ ,  $B_3Y_4$  y/o  $B_5Y_2$ ) y la señal a  $m/z$  632 ( $B_4Y_4$  y/o  $B_5Y_3$ )

Del espectro obtenido y del análisis de ácidos grasos realizado (apartado 5.7) se asigna el ion pseudomolecular a  $m/z$  1338 al factor de nodulación: V ( $C_{20:0-OH}$ , NMe). El esquema de fragmentación es el siguiente:



**Figura 5.16.** Espectro de masas CID MALDI Q-o-TOF de  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1338.

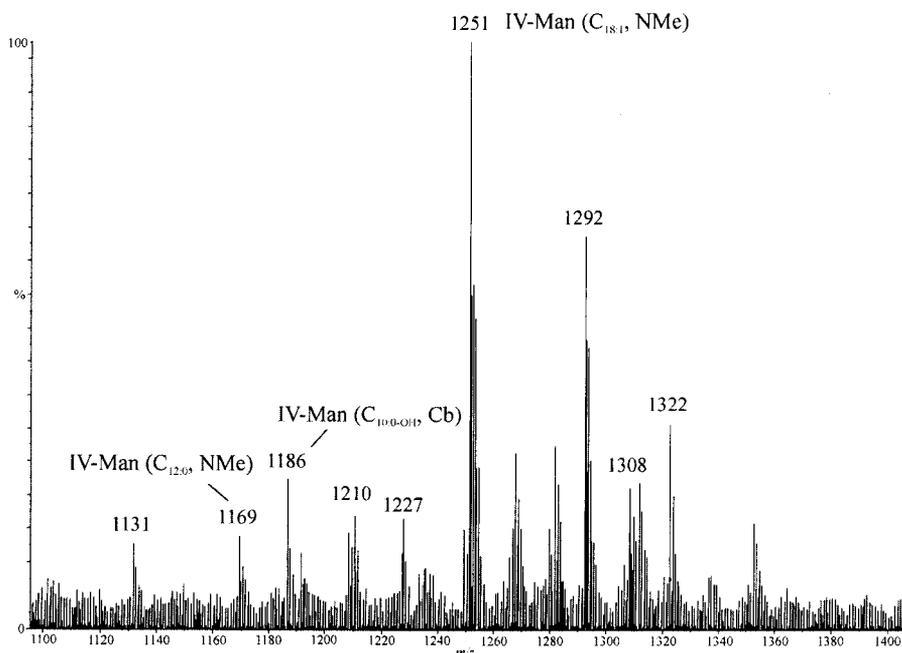
#### 4) Factores de nodulación con una unidad de manosa como terminal reductor.

Todas las estructuras aparecen en la misma fracción cromatográfica (F52) del cultivo de *R. tropici* CIAT899 crecido en condiciones neutras. No se detectan oligosacáridos de este tipo bajo estrés ácido.

Se asignan tres estructuras diferentes y, en general, todas están constituidas por tres unidades de GlcNAc, una unidad de *N*-acilglucosamina y una unidad de hexosa (manosa) como terminal reductor. El ácido graso puede ser variable. En la Figura 5.17 se muestra el espectro de masas MALDI Q-o-TOF de dicha fracción. Las señales a  $m/z$  1251, 1186 y 1169 se asignan a los iones pseudomoleculares  $[M+Na]^+$  de los factores de nodulación representados por IV-Man ( $C_{18:1}$ , NMe), IV-Man ( $C_{12:0}$ , NMe) y IV-Man ( $C_{10:0-OH}$ , Cb), respectivamente.

Cuando se selecciona y se fragmenta el ion a  $m/z$  1251, se obtiene su espectro CID MALDI Q-o-TOF (Figura 5.18). La serie  $[B_n + Na]^+$  encontrada es:  $m/z$  1071, 868, 665 y 462, que se corresponde con un factor de nodulación acilado por un ácido graso monoinsaturado de dieciocho carbonos y un grupo *N*-Me en el terminal no reductor. Por el contrario, la serie  $[Y_n + Na]^+$  es:  $m/z$  812, 609 y 406.

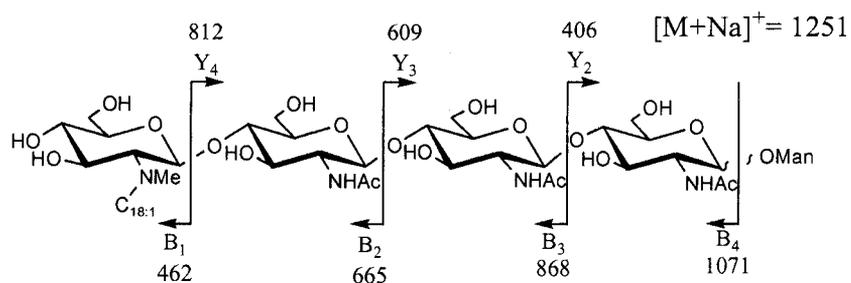
Estas estructuras se caracterizan por los valores  $m/z$  de los iones-fragmento  $B_4$  e  $Y_2$ . En concreto, la pérdida de 203 Th de cada ion-fragmento es indicativo de unidades de GlcNAc en el esqueleto del oligosacárido, mientras que una diferencia de 180 Th entre el ion-fragmento  $[B_4+Na]^+$  y el ion pseudomolecular  $[M+Na]^+$  indica la presencia de una unidad de hexosa como terminal reductor.



**Figura 5.17.** Espectro de masas MALDI Q-o-TOF de la fracción F52 de *R. tropici* CIAT899 en condiciones neutras

El análisis de los azúcares de esta fracción se realiza a través de la formación de los *O*-trimetilsililderivados de los metilglicósidos, tal y como se describe en el apartado 2.3.1.1. De esta manera se identifica la presencia de manosa además de la *N*-acetilglucosamina (Apartado 5.4).

El esquema de fragmentación de este factor de nodulación se muestra en la Figura 5.18. Se indican los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  asignados.



**Figura 5.18.** Esquema de fragmentación del factor de nodulación IV-Man ( $C_{18.1}$ , NMe)

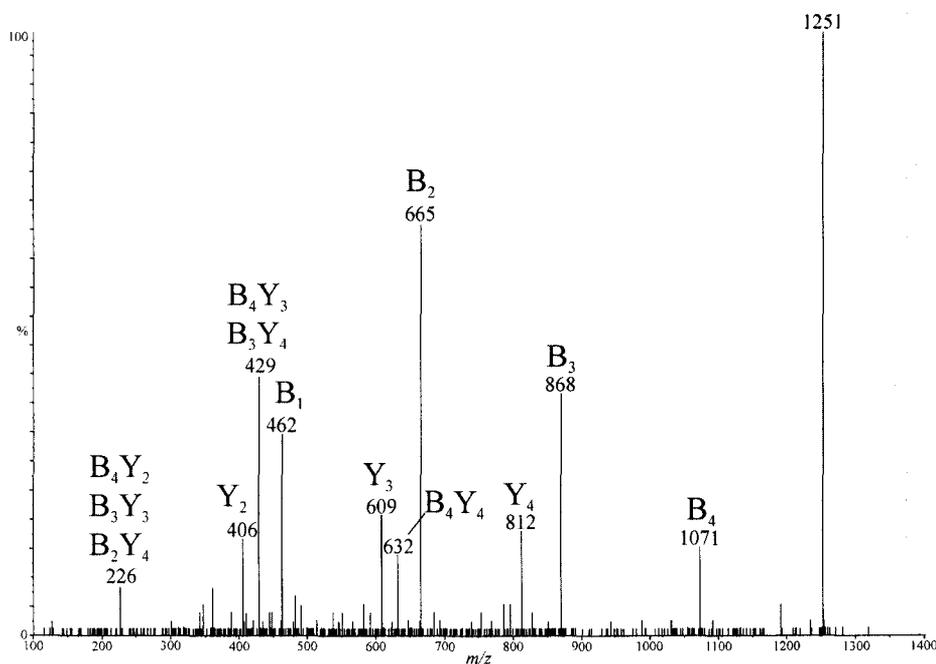


Figura 5.19. Espectro CID MALDI Q-o-TOF del ion pseudomolecular a  $m/z$  1251.

### 5) Factores de nodulación carbamoilados.

Es la primera vez que se hallan factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 que presentan como sustituyente un grupo carbamoilo. Constituyen el quinto tipo de LCOs encontrados en este estudio y únicamente se detectan en condiciones neutras. Su detección necesita el uso de técnicas muy sensibles, en este caso mediante ES y MALDI. En el espectro de masas MALDI Q-o-TOF de la fracción F30 del cultivo crecido a pH neutro (Figura 5.20) se identifica el ion a  $m/z$  1241 como el factor de nodulación V ( $C_{10:0-OH}$ , NMe, Cb).

En todos los casos, el grupo carbamoilo se localiza en el terminal no reductor del oligosacárido. El espectro CID MALDI Q-o-TOF del ion pseudomolecular a  $m/z$  1241 presente en la fracción F30 del cultivo a pH 7,0 se muestra en la Figura 5.21.

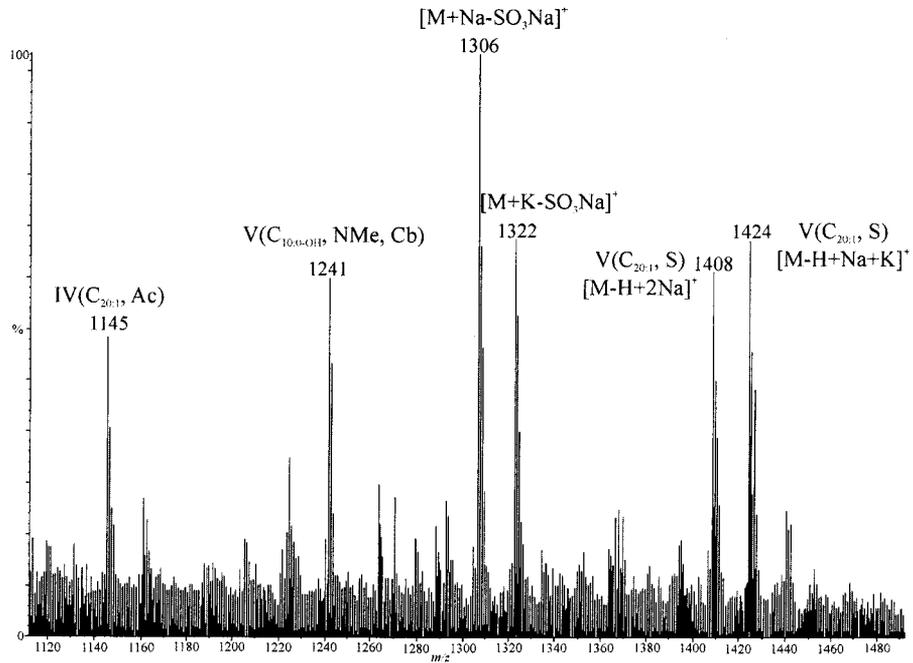


Figura 5.20. Espectro MALDI Q-o-TOF de la fracción F30 de *R. tropici* CIAT899 a pH 7,0.

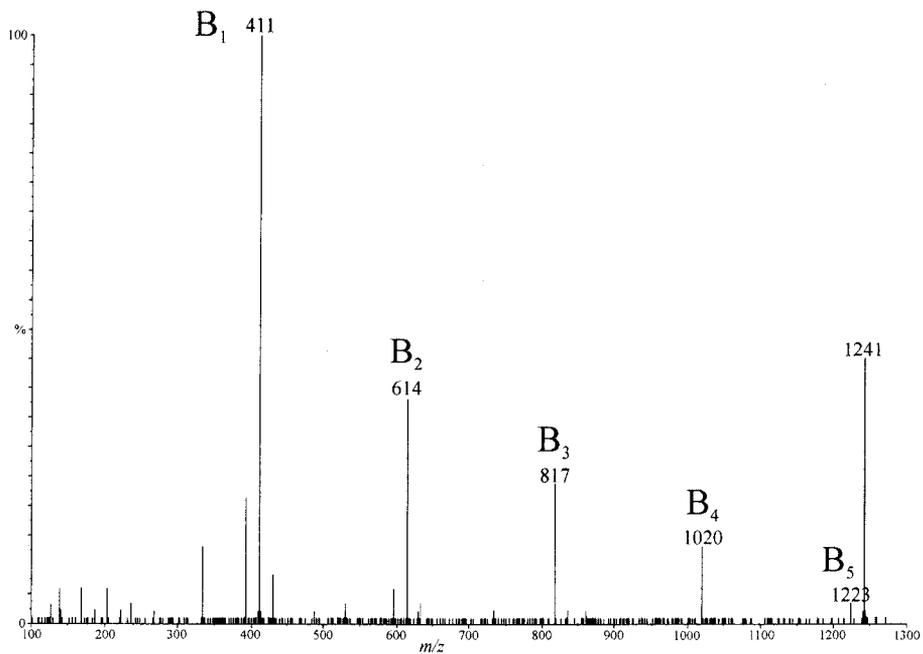
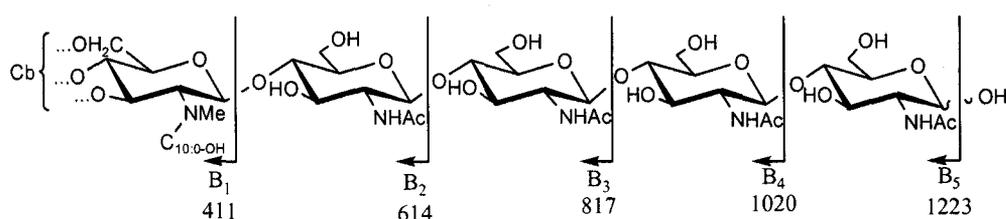


Figura 5.21. Espectro de masas tándem CID del ion a  $m/z$  1241.

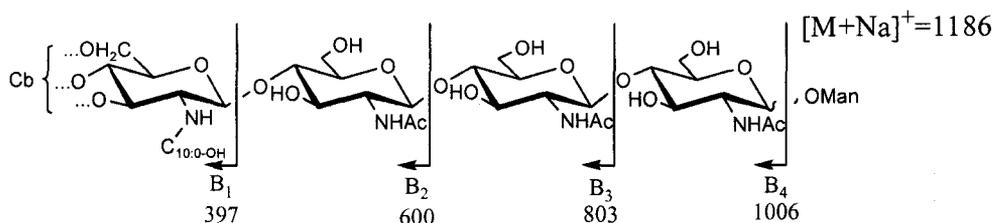
Los iones oxonios  $[B_n+Na]^+$  son:  $m/z$  411, 614, 817 y 1020. El valor impar del ion  $B_1$  indica la presencia de un sustituyente nitrogenado en el terminal no reductor. Con estos datos se propone que la estructura de este oligosacárido está constituida por cuatro unidades de *N*-acetilglucosamina y una unidad de *N*-acilglucosamina. Sustituido en el terminal no reductor por un ácido graso  $C_{10:0-OH}$ , un grupo *N*-metilo y un grupo carbamilo. El esquema de fragmentación se muestra en la Figura 5.22.



**Figura 5.22.** Esquema de fragmentación del factor de nodulación V ( $C_{10:0-OH}$ , NMe, Cb)

Todos factores de nodulación carbamoylados analizados se encuentran acilados por el ácido graso  $C_{10:0-OH}$  pudiendo estar sustituidos, o no, por un grupo *N*-Me en el terminal no reductor o bien una unidad de manosa en *O*-1 del terminal reductor. Un ejemplo de este último caso es el factor de nodulación que tiene como ion pseudomolecular a  $m/z$  1186 presente en la fracción F52 pH 7 (Figura 5.17). El espectro tándem CID de este ion se muestra en la Figura 5.24.

La serie de iones-fragmento  $[B_n+Na]^+$  es:  $m/z$  397, 600, 803 y 1006. La diferencia de 180 Th entre el ion-fragmento  $B_4$  y el ion pseudomolecular  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  1186, indican la presencia de una unidad de hexosa (manosa) que forma el terminal reductor. El valor impar del ion  $B_1$  indica la presencia de un sustituyente nitrogenado en el terminal no reductor. Por tanto, para este factor de nodulación se propone la estructura: IV-Man ( $C_{10:0-OH}$ , Cb). El esquema de fragmentación de este factor de nodulación se muestra en la Figura 5.23. Se indican los iones-fragmento  $B_n$  e  $Y_n$  asignados.



**Figura 5.23.** Esquema de fragmentación del factor de nodulación IV-Man ( $C_{10:0-OH}$ , NMe, Cb)

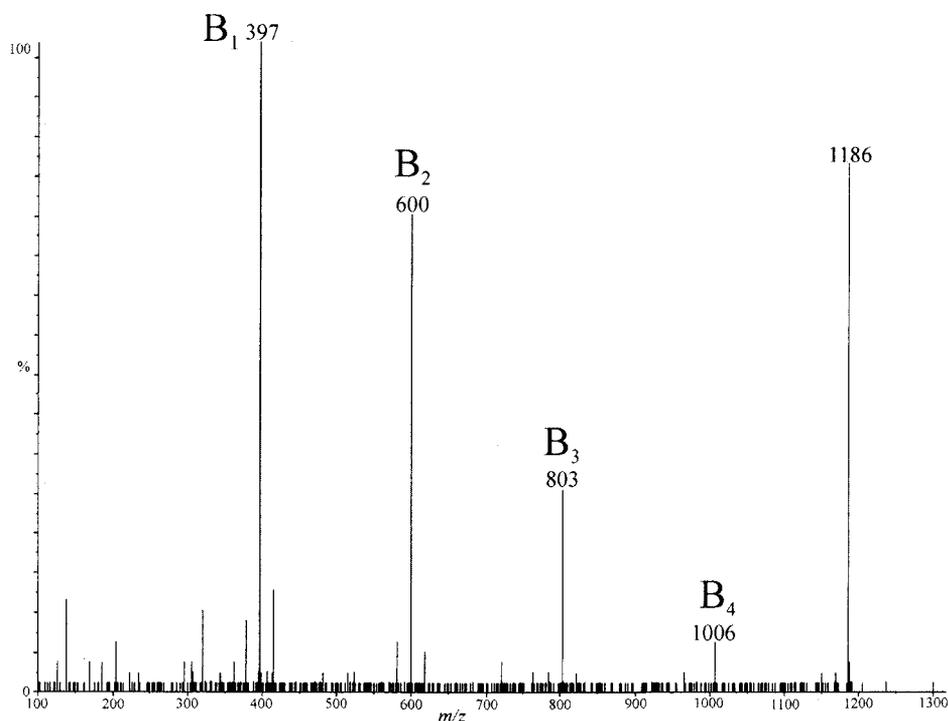


Figura 5.24. Espectro de masas tándem CID del ion a  $m/z$  1186.

#### 6) Factor de nodulación disulfatado.

Es el primer factor de nodulación aislado que lleva en su esqueleto dos grupos sulfatos. Se encuentra en la fracción F40 de *R. tropici* CIAT899 crecido en condiciones ácidas. En el espectro de masas de electrospray se puede observar el ion pseudomolecular  $[M-3H+2Na]^+$  a  $m/z$  1496. También se identifica como componente minoritario en el espectro de FAB realizado empleado como matriz glicerol:alcohol *m*-nitrobencílico (1:1) (Figura 5.25).

Para confirmar la asignación realizada, se lleva a cabo un experimento de masas tándem. El espectro de CID-MSMS (Figura 5.26) se obtiene por colisión del ion pseudomolecular a  $m/z$  1496. Se identifican los iones-fragmento correspondientes a las roturas de los iones glicosídicos, (de tipo  $B_n$  e  $Y_n$ ) y los iones procedentes de doble rotura (tipo  $B_n Y_n$ ).

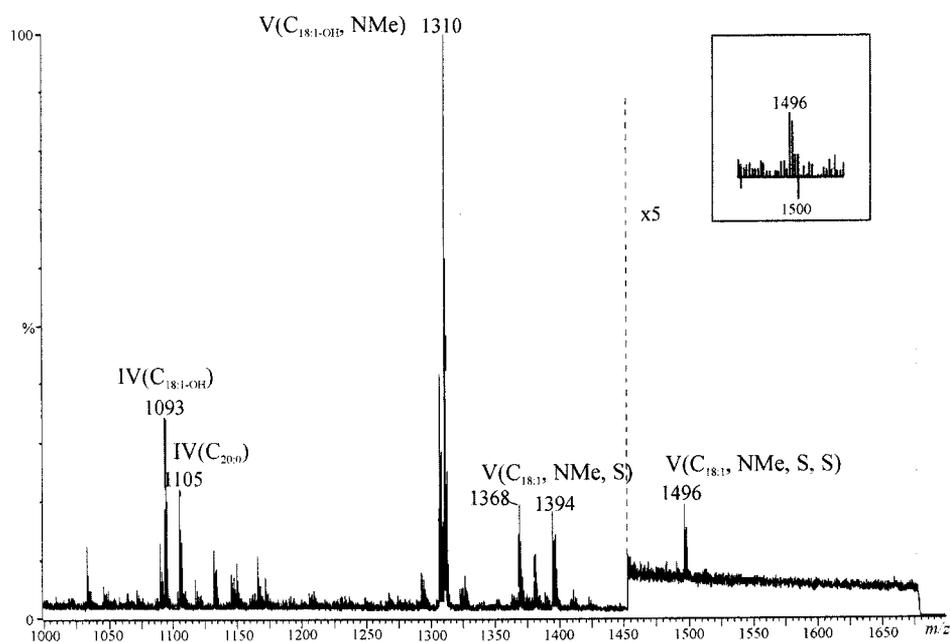


Figura 5.25. Espectro MALDI Q-o-TOF de la fracción F40 de *R. tropici* CIAT899 a pH 4,6. Recuadro: zona pseudomolecular del espectro de FAB de la misma fracción.

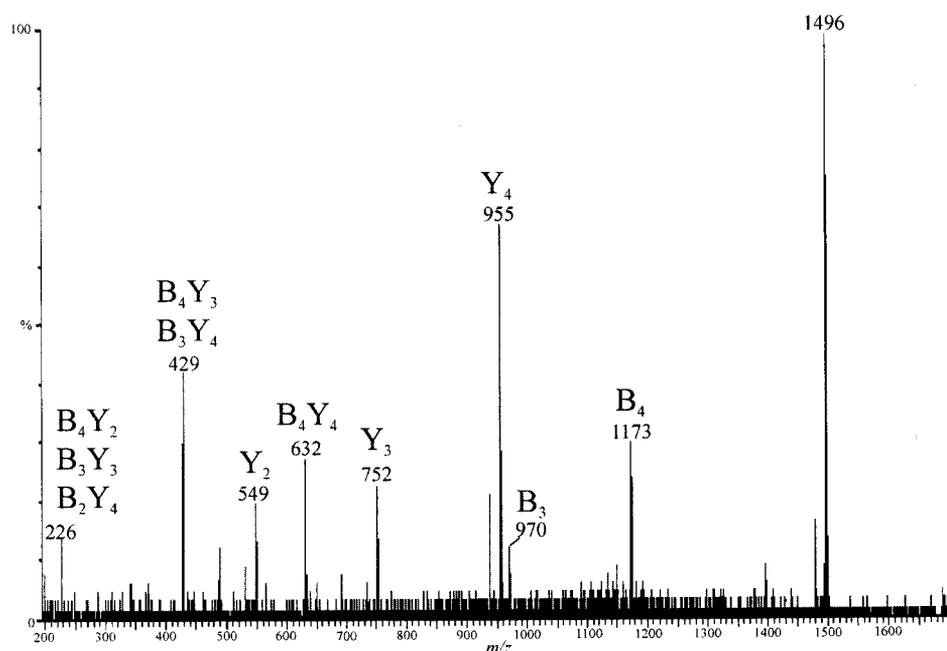
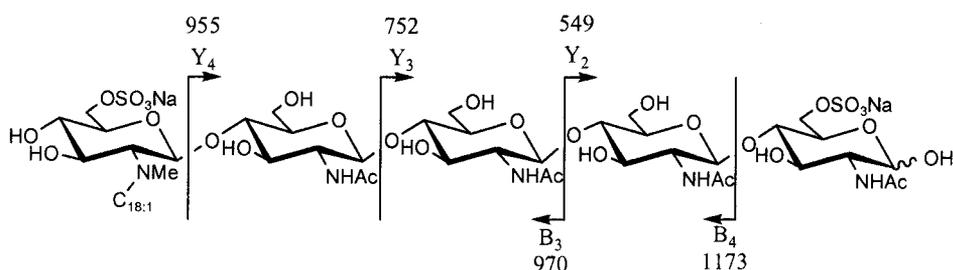


Figura 5.26. Espectro CID MALDI Q-o-TOF del ion a  $m/z$  1496

Se identifican dos de los iones oxonios  $[B_n+Na]^+$  a  $m/z$  1173 y 970, y casi completa la serie  $[Y_n+Na]^+$  a  $m/z$  955, 753 y 549. Además, también se asignan la serie de iones-fragmento  $B_nY_n$ : a  $m/z$  226 ( $B_2Y_4$ ,  $B_3Y_3$  y/o  $B_4Y_2$ ), a  $m/z$  429 ( $B_4Y_3$  y/o  $B_3Y_4$ ) y la señal a  $m/z$  632 ( $B_4Y_4$ ).

Los valores de los iones oxonios encontrados y los iones  $B_nY_n$  indican que se trata de un factor de nodulación sulfatado en el terminal reductor (valores de  $Y_n$ ), y en el terminal no reductor. Se propone la siguiente estructura para este factor de nodulación:



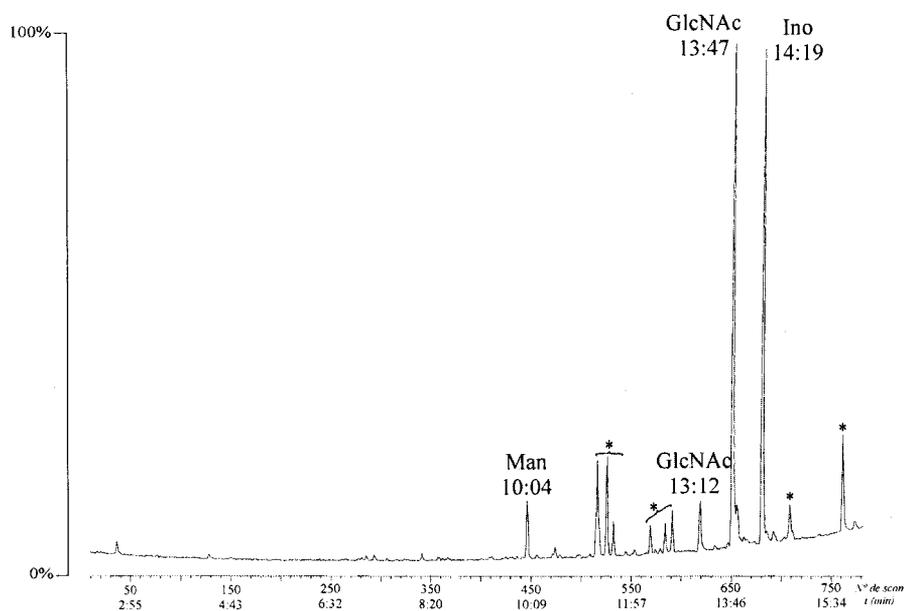
**Figura 5.27.** Esquema de fragmentación del factor de nodulación V ( $C_{18:1}$ , NMe, S, S)

#### 5.1.4. Análisis de azúcares.

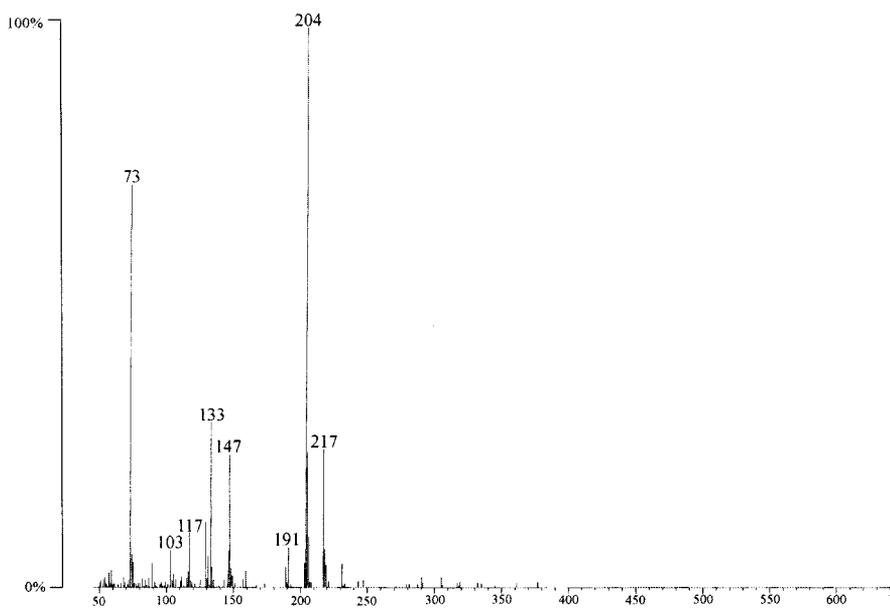
El análisis de los azúcares de los factores de nodulación producidos por *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio neutro y medio ácido se realiza a través de la formación de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, tal y como se describe en el apartado 2.3.1.1. Los derivados se analizan por CGL-EM según la instrumentación y condiciones cromatográficas descritas en el apartado 2.3.1.3.

El análisis mediante CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos que se obtienen para las diferentes fracciones aisladas permite identificar en todos los casos la presencia de *N*-acetilglucosamina como único azúcar presente, salvo para la fracción de HPLC a  $t_R$  52 min (F52) del cultivo a pH 7,0, en la que también se identifica manosa ( $t_R = 10:04$  min). Estos datos confirman los resultados descrito en el apartado anterior.

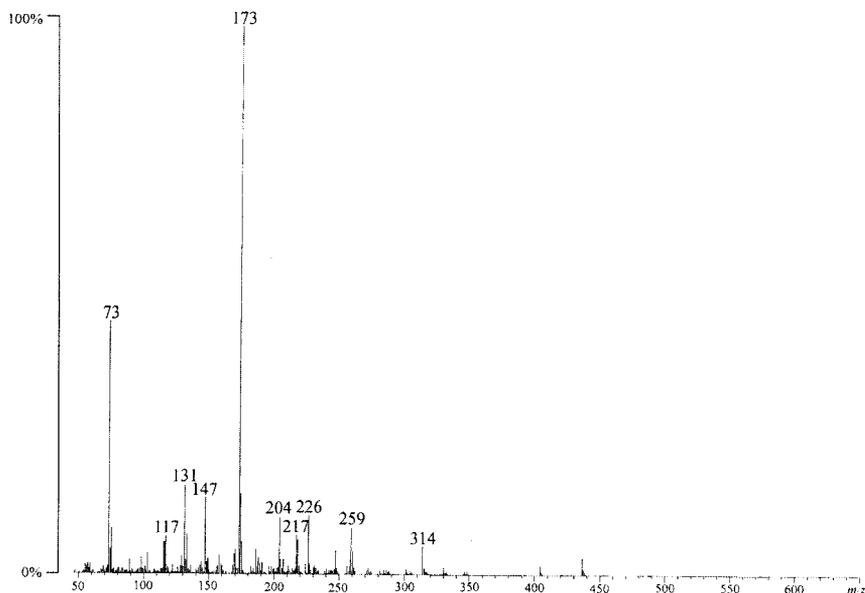
El cromatograma y los espectros de masas que se obtienen para la fracción F52 del cultivo en medio neutro se muestran en las Figuras 5.28, 5.29 y 5.30.



**Figura 5.28.** CGL-EM de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos procedentes de la fracción de HPLC con  $t_R = 52$  min de *R. tropici* pH 7,0.



**Figura 5.29.** Espectro de masas del pico a  $t_R = 10:04$  min correspondiente al *O*-trimetilsililderivado del metil glicósido de la manosa.



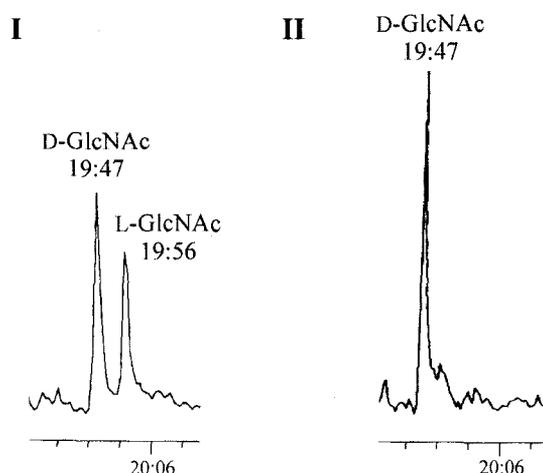
**Figura 5.30.** Espectro de masas del pico a  $t_R = 13:47$  min correspondiente al *O*-trimetilsililderivado del metil glicósido de la *N*-acetilglucosamina.

### 5.1.5. Determinación de la configuración absoluta.

La determinación de la configuración absoluta de la *N*-acetilglucosamina presente en los factores de nodulación procedentes de *R. tropici* CIAT899 en condiciones neutras y ácidas, se realiza a través de la formación del (+)-2-butil 2,3,4,6-tetra-*O*-trimetilsililglicósido, tal y como se describe en apartado 2.3.2.1. Los cromatogramas correspondientes a la formación de los trimetilsililderivados de los ( $\pm$ )-2-butil glicósidos (**I**) y (+)-2-butil glicósidos (**II**) de la fracción F20 del cultivo en medio ácido se muestran en la Figura 5.31.

La comparación de los tiempos de retención de los derivados obtenidos procedentes de *N*-acetil-D-glucosamina patrón indica que este monosacárido pertenece a la serie D.

Por último, dada la escasa cantidad obtenida para la fracción F52 a pH 7,0 no es posible determinar la configuración absoluta de la manosa presente en dicha fracción.



**Figura 5.33.** Cromatogramas de CGL-EM de los 2-butil 2 N-acetamido-2-desoxi-3,4,5-tri-*O*-trimetilsililglucósidos de la fracción F20 de *R. tropici* CIAT899 pH 4,6, obtenidos al tratar la muestra con ( $\pm$ )-butan-2-ol (I) y (+)-butan-2-ol (II).

### 5.1.6. Análisis por metilación

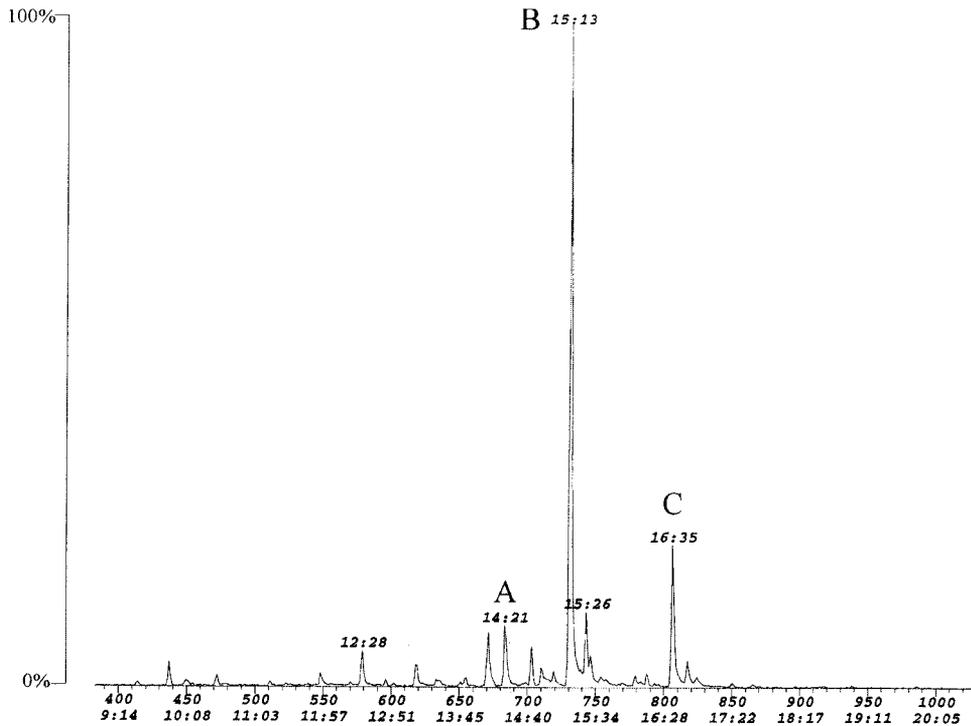
La fracción mayoritaria (F20;  $t_R = 20$  min) aislada por HPLC del cultivo de *Rhizobium tropici* CIAT899 crecido en condiciones ácidas se somete al análisis por metilación de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.3.3.1. El factor de nodulación mayoritario presente en dicha fracción es el V (C18:1, NMe, S).

El cromatograma registrado por CGL-EM para dicha fracción se muestra en la Figura 5.32. Los espectros de masas de los picos que aparecen en el cromatograma (A, B y C), se detallan en las Figuras 5.33, 5.34 y 5.35.

Se identifican los siguientes acetatos de alditoles parcialmente metilados:

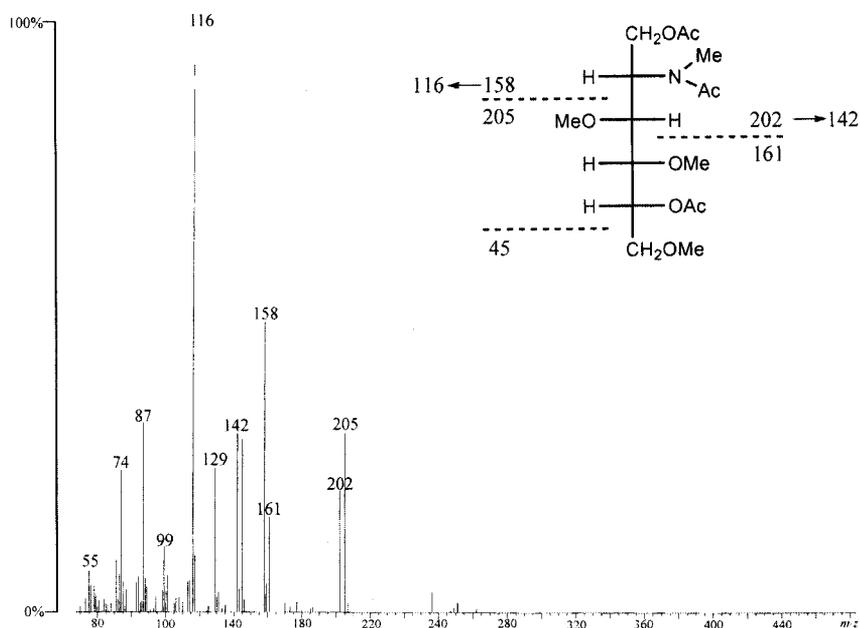
- 1,5-di-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente del terminal no reductor del oligosacárido (Pico A).
- 1,4,5-tri-*O*-acetil-3,6-di-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente de los residuos internos de *N*-acetilglucosamina del oligosacárido (Pico B).

- 1,4,5,6-tetra-*O*-acetil-3-*O*-metil-*N*-acetil-*N*-metilglucosaminitol, procedente del terminal reductor del oligosacárido y sustituido en *O*-6 por un sustituyente resistente al medio básico pero sensible al medio ácido usado en la etapa de hidrólisis (Pico C).

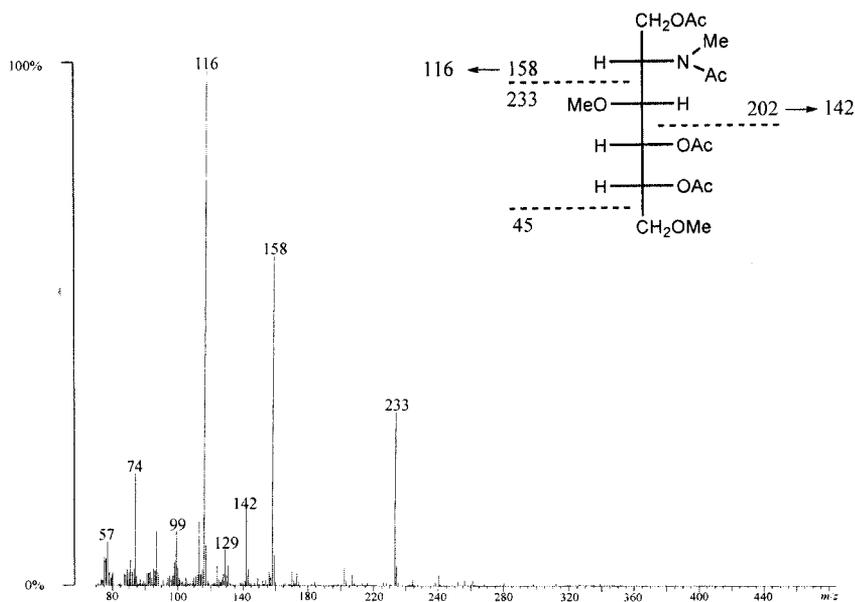


**Figura 5.32.** Cromatograma de CGL-EM de los acetatos de alditoles parcialmente metilados de la fracción F20 de *R. tropici* CIAT899 pH 4,6.

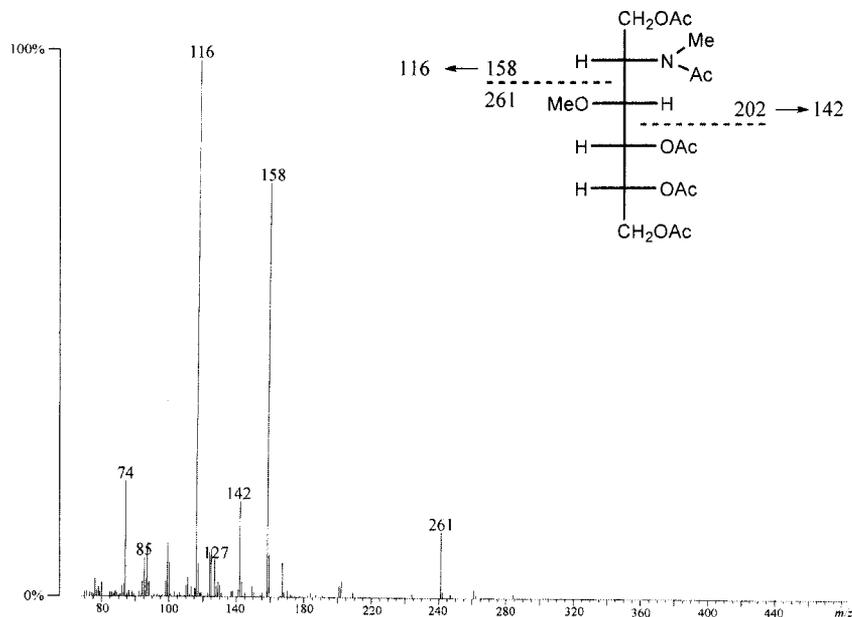
El oligosacárido presente en la fracción F20, identificado como V ( $C_{18:1}$ , NMe, S), presenta un residuo de glucosamina terminal no sustituida (Figura 5.38), glucosamina sustituida en la posición 4 (Figura 5.39) y, por último, un residuo de glucosamina sustituida en las posiciones 4 y 6 (Figura 5.40). Estos datos confirman que el grupo sulfato se encuentra localizado en el *O*-6 del terminal reductor del oligosacárido.



**Figura 5.33.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,5-di-O-acetil-2-desoxi-2-(N-metilacetamido)-3,4,6-tri-O-metilglucitol procedente del análisis por metilación de la fracción F20 (pico A).



**Figura 5.34.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,4,5-tri-O-acetil-2-desoxi-2-(N-metilacetamido)-3,6-di-O-metilglucitol procedente del análisis por metilación de la fracción F20 (pico B).



**Figura 5.35.** Espectro de masas y esquema de fragmentación del 1,4,5,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-(*N*-metilacetamido)-3-*O*-metilglucitol procedente del análisis por metilación de la fracción F20 (pico C).

### 5.1.7. Análisis e identificación de los ácidos grasos.

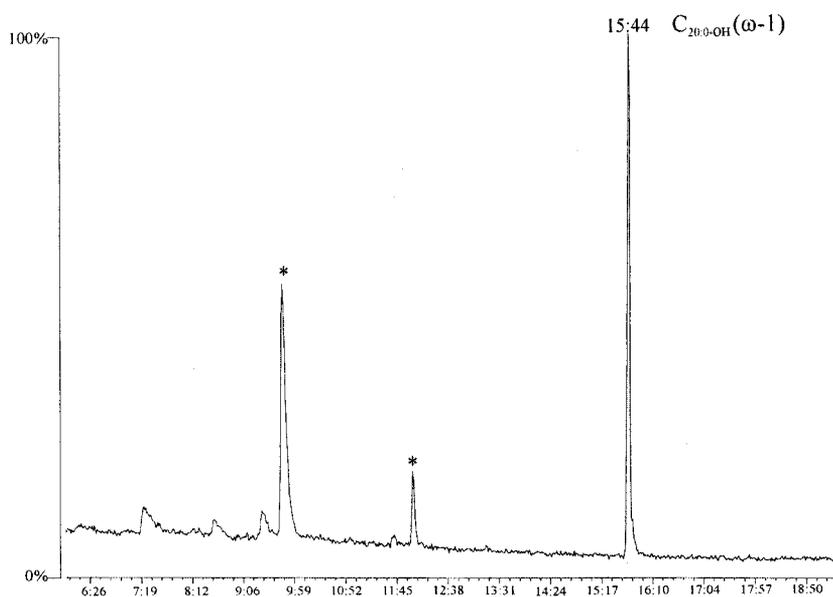
Se realiza el estudio de los ácidos grasos presentes en los factores de nodulación para confirmar la asignación propuesta por los experimentos de Espectrometría de Masas. No es posible realizar este análisis sobre todas las fracciones aisladas dada la escasa cantidad disponible. Se analizan los ácidos grasos de aquellos factores de nodulación mayoritarios producidos por *R. tropici* CIAT899 a pH 4,6.

El estudio de los ácidos grasos se efectúa por CGL-EM, según lo descrito en el apartado 2.3.4.1. Se identifican los ésteres metílicos de los ácidos grasos saturados e insaturados, así como los trimetilsililderivados de los ésteres metílicos de los ácidos grasos hidroxilados.

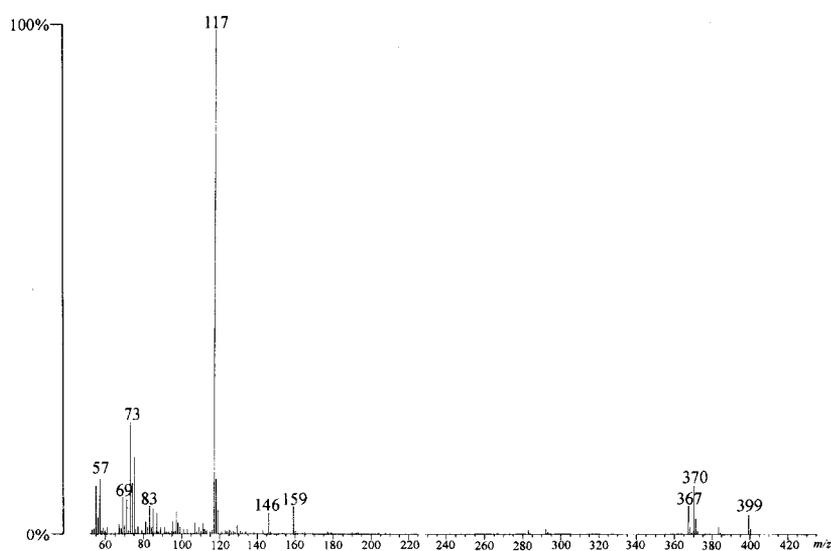
#### 1) Ácidos grasos hidroxilados.

Una fracción de ácidos grasos esterificados de la fracción F47 de *R. tropici* a pH 4,6 se aíslan según el apartado 2.3.4.1 y posteriormente se obtienen los

*O*-trimetilsililderivados, tal como se indica en el apartado 2.3.1.1. El cromatograma y el espectro de masas obtenido se muestran en las Figuras 5.36 y 5.37.

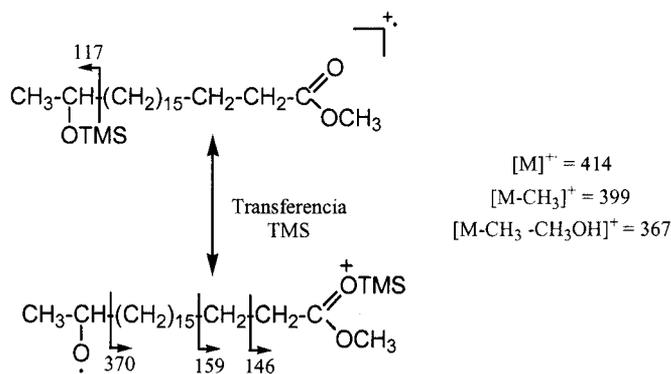


**Figura 5.36.** Cromatograma CGL-EM de los ácidos grasos sililados de la fracción F47 a pH ácido. Las señales marcadas con \* no corresponden a ácidos grasos.



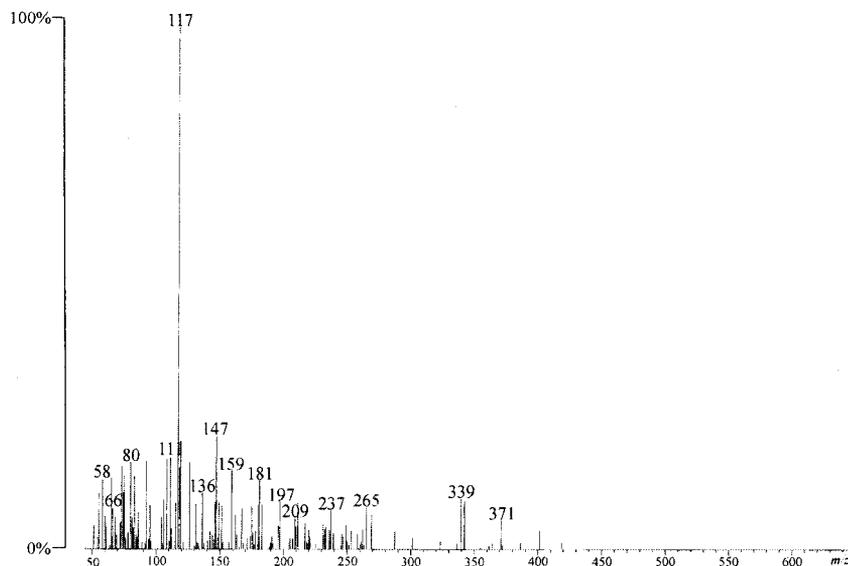
**Figura 5.37.** Espectro de masas del *O*-trimetilsilil derivado del éster metílico del ácido ( $\omega-1$ ) hidroxieicosanoico.

La fragmentación del *O*-trimetilsilil derivado del metil éster del ácido hidroieicosanoico permite localizar el grupo OH en el carbono 19 (posición  $\omega$ -1). El esquema de fragmentación se representa en la Figura 5.38. El ion a  $m/z$  117 se debe a un rotura en  $\alpha$  al grupo *O*-trimetilsililo. Se observa también la pérdida de acetaldehído (44 uma) del ion molecular a  $m/z$  370. Este ion se forma a través de un transferencia intramolecular del grupo trimetilsililo al carboxilo terminal seguido por una rotura en  $\alpha$  al radical formado. Otra pérdidas como metilo ( $m/z$  399) y metilo más metanol ( $m/z$  367) también están indicadas.



**Figura 5.38.** Esquema de fragmentación del trimetilsilil derivado del éster metílico del ácido ( $\omega$ -1) hidroieicosanoico.

El análisis de ácidos grasos de la fracción F40 del cultivo a pH ácido revela la presencia del *O*-trimetilsilil derivado del metil éster del ácido  $\text{C}_{18:0}$  ( $\omega$ -1). Al igual que ejemplo anterior, el espectro de masas presenta como pico base el ion a  $m/z$  117. La pérdida de acetaldehído a  $m/z$  342, de metilo a  $m/z$  371 y metilo más metanol a  $m/z$  339. El espectro de masas se muestra en la Figura 5.39.

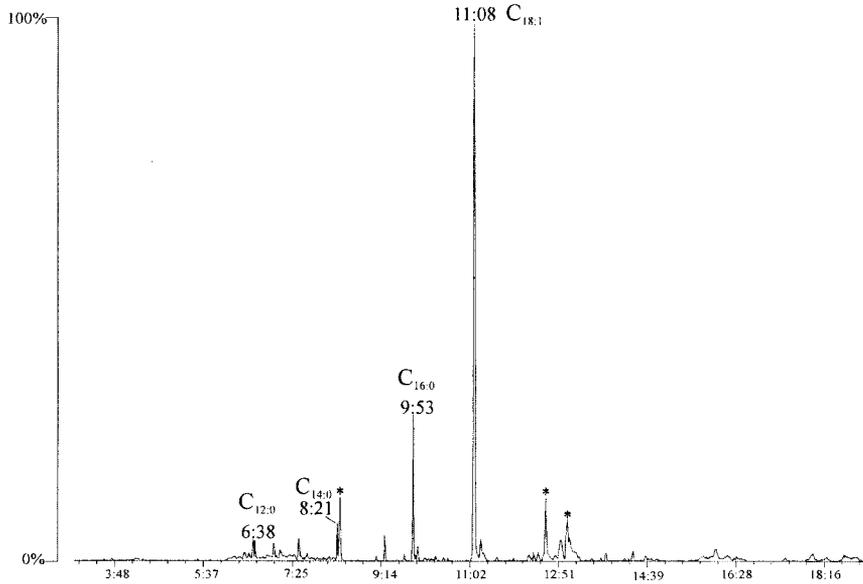


**Figura 5.41.** Espectro de masas del *O*-trimetilsilil derivado del éster metílico del ácido ( $\omega$ -1) hidroxioctadecanoico.

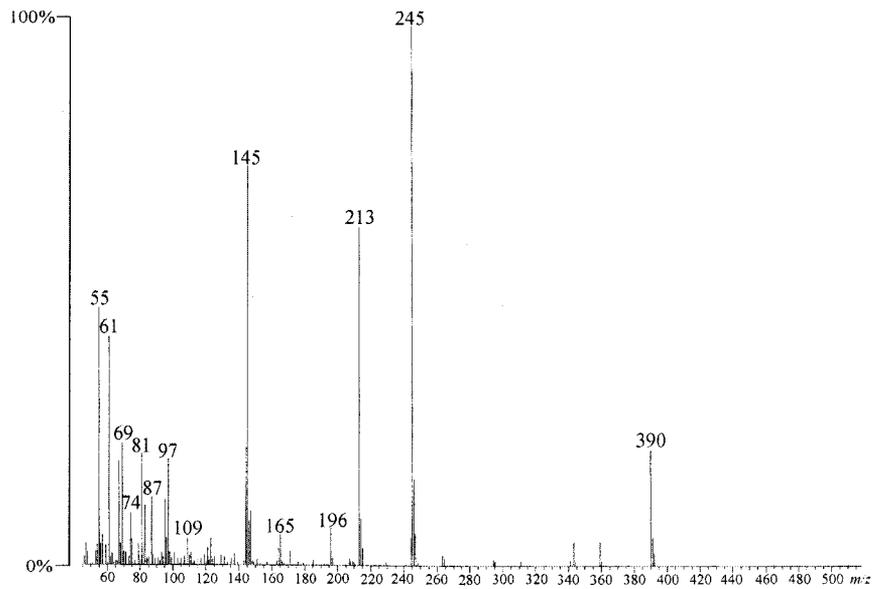
## 2) Ácidos grasos saturados e insaturados.

En el cromatograma de ésteres metílicos de la fracción F20 de *R. tropici* CIAT 899 pH ácido (Figura 5.42) se observa la presencia mayoritaria de un pico a  $t_R = 11:08$  min identificado por su espectro de masas como el éster metílico del ácido octadecenoico ( $C_{18:1}$ ) y en menor proporción otros picos que se corresponden con los ésteres metílicos de ácido dodecanoico ( $C_{12:0}$ ) ( $t_R = 6:38$  min), ácido tetradecanoico ( $C_{14:0}$ ) ( $t_R = 8:21$  min) y ácido hexadecanoico o ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ) ( $t_R = 9:53$  min).

La localización del doble enlace del ácido octadecenoico se realiza a través del bis(metiltio)derivado de su éster metílico. La Figura 5.43 muestra espectro de masas obtenido, donde se observa el desplazamiento del pico a  $t_R = 11:08$  min hasta  $15:34$  min. Los iones de  $m/z$  390 (ion molecular), 145 y 245 (procedentes de la rotura del enlace entre los carbonos 11 y 12, y que prueba la localización del doble enlace sobre el carbono 11). El ion de  $m/z$  213 procede de la pérdida de metanol del fragmento  $m/z$  245. Así este ácido graso se identifica como ácido octadec-11-enoico o ácido vacénico ( $C_{18:1\Delta 11}$ ).



**Figura 5.42.** Cromatograma de los ésteres metílicos de la fracción F20 de *R. tropici* CIAT899 pH ácido.



**Figura 5.43.** Espectro de masas del bis(metilto) derivado del ácido vacénico.

### 5.1.8. Efecto de la acidez en los factores de nodulación. Conclusiones.

Se han producido modificaciones estructurales significativas y ha aumentado el número de los factores de nodulación producidos por *Rhizobium tropici* CIAT899 cultivado en medio ácido con respecto a los producidos por esta bacteria en medio neutro. Se han identificado 59 factores de nodulación a pH 4,6 y 29 a pH 7,0, siendo 16 de estos oligosacáridos comunes en ambos medios. Todos los oligosacáridos aislados contienen de cuatro a cinco unidades de glucosamina.

Los factores de nodulación presentes en ambos cultivos son de tres tipos: sin sustituyentes, con un grupo sulfato en el terminal reductor o con un grupo NMe en el no reductor (que además puede estar sulfatado). El 24% de los LCOs a pH 7,0 se encuentra sulfatado, mientras que a pH 4,6 este porcentaje aumenta hasta un 32%. Se ha identificado además, un nuevo factor de nodulación con dos grupos sulfatos, que se detecta únicamente en condiciones ácidas. Además, el 58% de los factores de nodulación producidos en medio ácido y el 62% de los producidos en medio neutro, se encuentran sustituidos por un grupo *N*-Me, hecho que parece ser indispensable para que la bacteria nodule *Phaseolus vulgaris*.<sup>25</sup> Por último, se han identificado dos nuevos tipos de factores de nodulación producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio neutro. Son oligosacáridos sustituidos con un grupo carbamoilo en el terminal no reductor y/o con una manosa como terminal reductor. No se detectan factores de nodulación parecidos en medio ácido.

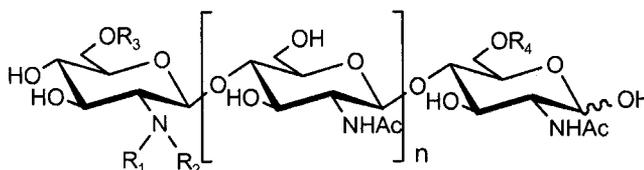
La naturaleza de los ácidos grasos presentes en los factores de nodulación producidos en ambos medios es muy diversa. Se han detectado ácidos grasos saturados, insaturados e hidroxilados. La cadena del ácido graso puede variar de 10 a 22 átomos de carbono. La presencia de los ácidos grasos hidroxilados aumenta en medio ácido (desde un 20% hasta un 24%) con respecto al medio neutro. Los factores de nodulación que llevan un grupo carbamoilo sólo aparecen acompañados por el ácido graso C<sub>10:0-OH</sub>.

Todas las modificaciones de los factores de nodulación producidos a pH ácido, incluyendo las producidas en el terminal reductor y no reductor, así como la cadena de ácido graso y el grado de oligomerización del oligosacárido pueden contribuir a la estabilidad de la molécula-señal frente a la degradación y reflejan además, la adaptación de la bacteria al medio ácido.

## 6. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. Se ha estudiado la estructura de los factores de nodulación de *Rhizobium giardinii* bv. giardinii H152. Se han utilizado las siguientes técnicas de determinación estructural: CGL-EM, FAB, ES Q-o-TOF, CID ES Q-o-TOF y  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -RMN (experimentos DBF-COSY, 1D-TOCSY, HSQC-ed, HMBC, 1D-NOESY). Además, se ha efectuado el análisis de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, análisis por metilación, determinación de la configuración absoluta por formación de los *O*-trimetilsililderivados de los (+) y ( $\pm$ )-2-butil glicósidos. Se han identificado los siguientes oligosacáridos:



Fracciones	$[M+\text{Na}]^+$ ( <i>m/z</i> )	$[M-\text{H}+2\text{Na}]^+$ ( <i>m/z</i> )	n	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Estructura
F <sub>1</sub>		1453	3	C <sub>20:0</sub>	H	CONH <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> Na	V(C <sub>20:0</sub> ,Cb,S)
F <sub>2</sub>		1411	3	C <sub>16:0</sub>	Me	CONH <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> Na	V(C <sub>16:0</sub> ,NMe,Cb,S)
F <sub>3</sub>		1437	3	C <sub>18:1</sub>	Me	CONH <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> Na	V(C <sub>18:1</sub> ,NMe,Cb,S)
	1174		2	C <sub>18:1</sub>	Me	CONH <sub>2</sub>	Ac	IV(C <sub>18:1</sub> ,NMe,Cb,Ac)
F <sub>4</sub>		1439	3	C <sub>18:0</sub>	Me	CONH <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> Na	V(C <sub>18:0</sub> ,NMe,Cb,S)
F <sub>5</sub>	1309		3	C <sub>16:0</sub>	Me	CONH <sub>2</sub>	H	V(C <sub>16:0</sub> ,NMe,Cb)
F <sub>6</sub>	1335		3	C <sub>18:1</sub>	Me	CONH <sub>2</sub>	H	V(C <sub>18:1</sub> ,NMe,Cb)

2. Se ha realizado el análisis estructural de los factores de nodulación de *Rhizobium gallicum* bv. gallicum R602. Se han utilizado las siguientes técnicas de determinación estructural: CGL-EM, FAB, MALDI Q-o-TOF, ES Q-o-TOF, CID ES Q-o-TOF, CID MALDI Q-o-TOF y  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -RMN (experimentos DQF-COSY, HSQC, TOCSY, NOESY). Además, se ha efectuado el análisis de los *O*-trimetilsililderivados de los metil glicósidos, análisis por metilación, determinación de la configuración absoluta por formación de los *O*-trimetilsililderivados de los (+) y ( $\pm$ )-2-butil glicósidos y se han identificado los siguientes oligosacáridos:



## BIBLIOGRAFÍA

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- H. Hellriegel y H. Wilfarth Beilageheft zu des Zeitschrift des Vereins f.d. Rübenzucker-Industrie d. Deutschen Reiches, 1888 1-234.
- 2.- S.G. Pueppke y W. J. Broughton. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12** (1999) 293-318.
- 3.- A.-E. Hadri, H.P. Spaink, T. Bisseling y N.J. Brewin. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. En *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria.*; H. P. Spaink, et al Eds.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998) 347-60.
- 4.- O. Geiger, A.C. Weissborn y E. P. Kennedy. *J. Bacteriol.* **173** (1991) 3021-3024.
- 5.- A.A. Bhagwat, A. Mithofer, P. E. Pfeffer, C. Kraus, N. Spickers, A. Hotchkiss, J. Ebel y D. L. Keister. *Plant Physiol.* **119** (1999) 1057-1064.
- 6.- V. J. Morris, G.J. Brownsey, G.R. Chilvers, J. E. Harris, A. P. Gunning y B.J.H. Stevens. *Food Hydrocoll.* **5** (1994) 185-188.
- 7.- M.W. Breedveld, L. P. T. M. Zevenhuizen y A.J.B. Zehnder. Cell-surface  $\beta$ -glucans. En *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*; H. Spaink et al Ed.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998) 566.
- 8.- H.R.M. Schlaman, D.A. Phillips y E. Kondorosi. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. En *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model-Plant Associated Bacteria*; H.P. Spaink, et al Eds.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998) 361-386.
- 9.- H. Gagnon y R.K. Ibrahim. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11** (1998) 988-998.
- 10.- W. D'Haese, M. S. Gao, R. De Rycke, M. Van Montagu, G. Engler y M. Holsters. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11** (1998) 999-1008.
- 11.- H.P. Spaink. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15** (1996) 559-582.
- 12.- P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillat, G. Truchet, J.-C. Promé y J. Dénarié. *Nature* **344** (1990) 781-784.
- 13.- P. Roche, F. Debellé, F. Maillat, P. Lerouge, C. Faucher, G. Truchet, J. Dénarié y J. -C. Promé. *Cell* **67** (1991) 1131-1143.
- 14.- R.W. Carlson, J. Sanjuan, U.R. Bhat, J. Glushka, H.P. Spaink, A.H.M. Wijffjes, A.A.N. van Brussel, T.J.W. Stokkermans, N.K. Peters y G. Stacey. *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 18372-18381.
- 15.- M.M.A. Olsthoorn, I.M. López-Lara, B.O. Petersen, K. Bock, J. Haverkamp, H. P. Spaink y J.E. Thomas-Oates. *Biochemistry* **37** (1998) 9024-9032.

- 16.- I.M. López-Lara, K.M.G.M. van der Drift, A.A.N. van Brussel, J. Haverkamp, B.J.J. Lugtenberg, J.E. Thomas-Oates y H. P. Spaink. *Plant Mol. Biol.* **29** (1995) 465-477.
- 17.- M.-P. Bec-Ferté, H.B. Krishnan, A. Savagnac, S.G. Pueppke y J.-C. Promé. *FEBS Lett.* **393** (1996) 273-279.
- 18.- T.J.W. Stokkermans, R. Orlando, V.S.K. Kolli, R.W. Carlson y N.K. Peters. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9** (1996) 298-304.
- 19.- J.L. Folch-Mallol, S. Marroqui, C. Sousa, H. Manyani, I.M. López-Lara, K.M.G.M. van der Drift, J. Haverkamp, C. Quinto, A. Gil-Serrano, J. Thomas-Oates, H.P. Spaink y M. Megias. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9** (1996) 151-163.
- 20.- C. Snoeck, E. Luyten, V. Poinsot, A. Savagnac, J. Vanderleyden y J.-C. Promé. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14** (2001) 678-684.
- 21.- J. Lorquin, G. Lortet, M. Ferro, N. Méar, B. Dreyfus, J.-C. Promé y C. Boivin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10** (1997) 879-890.
- 22.- H. P. Spaink. *Annu. Rev. Microbiol.* **54** (2000) 257-288.
- 23.- F. Gressent, S. Drouillard, N. Mantegazza, E. Samain, R.A. Geremia, H. Canut, A. Niebel, H. Driguez, R. Ranjeva, J. Cullimore y J.J. Bono. *Proc. Natl. Acad. USA* **96** (1999) 4704-4709.
- 24.- G. Stacey, S. Luka, J. Sanjuan, Z. Banfalvi, A. J. Nieuwkoop, J. Y. Chun, L.S. Forsberg y R.W. Carlson. *J. Bacteriol.* **176** (1994) 620-633.
- 25.- T. Laeremans y J. Vanderleyden. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14** (1998) 787-808.
- 26.- W. D'Haese y M. Holsters. *Glycobiology* **12** (2002) 79R-105R.
- 27.- C. Staehelin, M. Schultze, E. Kondorosi, R.B. Mellor, T. Boller y A. Kondorosi. *Plant J.* **5** (1994) 319-330.
- 28.- J. Lorquin, G. Lortet, M. Ferro, N. Méar, J.-C. Promé y C. Boivin. *J. Bacteriol.* **179** (1997) 3079-3083.
- 29.- L. Cárdenas, J. Domínguez, C. Quinto, I.M. López-Lara, B.J.J. Lugtenberg, H.P. Spaink, G.J. Rademaker, J. Haverkamp y J. E. Thomas-Oates. *Plant Mol. Biol.* **29** (1995) 453-464.
- 30.- R. Poupot, E. Martínez-Romero, N. Gautier y J.-C. Promé. *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 6050-6055.
- 31.- G.-P. Yang, F. Debellé, A. Savagnac, M. Ferro, O. Schiltz, F. Maillet, D. Promé, M. Treilhou, C. Vialas, K. Lindström, J. Dénarié y J. -C. Promé. *Mol. Microbiol.* **34** (1999) 227-237.

- 32.- S. Philip-Hollingsworth, R.I. Hollingsworth y F.B. Dazzo. *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 16854-16858.
- 33.- S. Philip-Hollingsworth, G.G. Orgambide, J.J. Bradford, D.K. Smith, R. I. Hollingsworth y F.B. Dazzo. *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 20968-20977.
- 34.- G.G. Orgambide, J. Lee, R.I. Hollingsworth y F.B. Dazzo. *Biochemistry* **34** (1995) 3832-3840.
- 35.- H.P. Spaink, G.V. Bloemberg, A.A.N. van Brussel, B.J.J. Lugtenberg, K.M.G.M. van der Drift, J. Haverkamp y J.E. Thomas-Oates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8** (1995) 155-164.
- 36.- K.M.G.M. van der Drift, H.P. Spaink, G.V. Bloemberg, A.A.N. van Brussel, B.J.J. Lugtenberg, J. Haverkamp y J.E. Thomas-Oates. *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 431-439.
- 37.- A.O. Ovtsyna, G.-J. Rademaker, E. Esser, J. Weinman, B.G. Rolfe, I.A. Tikhonovich, B.J.J. Lugtenberg, J.E. Thomas-Oates y H.P. Spaink. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12** (1999) 252-258.
- 38.- H. P. Spaink, D.M. Sheeley, A.A.N van Brussel, J. Glushka, W.S. York, T. Tak, O. Geiger, E.P. Kennedy, V.N. Reinhold y B.J.J. Lugtenberg. *Nature* **354** (1991) 125-130.
- 39.- J.L. Firmin, K.E. Wilson, R.W. Carlson, A.E. Davies y J.A. Downie. *Mol. Microbiol.* **10** (1993) 351-360.
- 40.- R. Poupot, E. Martínez-Romero y J.-C. Promé. *Biochemistry* **32** (1993) 10430-10435.
- 41.- H.P. Spaink, A. Aarts, G. Stacey, G.V. Bloemberg, B.J.J. Lugtenberg y E. Kennedy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5** (1992) 72-80.
- 42.- M.F. Chaplin. *Anal. Biochem.* **123** (1982) 336-341.
- 43.- J.P. Kammerling, G.J. Gerwig, J.F.G. Vliegthart y R.J. Clamp. *Biochem. J.* **151** (1975) 491-495.
- 44.- O. S. Chizhov, N.V. Molodtsov y N.K. Kochetkov. *Carbohydr. Res.* **4** (1967) 273-276.
- 45.- J. Kärkkäinen y R. Vihko. *Carbohydr. Res.* **10** (1969) 113-120.
- 46.- G.J. Gerwig, J. P. Kammerling y J.F.G. Vliegthart. *Carbohydr. Res.* **62** (1978) 349-357.
- 47.- K. Leontein, B. Lindberg y J. Lönngren. *Carbohydr. Res.* **62** (1978) 359-362.
- 48.- B. Lindberg. "Methods in Enzymology"; ed v. Ginsburg Ed.; Academic Press: New York, (1973); Vol. 28-B 178-195.

- 49.- E.L. Hirst y E. Percival. *Methods in Carbohydr. Chem.* **2** (1963) 145-150.
- 50.- T. Purdie y J.C. Irvine. *J. Chem. Soc.* **83** (1903) 1021.
- 51.- W.N. Haworth. *J. Chem. Soc.* **107** (1915) 8-16.
- 52.- R. Kuhn, H. Trischmann y I. Low. *Angew. Chem. (Int. Ed. Eng.)* **67** (1955) 32.
- 53.- S. Hakomori. *J. Biochem.* **55** (1964) 205-208.
- 54.- I. Ciucanu y F. Kerek. *Carbohydr. Res.* **131** (1984) 209-217.
- 55.- A. Tacken, H. Brade, F. M. Unger y D. Charon. *Carbohydr. Res.* **149** (1986) 263-277.
- 56.- T. J. Waeghe, A. G. Darvill, M. McNeil y P. Albersheim. *Carbohydr. Res.* **123** (1983) 281-304.
- 57.- J. Lönngren y S. Svensson. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **29** (1974) 41-106.
- 58.- M. -S. Kuo y A. J. Mort. *Carbohydr. Res.* **145** (1986) 247-265.
- 59.- A. B. Blakeney, P.J. Harris, R.J. Henry y B. A. Stone. *Carbohydr. Res.* **113** (1983) 291-299.
- 60.- P.-E Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg y J. Lönngren. *Chem. Commun. Univ. Stockolm.* **1** (1976) 75.
- 61.- H. Björndal, B. Lindberg y S. Svensson. *Carbohydr. Res.* **5** (1967) 433-440.
- 62.- I. Yruela Guerrero. *Tesis Doctoral* 1989.
- 63.- H. Am H.R. Buser, P. Guerin y S. Rauscher. *Anal. Chem.* **55** (1983) 818-822.
- 64.- L. Esteban *La Espectrometría de Masas en Imágenes*; ACK Editores, 1993
- 65.- J.B. Fenn. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4** (1993) 524.
- 66.- S.J. Gaskell. *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 677-688.
- 67.- M.M.A. Olsthoorn. *Tesis Doctoral* 2000.
- 68.- L.P Brüll. *Tesis Doctoral* 1999.
- 69.- B.A. Thompson y J.V. Iribarne. *J. Chem. Phys.* **71** (1979) 4451-4463.
- 70.- J.V. Iribarne y B.A. Thompson. *J. Chem. Phys.* **64** (1976) 2287-2294.
- 71.- B. Domon y C.E. Costello. *Glyconj. J.* **5** (1988) 397-409.
- 72.- D. Boudot, C. Roumestand, F. To y D. Canet. *J. Mang. Reson.* **83** (1989) 428-433.
- 73.- C. Roumestand, D. Canet, N. Mahieu y T. Toma. *J. Mang. Reson.* **106** (1994) 168-181.
- 74.- D.J. States, R.A. Haberkorn y D. J. Ruben. *J. Magn. Reson.* **48** (1982) 286-292.
- 75.- E. Kupce y R. Freeman. *J. Magn. Reson.* **112** (1995) 134-137.

- 76.- L. Braunschweiler y R.R. Ernst. *J. Magn. Reson.* **53** (1983) 521-527.
- 77.- P. Hanfland, H. Egge, U. Dabrowski, S. Jhun, D. Roelcke y K. Dabrowski. *Biochemistry* **20** (1981) 5310-5319.
- 78.- A. Kumar, R. R. Ernst y K. Wüthrich. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95** (1980) 1-6.
- 79.- A. A. Bothner-By, R.L. Stephens, J. M. Lee, C.D. Warren y R. W. Jeanloz. *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 811-813.
- 80.- K. Bock y C. Pedersen. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41** (1983) 27-66.
- 81.- R. Barker, H.A. Nuñez, P. Rosevor y A. S. Serianni. *Methods in Enzymol.* **83** (1982) 58-69.
- 82.- G. Bondenhausen y D. J. Ruben. *Chem Phys. Lett.* **69** (1980) 185-189.
- 83.- T. Parella, F. Sánchez-Ferrando y A. Virgili. *J. Magn. Reson.* **126** (1997) 274-277.
- 84.- A. Bax y M. F. Summers. *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 2093-2094.
- 85.- J. Michiels, B. Dombrecht, N. Vermeiren, C.-W. Xi, E. Luyten y J. Vaderleyden. *J. FEMS Microbiol. Ecol.* **26** (1998) 193-205.
- 86.- D.C. Jordan *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Williams & Wilkins: Baltimore, USA, 1984 235-244.
- 87.- E. Martínez-Romero, L. Segovia, F.M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham y M. A. Parda. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41** (1991) 417-426.
- 88.- L. Segovia, J.P.W Young y E. Martínez-Romero. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43** (1993) 374-377.
- 89.- N. Amarger, V. Macheret y G. Laguerre. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47** (1997) 996-1006.
- 90.- R. Mhamdi, G. Laguerre, M. E. Aouani, M. Mars y N. Amarger. *FEMS Microbiology Ecology* **41** (2002) 77-84.
- 91.- L. F. Gao, Z. A. Hu y H. X. Wang. *Microbiology* **35** (2002) 347-352.
- 92.- K.M.G.M. van der Drift, M.M.A. Olsthoorn, L.P. Brül, L. Block-Tip y J.E. Thomas-Oates. *Mass Spectrometry Reviews* **17** (1998) 75-95.
- 93.- M.N. Fukuda, A. Dell, J.E. Oates, P.Wu, J.C. Klock y M. Fukuda. *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 1067-1082.
- 94.- M. Treilhou, M. Ferro, C. Monteiro, V. Poinsoy, S. Jabbouri, C. Kanony, D.Promé y J.-C. Promé. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11** (2000) 301-311.
- 95.- A. Sessitsch, H. Ramirez-Saad, G. Hardarson, A.D. Akkermans y W.M. de Vos. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47** (1997) 1097-1101.

- 
- 96.- A.R.J. Eaglesham y A. Ayanaba. En *Current developments in biological nitrogen fixation*; N. S. Subba Rao Ed.; Edward Arnold Publisher: London, UK, (1984) 1-35.
- 97.- M. Alexander. *Adv. Microbiol. Ecol.* **8** (1985) 163-183.
- 98.- D. N. Munns. *Adv. Plant Nutr.* **2** (1986) 63-91.
- 99.- J. Brockwell, A. Pilka y R. A. Holliday. *Aust. J. Exp. Agric.* **31** (1991) 211-219.
- 100.- H. H. Zahran. *Biol. Fertil. Soils* **12** (1991) 73-80.
- 101.- H. H. Zahran. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (1999) 968-989.
- 102.- P.H. Graham. *Can. J. Microbiol.* **38** (1992) 475-484.
- 103.- B.B. Bohlool, J. K. Ladha, D. P. Garrity y T. George. *Plant Soil* **141** (1992) 1-11.
- 104.- P. H. Graham, J. K. Draeger y M. L. Ferrey. *Can. J. Microbiol.* **40** (1994) 198-207.
- 105.- B. Anyango, K. J. Wilson, J. L. Beynon y K. E. Giller. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 4016-4021.
- 106.- P. M. Riccillo, M. M. Covallino, D. H. Grasso, R. England, F. de Bruijn y O. M. Aguilar. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13** (2000) 1228-1236.
- 107.- P. M. Riccillo, C. I. Muglia, F. de Bruijn, I. R. Booth y O. M. Aguilar. *J. Bacteriol.* **182** (2000) 1748-1753.
- 108.- T. A. Lie. En *Nitrogen Fixation*; W. J. Broughton Ed.; Clarendon Press: Oxford, (1981); Vol. 1 104-134.
- 109.- L. M. Bordeleau y D. Prévost. *Plant Soil* **161** (1994) 115-125.
- 110.- N. Amarger, M. Bours, F. Revoy, M.R. Allard y G. Laguerre. *Plant and Soil* **161** (1994) 147-156.
- 111.- A. Diouf, P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kersters, M. Gillis, E. Martínez-Romero y M. Gueye. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50** (2000) 159-170.
- 112.- W. Streit, K. Kosh y D. Werner. *Biol. Fertil. Soils* **14** (1992) 140-144.
- 113.- K. Vlassak, J. Vanderleyden y A. Franco. *Biol. Fertil. Soils* **21** (1996) 61-68.
- 114.- P. H. Graham, S. E. Viteri, F. Mackie, A. A. T. Vargas y A. Palacios. *Field Crop Res* **5** (1982) 121-128.
- 115.- J. G. Howieson y M. A. Ewing. *Aust. J. Agri. Res.* **37** (1986) 153-155.

Maria Eugenia Sosa Diaz  
Análisis Estructural de Factores de Modulación  
Producidos por Bacterias del Género Rhizobium

noheraldico "cum laude"

por manuscrito

5 de Noviembre 2005

~~M. Iglesias~~  
El presidente

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~