

1984



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

*Libro No. 26*

**Inmovilización de Dextransacarasa de  
Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512 F.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

**MARIA TERESA DELGADO CALDERON**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

Introducción	1
Generalidades	4
Materiales y Métodos	24
Resultados	28
Conclusiones	46
Recomendaciones	47
Bibliografía	48

## INTRODUCCION

Las enzimas han sido definidas como biocatalizadores, catalizadores producidos por células vivas. Para su obtención generalmente se prefiere la fuente microbiana sobre la fuente vegetal o animal porque los microorganismos pueden crecer rápidamente sin limitaciones estacionales además de que pueden desarrollarse rápidamente cepas modificadas para mejorar los rendimientos de enzimas.

Las enzimas ofrecen un gran número de ventajas como catalizadores industriales, sobre los catalizadores inorgánicos, pues su alto grado de especificidad al sustrato elimina grandemente la formación de subproductos indeseables disminuyendo así los costos de proceso y/o condiciones ambientales extremas requeridas en los procesos no biológicos alternativos. La supresión de condiciones severas de procesamiento disminuye la posibilidad de daño a sustratos termosensibles, también reduce los requerimientos de energía del proceso y los efectos de corrosión. La implicación de la conservación de energía en las futuras economías que se logran al aumentar la escala resultan obvias. Las altas velocidades de reacción, aun bajo estas suaves condiciones de operación, hacen el proceso más eficiente y reducen el costo de manufactura. En algunos casos su uso es aun limitado debido a:

- 1) Sus altos costos de producción, si es que se requieren grandes cantidades de biomasa para obtener un rendimiento razonable de enzima de interés.
- 2) Sus altos costos de aislamiento y purificación dado que, si se trata de enzimas intracelulares, se requieren métodos de separación delicados para liberar a la enzima en forma intacta, de la célula y aislarla de los restos de ella.

Además de que la mayoría de las enzimas son inestables cuando se remueven de la célula viva y como la mayoría de ellas se emplean en forma soluble, diluidas en medio acuoso, es difícil y económicamente prohibitivo recupe -

rarlas de los efluentes del reactor al finalizar el proceso catalítico.

Una alternativa que ha abierto mayores posibilidades de utilizar enzimas a gran escala, contrasta éstos efectos. Consiste en su inmovilización en soportes sólidos, insolubles en las condiciones de operación.

Una enzima inmovilizada puede definirse como un sistema o una preparación en la cual la enzima está confinada o localizada en una región del espacio relativamente definida, es decir, cuya movilidad por difusión libre está restringida; es un complejo enzima-soporte activo pero insoluble. Puede estar realmente atada por uno o varios mecanismos a una superficie sólida o simplemente confinada dentro de una barrera líquida o sólida - - circundante.

La dextransacarasa (32,33) es el término dado a la enzima o grupo de enzimas, glucosiltransferasas (enzimas que transfieren grupos glucosilo) o más específicamente hexosiltransferasas, responsables de la síntesis de dextranas a partir de sacarosa (25) presumiblemente también a partir de lactulosacarosa (30) fluoruro de  $\alpha$ -D-glucopiranosil (19,20).

Las dextranas son una gran clase de homopolisacáridos hidrocoloidales de origen bacteriano producidos extracelularmente, constituidos por residuos  $\alpha$ -D-glucopiranosil polimerizados predominantemente en enlaces  $\alpha$ 1,6 y ramificaciones con enlaces  $\alpha$ 1,3 ó  $\alpha$ 1,4 dependiendo del microorganismo utilizado.

La dextransacarasa ha ganado importancia debido a que las dextranas se les ha encontrado muchos usos, por ejemplo en la industria alimentaria se les utiliza como acondicionador, estabilizante, agente texturizante y otros usos relacionados en los cuales pueden sustituir a las gomas naturales (86,87); en la industria farmacéutica se les utiliza como expansor del volumen del plasma, encapsulador y vector de medicamentos (1) en la industria química en la purificación del hidróxido de sodio (59) como material -

de impermeabilización, etc.(69) así como en la industria petroquímica.

Las principales bacterias sintetizadoras de dextranas a partir de sacarosa pertenecen a la familia Lactobacteriaceas, tribu Streptococcaeae, género *Leuconostoc*, especies mesenteroides, y *dextranicum* (67,8,35).

Las dextranas pueden producirse de varias formas:

Por fermentación intermitente, en la cual parte del sustrato, sacarosa, es utilizado para el crecimiento bacteriano y parte para ser convertido en dextranas por la enzima excretada.

Por síntesis enzimática, proceso consistente en dos etapas; una de producción de la enzima por fermentación, minimizando la producción de dextranas para posteriormente utilizar ésta en una síntesis agregando al sobrenadante de fermentación una solución de sacarosa.

El uso de la enzima inmovilizada permitiría la producción de dextranas sin necesidad de una fermentación repetitiva, además de la posibilidad de regular el peso molecular de las dextranas producidas.

Este trabajo consta de varias etapas siendo el objetivo fundamental, seleccionar un soporte sólido adecuado para la inmovilización de la dextranosa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

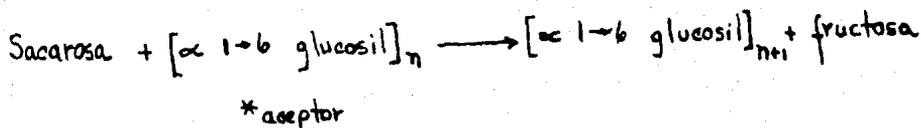
## GENERALIDADES.

La dextranasa (sacarasa: 1,6- $\alpha$ -D glucan 6- $\alpha$ -glucosil transferasa E.C.2.4.1.5) de Leuconostoc mesenteroides es secretada en cantidades relativamente grandes dentro de la solución sobrenadante del cultivo con un mínimo de enzimas contaminantes. Fue aislada por Hehre (25) y Van Tieghen dió la primera descripción adecuada del microorganismo describiéndolo como similar al género Nostoc de las algas azul-verdes y le dió la designación-hasta hoy en día usada ampliamente, de Leuconostoc mesenteroides (85,47). Liesenberg y Zopf fueron los primeros en aislar cepas de Leuconostoc mesenteroides en forma de cultivo puro (85,51).

### Mecanismo de acción.

La acción de la enzima dextranasa de Leuconostoc mesenteroides sobre el sustrato sacarosa, ha sido estudiada por un gran número de investigadores,

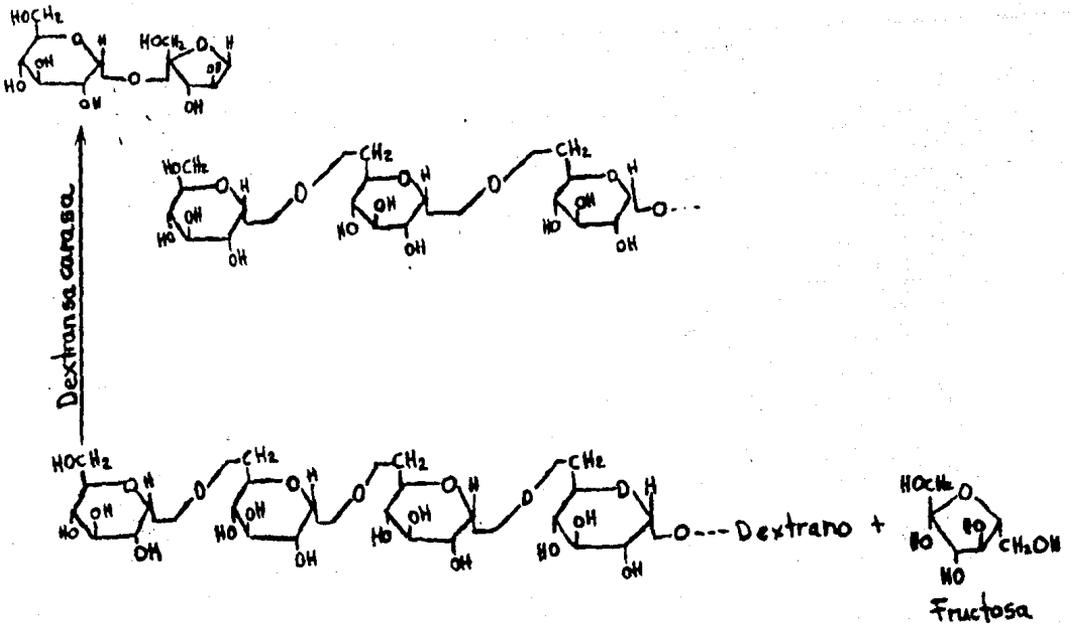
Reacción general:



Esta reacción procede irreversiblemente en dirección de la producción del polímero hasta que se agota el sustrato es decir, la sacarosa. Ésto también se apoya en la gran diferencia en el  $\Delta F$  de hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la sacarosa y las dextranas.

\* Isomaltosa, maltosa, D-glucosa,  $\alpha$ -metil D-glucósido 3-O metil - - D glucosa y dextranas de bajo peso molecular (6).

Síntesis de dextranas a partir de sacarosa catalizada por la dextran-sacarasa (49,27).



El enlace de sacarosa que rompe la dextran-sacarasa es aquel entre el carbono 1 de la glucosa y el oxígeno interglucosídico. La dextran-sacarasa es realmente una glucosiltransferasa más que una glucosidasa.

El crecimiento de las cadenas de dextranas catalizado por la dextran-sacarasa puede describirse como un tipo de reacción de propagación en etapas, cada etapa consiste de la adición de un radical glucosilo de la molécula de sacarosa al hidroxilo del carbono 6 del extremo no reductor - de la unidad glucosa terminal de la cadena de dextranas en crecimiento (27).

La energía requerida para la condensación de dos unidades glucosilo es proporcionada por la hidrólisis de sacarosa lo cual constituye una diferencia esencial con el mecanismo común de síntesis de polisacáridos - (60).

Se ha propuesto (30) la existencia de una familia de dextran-sacara-

sas que se diferencian en su afinidad por los grupos hidróxilo de los residuos  $\alpha$ -D- glucopiranosil de las cadenas de dextranas. En éste mecanismo la etapa determinante de la velocidad de reacción sería la ruptura del enlace glucosídico del sustrato.

Las diferentes clases de dextrano derivan de la existencia de enlaces diferentes a  $\alpha$ 1,6. El mecanismo de formación no establece las ramificaciones y enlaces  $\alpha$ 1,3 y  $\alpha$ 1,4 ó  $\alpha$ 1,2 en las dextranas. Se ha sugerido(15) que los enlaces de las ramificaciones son producidos cuando las dextranas actúan como aceptor en la reacción.

Robyt y Taniguchi han confirmado ésta teoría y han mostrado que los enlaces de ramificación se efectúan por reacción de transferencia entre las dextranas y el complejo intermediario dextranasil-enzima, una sola enzima sería la responsable de toda la síntesis (72).

En las dextranas formadas por la enzima de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F las ramificaciones del tipo  $\alpha$ 1,3 representan el 5% del número total de enlaces glucosídicos (49,77,52) y el 40% de éstas ramificaciones están constituidas por una sola unidad glucosilo (92). Barker y colaboradores han determinado que el número de éste tipo de enlaces varían con el contenido de  $Mg^{++}$  en el medio de cultivo, pues se ha mostrado que en un medio deficiente en  $Mg^{++}$  inoculado con Leuconostoc mesenteroides puede aislarse una molécula relativamente lineal (65,2,3).

Varios cientos de cepas de Leuconostoc mesenteroides han sido probadas para determinar su habilidad para producir dextranas. El porcentaje de enlaces  $\alpha$ 1,6 en las dextranas producidas varía de 100 a 60 % dependiendo de la cepa usada y en menor grado de las condiciones del proceso. La importancia de ésta característica radica en que éste tipo de enlaces son atacados por las enzimas del cuerpo mucho más lentamente que los enlaces  $\alpha$ 1,4 (4).

Durante la acción de la dextransacarasa se forman pequeñas cantidades de glucosa, ésto puede deberse a la presencia de enzimas contaminantes - pero también puede ser un producto de la misma dextransacarasa, resultante de la hidrólisis de un intermediario glucosil enzima en presencia de agua. (22).

#### Propiedades de la enzima.

La dextransacarasa de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F es una - proteína de peso molecular de 280 000 (16,14). Parece razonable pensar - que la enzima posee un cofactor cuyo peso molecular se encuentra entre - 5000-30 000 (49), presenta un máximo de actividad a pH 5-5.2 y a una -- temperatura de 30°C (45). Los valores de  $K_m$  publicados para la saca- rosa están dentro del intervalo de 0.02-0.03 M. La energía de activación de la reacción en el intervalo de temperatura de 15 a 30°C es de  $6.9 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$  (11). Los datos sobre la necesidad de iones metálicos son numerosos y - contradictorios; así sabemos que el EDTA (49) y el ácido oxálico la inac- tivan y entre los iones  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ , sólo los iones  $\text{Ca}^{++}$  res- tauran la actividad de la enzima. Se ha sugerido que ésta enzima existe bajo la forma de metaloenzima con  $\text{Ca}^{++}$  (65).

Se ha inferido, basándose en estudios de dependencia de la actividad enzimática del pH (46,63) y la pérdida de actividad bajo la fotooxidación - (24,48,99,100,101) que la enzima contiene un grupo carboxilo y un grupo - imidazol en el sitio activo. Ésto está sostenido por el hecho de que la mutarrotación que sufre el residuo de D- glucosa se explica por un ata - que simultáneo de un grupo nucleofílico y un grupo electrofílico; ésta - situación podría existir en la dextransacarasa donde los grupos imidazol - y carboxilo están situados en la matriz de la proteína de tal manera que podrían efectuar un ataque concertado sobre el enlace glucosilo para la reacción de polimerización. Podría asumirse que aparte de la combinación de la enzima sustrato en el sitio catalítico, el sustrato debe estar atado a un sitio específico (63).

Los inhibidores comunes de enzimas:

F<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, 0.05M, compuestos diazo, iodoacetato 0.025M, piridina, anilina 0.01M, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub> 0.001M, AgNO<sub>3</sub> 0.00001 M no afectan a la dextranasa (29,26). Parte de éste comportamiento puede ser debido a la acción protectora de las dextranas que la acompañan (27).

Se ha observado que una concentración de sacarosa superior a 0.2M -- inhibe la acción de la enzima (27,26).

Se ha publicado que si se une una molécula de donador (sacarosa, lactulosa, fluoruro de  $\alpha$ -D- glucopiranosil) en el sitio del aceptor se causa inhibición (67,62,83 ) y que un exceso de aceptor (isomaltosa, maltosa, D-glucosa,  $\alpha$  metil D-glucósido, 3-O-metil D- glucósido y dextranas de bajo peso molecular) en presencia de una baja concentración de sacarosa, causa inhibición (67) debido a una interacción competitiva del aceptor y la sacarosa por el sitio del donador.

Se ha demostrado que la enzima es inactivada por soluciones diluidas de urea 2M (64) y que la adición de iones Zn<sup>++</sup> (0.025M) a la enzima provoca 100% de inhibición (74). Se ha determinado que la dextranasa de Leuconostoc mesenteroides IAM 1046 es inhibida grandemente por Cu<sup>++</sup> , - Hg<sup>++</sup>, EDTA, y p-cloro-mercuribenzoato (91)

La composición de aminoácidos de la dextranasa (9,14,16)es:

Glicina	13.38 %
Acido aspártico	12.52 %
Acido glutámico	10.41 %
Lisina	10.01 %
Arginina	9.67 %
Alanina	8.81 %
Treonina	

Serina  
Prolina  
Valina  
Leucina  
Isoleucina  
Fenilalanina  
Histilina

Robyt y Walseth demostraron efectuando una hidrólisis ácida seguida de una cromatografía en papel, que la enzima pura es una glucoproteína, donde la fracción osídica está constituida por D-manosa principalmente seguida de glucosa y galactosa. Éstos resultados han sido confirmados con la precipitación total de la actividad de la dextransacarasa por la adición de concanavalina A que acompleja específicamente las glucoproteínas que contienen múltiples - grupos D-manopiranosil insustituídos y no acompleja con dextranas de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F (80,21).

#### Producción de la dextransacarasa.

Las condiciones óptimas para la producción de dextranas son similares - a las condiciones necesarias para la máxima producción de la dextransacarasa por la cepa de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F.

La sacarosa es la única fuente de carbono capaz de inducir la formación de la dextransacarasa de Leuconostoc mesenteroides NRRL-B-512F y se ha demostrado que la porción fructofuranoica de la molécula de sacarosa es la responsable de la activación del sistema de inducción (65). Otras investigaciones han demostrado que la concentración de la fuente de nitrógeno para la producción de enzima debe ser más elevada que para la producción de dextranas - pero que la influencia de éstos compuestos no se detecta si el  $K_2HPO_4$  se tiene en exceso dentro del medio de cultivo. También se ha encontrado que los iones  $NH_4^+$  inhiben la producción de la enzima y que los iones  $Mg^{++}$  son necesarios para su producción (98).

Dado que Leuconostoc mesenteroides es un microorganismo microaerobio sólo requiere la agitación justa para mantener la homogeneidad del medio.

La producción de enzima es muy sensible al pH; se sabe que es máxima a pH 6.7 pero a éste pH se pierde el 35 % de la actividad en una hora (45,88). Por el poder regulador que le confiere al medio de cultivo, el exceso de  $K_2HPO_4$  dentro de la zona de producción máxima de enzima, aumenta la secreción de ésta. Tsuchiya y colaboradores han informado que la producción de dextransacarasa es óptima cuando se tiene 3.5% de  $K_2HPO_4$  en el medio de cultivo (49,88).

También se ha publicado (67,97) que la adición de cloruro de calcio (0.001-0.1) % p/v dentro del medio de cultivo aumenta la producción de dextransacarasa.

Se llevó a cabo una investigación (49) en donde se concluyó que la producción de dextransacarasa se efectúa cuando la concentración de sacarosa rebasa un valor crítico y que por consiguiente no es posible cuando la sacarosa es limitante.

La máxima actividad enzimática de un cultivo continuo en un medio conteniendo sacarosa (Sr 1% sacarosa) fué alcanzada a una velocidad de dilución de  $0.53 h^{-1}$  (49).

La dextransacarasa se produce hasta cerca del inicio de la fase estacionaria de crecimiento alcanzando un máximo después de tres horas (74).

#### Purificación de la enzima.

Gracias al desarrollo de nuevas técnicas de purificación se ha podido resolver el problema que representa la purificación de la dextransacarasa.

Los primeros intentos se hicieron por fraccionamiento con etanol, clo-

roformo, sulfato de amonio (44,36,75,15) pero se observaba una gran cantidad de dextranas remanente ya que la sacarosa debe estar presente en el medio de cultivo. Por otro lado se observa una aglomeración de la enzima, proceso que se ve acelerado durante la purificación ( 26,90,88,22,5,42,43).

Se ha obtenido (14) una preparación de enzima libre de dextranas por -- fraccionamiento con metanol y sulfato de amonio seguida de adsorción sobre -- hidroxilapatita y ultrafiltración.

También se obtuvo una preparación enzimática libre de dextranas por -- fraccionamiento con alcohol seguida de adsorción sobre gel de fosfato de -- calcio (7).

Recientemente (74) se ha llevado a cabo la purificación de la enzima -- por diálisis y concentración en una unidad piloto de Bio- Fiber 80 seguida -- de un tratamiento con dextranasa, una cromatografía en columna de Bio-Gel -- A 5 m y una concentración final en una celda de ultrafiltración.

La dextranasa ha sido aislada del sobrenadante de cultivo libre -- de células por precipitación con sulfato de amonio al 75 % de saturación -- en presencia de 0.05 % de albúmina de huevo como coprecipitante seguida de -- filtración en gel con Sephadex G-25 y cromatografía de intercambio iónico -- en una columna de DEAE - celulosa (49).

También ha sido purificada concentrando el sobrenadante de fermenta -- ción libre de células por ultrafiltración seguida de permeación en gel. -- Ambas etapas se llevan a cabo a 4<sup>o</sup> C (41,53).

Parámetros que afectan el peso molecular de las dextranas formadas du -- rante la reacción enzimática.

Se ha publicado (90,61) que regulando la concentración del aceptor, específicamente de las dextranas de bajo peso molecular, se provoca una disminución del peso molecular y un aumento del rendimiento del dextrano producido; que un aumento en la concentración de sacarosa desde 50 a 200- $\text{gl}^{-1}$  provoca una disminución del peso y del rendimiento de las dextranas producidas (90,31)

Con respecto a la temperatura también se ha observado (90) que a -- $15^{\circ}\text{C}$  el peso molecular promedio de las dextranas de bajo peso molecular se incrementa ligeramente; que cuando la reacción se lleva a cabo a 10- y  $4^{\circ}\text{C}$  se incrementa el rendimiento del dextrano de bajo peso molecular sin eliminar la formación de dextranas de alto peso molecular y que cuando la temperatura de reacción se disminuye de  $30$  a  $15^{\circ}\text{C}$ , se reduce el rendimiento de dextranas de alto peso molecular e incrementa el rendimiento de las dextranas de bajo peso molecular así como su peso molecular promedio.

En lo que concierne a la concentración de la solución enzimática se ha observado, solamente a  $30^{\circ}\text{C}$ , que un aumento en la concentración de enzima favorece la formación de dextrano de bajo peso molecular (90).

La presencia de maltosa dentro del medio de reacción aumenta considerablemente la velocidad de reacción y disminuye el rendimiento de dextranas de alto peso molecular por lo que prueba ser una sustancia que -- actúa como aceptor excepcionalmente activo (90).

También se ha observado que altas concentraciones de fructosa favorecen la síntesis de dextranas de bajo peso molecular; esto explica parcialmente el efecto observado de una alta concentración inicial de sacarosa, sin embargo el efecto de la fructosa es muy complejo (90).

#### Inmovilización de enzimas.

Las enzimas pueden ser unidas por uno o varios mecanismos a un soporte

sólido o simplemente confinados dentro de una barrera sólida o líquida.

Para la expresión de la actividad de la enzima inmovilizada es necesario retener el mismo estado estructural de la proteína para no alterar el sitio activo ( el o los aminoácidos de la proteína que interactúan con el sustrato para dar lugar al producto).

Para ello es necesario llevar a cabo la reacción de inmovilización en condiciones muy suaves, evitar altas temperaturas de reacción, tratamientos ácidos, alcalinos, altas concentraciones de sales, etc. (93).

Las ventajas de inmovilización de enzimas (35) puede resumirse como sigue:

- 1) Incremento en su vida catalítica útil, pues puede llevarse a cabo un uso múltiple o repetitivo de un solo lote de enzima.
- 2) Facilidad para detener rápidamente la reacción.
- 3) En múltiples casos, estabilización de la enzima.
- 4) Un proceso que emplea una enzima inmovilizada por enlace covalente puede ofrecer la ventaja de proporcionar un producto libre de enzima.
- 5) Generalmente presentan una adecuada estabilidad operacional.
- 6) Pueden ser aplicadas en procesos continuos.
- 7) Existe la posibilidad de diseñar sistemas multienzimáticos funcionando como reactores en serie.
- 8) En algunos casos, se presentan largos tiempos de vida media.
- 9) Velocidades de decaimiento predecibles.
- 10) Cuando se aplican en procesos analíticos eliminan la preparación de reactivos.

Cada uno de los puntos mencionados ha contribuido al desarrollo de la tecnología de enzimas.

Actualmente se emplean una variedad de técnicas y soportes para la inmovilización de enzimas y la conclusión que puede ser deducida o inferida es que no existe la técnica de inmovilización o el soporte ideal o universal, pues éstos deben ser elegidos considerando la enzima y su aplicación.

Los métodos para inmovilización de enzimas pueden ser clasificados en:

- 1) Entrecruzamiento de las moléculas de enzimas.
- 2) Entrecruzamiento de enzimas dentro del soporte o sobre su superficie.
- 3) Enlace covalente a soportes.
- 4) Adsorción en soportes.
- 5) Atrapamiento en cápsulas o membranas.

Se debe aclarar que cuando se habla o describe una técnica particular de inmovilización, implica simplemente que el enlace propuesto es el que predomina pues en algunos casos el método utilizado es una combinación de dos o más de éstos.

Ninguna de éstas técnicas tiene una clara ventaja sobre las otras, lo más importante es que tan fácilmente puede ser llevada más allá de la etapa de laboratorio.

En lo que respecta a los soportes, su solubilidad debe ser nula, dentro de las condiciones del medio ambiente en el que opera.

Los soportes utilizados en la inmovilización de enzimas pueden ser clasificados en forma general en dos grupos:

- 1) Soportes inorgánicos.
- 2) Soportes orgánicos.

Ésta clasificación no describe la morfología de los materiales, que es extremadamente importante con respecto al área superficial y la estructura porosa, factores que afectan el comportamiento de una enzima inmovilizada. Pueden entonces clasificarse en soportes porosos y no porosos.

Los soportes porosos se clasifican en:

- a) Soportes de poro controlado.
- b) Soportes de amplia distribución de poro.
- c) Soportes de estructura de gel, los cuales se subdividen en:
  - c<sub>1</sub>) Estructuras de gel preformadas
  - c<sub>2</sub>) gel de atrapamiento
  - c<sub>3</sub>) copolímeros

Los soportes no porosos tienen la desventaja de que el área de su material es extremadamente baja y por lo tanto la superficie accesible para la unión de la enzima es extremadamente limitada.

Es difícil predecir el comportamiento de un cierto soporte o técnica basándose en los resultados con otras enzimas, pues las características pueden variar considerablemente para la misma enzima unida a diferentes soportes pero por diferentes técnicas, pero es útil definir parámetros de sistemas de enzimas inmovilizadas los cuales pueden ser utilizados para su caracterización y evaluación.

Una de las características más importantes de una preparación de enzima inmovilizada es su actividad catalítica expresada como velocidad inicial en términos de unidades internacionales ( $\mu$ moles de sustrato convertidas por minuto), por gramo de catalizador. Para algunas enzimas una unidad puede tener una definición especial.

Las actividades expresadas de las enzimas son extremadamente sensibles a las condiciones ambientales, ejemplo: concentración inicial de sustrato, concentración del cofactor, temperatura, pH, tiempo de reacción, -- fuerza iónica, concentración de solución reguladora. Para las enzimas --

inmovilizadas influyen además: la agitación, la velocidad de flujo, las dimensiones físicas del soporte, por lo tanto, éstas condiciones siempre deben presentarse con los datos de actividad.

#### Métodos de inmovilización.

##### Adsorción.

La adsorción es tal vez el método de mas simple aplicación; se lleva a cabo simplemente exponiendo bajo condiciones suaves, una solución enzimática a una superficie sólida. Las fuerzas de enlace entre la enzima y el soporte son débiles por lo que la enzima puede desorberse fácilmente en presencia de sustrato o soluciones concentradas de electrolitos. Un soporte es adecuado como adsorbente sólo cuando posea gran afinidad por la enzima y al mismo tiempo le cause la mínima desnaturalización. Para adsorción de enzimas puede utilizarse soportes neutros o cargados. Se han utilizado como soportes resinas de intercambio iónico, como por ejemplo:

DEAE- celulosa, DEAE- Sephadex, carboximetil celulosa (CMC), cuarzo, bentonita, partículas de carbón, sílica gel, etc.

Una manera de mejorar la retención de enzimas adsorbidas es usando - entrecruzamiento intermolecular por medio de agentes bifuncionales como - glutaraldehído.

##### Atrapamiento en gel.

Los ó las geles poliméricas proporcionan barreras físicas al escape de enzimas, mientras que permiten el paso del sustrato y producto. Así - las enzimas pueden ser usadas ocluidas en una matriz entrecruzada.

Con algunas enzimas el atrapamiento en gel se hace generalmente poli

merizando en solución acuosa que contiene el soporte (en forma monomérica) y la enzima, en presencia del agente de entrecruzamiento. Esta técnica de inmovilización ofrece la desventaja de que en ocasiones las condiciones de reacción son drásticas y la enzima es significativamente alterada.

Las mayores desventajas de esta técnica de inmovilización son dos:

1) Pérdida continua de actividad debido a que la distribución del tamaño de poro invariablemente origina algunas fugas que son lo suficientemente grandes, que permiten la pérdida de enzimas.

2) Grandes barreras difusionales al transporte del sustrato y producto originando retardos en la reacción, particularmente con sustratos y/o productos de alto peso molecular.

Una variación al método de atrapamiento es formar microcápsulas que contienen la enzima.

**Enlace covalente.**

Es el método más estudiado para la inmovilización de enzimas. El enlace covalente de una enzima a un soporte sólido se lleva a cabo a través de los grupos funcionales de la enzima, evitando en lo posible que éstos sean los esenciales para su actividad catalítica; por ejemplo:

- 1) grupos amino y carboxilo libres.
- 2) grupos hidróxilo, ejemplo el de serina y treonina.
- 3) grupos fenólicos, ejemplo el de la tirosina.
- 4) grupo imidazol, ejemplo el de la histidina.
- 5) grupo sulfhidrilo.

Durante el acoplamiento se deberán emplear condiciones suaves para minimizar la desnaturalización de la enzima.

Las reacciones para unir la enzima al soporte caen dentro de tres categorías:

- 1) unión a través de la formación de enlace peptídico.
- 2) unión a través de alquilación.
- 3) unión diazo.

El enlace covalente puede alterar la estructura de la enzima cambiando su reactividad. En algunos casos puede ser afectado el sitio activo por la reacción de acoplamiento, originando mayor pérdida de actividad.

Entrecruzamiento intermolecular.

Reactivos bifuncionales que inducen el entrecruzamiento intermolecular pueden unir enzimas a soportes sólidos, por ejemplo, glutaraldehído, -bis diazobenzidina, ácido 2-2' disulfónico, tolueno, 2-isocianato, 4-isotiocianato, tricloro 5 triazina, etc.

Para adaptar un proceso de inmovilización a la práctica industrial -- debe ser simple, barato y capaz de ser escalado rápidamente. La situación ideal sería tener una técnica que reuniera éstos requisitos y que pudiese combinar las ventajas de todas éstas técnicas mientras que minimizara -- sus desventajas.

Pocas técnicas desarrolladas recientemente han enfocado su atención -- en ésta dirección. Algunos ejemplos son: la técnica que emplea agentes quelantes, tales como sales de metales de transición, para acoplar enzimas a una variedad de soportes; encerrar una solución acuosa de enzima dentro de una membrana líquida es otra técnica propuesta recientemente; la inmovilización de enzimas en fibras porosas y sobre la superficie interna de tubos poliméricos como nylon; también se han intentado procesos que emplean complejación molecular, electrodeposición e impregnación.

Debido a que la mayoría de las técnicas de inmovilización no son tan selectivas que permitan seleccionar la proteína enzimática sobre las impurezas que podrían ser carbohidratos, sales y proteínas no enzimáticas, las --

enzimas deben sufrir un proceso de purificación previo a su inmovilización pues las impurezas ocuparían algunos de los sitios de enlace sobre el soporte que podrían ser más económicamente utilizados por la enzima.

La dextranasa es una enzima extraordinariamente difícil de inmovilizar; parece ser que la mayor dificultad es su desactivación durante la inmovilización en vez de su exclusión de los poros del soporte debido a su gran tamaño (41); así la dextranasa puede ser inmovilizada cuando los poros del soporte son lo suficientemente anchos para permitir, además de la fijación de la enzima, la difusión de las dextranas y de la sacarosa (54).

Han sido publicados por varios grupos (41) informes de inmovilización de dextranasa; así sabemos que la enzima ha sido inmovilizada iónicamente a DEAE Sephadex A 50 (68); covalentemente a Bio-Gel P<sub>2</sub> (71), gel de poliacrilamida, membranas de acetato de celulosa y fibras porosas polisulfónicas (17). También ha sido inmovilizada en papel filtro Whatman No. 1 con cloruro cianúrico por el método de Smith y Lenhoff (79), a acrilamina poliacrilamida (Enzacril AA) por enlace diazo, a acilhidracida poliacrilamida (Enzacril AH) (12) después de la formación de una azida ácida; a un copolímero entrecruzado de acrilamida y N-acriloilcisteína (Enzacril polilitiol) con ferricianuro de potasio; directamente a Enzacril polilitiolactona y a un copolímero de N-acriloilaminoacetaldehído dimetil acetal y N,N'-metil-enediacrilamida (Enzacril poliactal) después de un tratamiento con ácido diluido según las recomendaciones del fabricante (18). En todos los casos desaparece la mayor parte de la actividad enzimática de la solución sobrenadante pero 2% o menos de ésta se encuentra en el soporte. También ha sido unida iónicamente a DEAE-celulosa, DEAE-Sephadex A 25, A50, Sp-Sephadex C-25 y C50 a pHs entre 3 y 7 (41).

Con los tres soportes DEAE desaparece virtualmente toda la actividad dextranasa de la solución sobrenadante a todos los pH's pero menos del 10% está en forma activa en el soporte; con los dos soportes SP ocurre

completa absorción sólo a pH3; sólo con SP-Sephadex C 50 a pH3 fue apreciable la actividad inmovilizada obtenida.

También se ha unido a un soporte poroso alquilamina Spheron polihi-droxietilmetacrilato de diferentes diámetros utilizando glutaraldehído (12) con el sobrenadante de fermentación 50% de la actividad original fue adsorbida por las pequeñas perlas, pero menos del 10% de la adsorbida permanece activa. Aproximadamente el 75% de la actividad de la enzima purificada es adsorbida por el soporte poroso de diámetro mayor pero sólo 5% de ella muestra actividad en la forma inmovilizada (41).

La enzima purificada también se ha inmovilizado en alquilamina sílica activada con glutaraldehído variando las condiciones de enlace (41). Los resultados se encuentran en la tabla siguiente:

#### Inmovilización de dextransacarasa en sílica porosa.

pH de enlace.	tiempo de exposición.	Vol. de enz/peso seco de soporte.	Act. inic. de la Sol. enzimática	Desaparición de actividad de la solución	Actividad recuperada en el sop.	Actividad inmovilizada.
	(h)	(ml/ g)	(U/ml)	(%)	(%)	(%)
5.2	2	1.5	2.23	59.6	19.6	0.39
5.2	2	1.5	2.05	45.9	15.6	0.22
5.2	2	2	2.23	47.5	16.5	0.35
5.2	2.2	1.5	2.44	67.5	16.9	0.42
5.2	3.5	1.5	2.13	46.9	14.9	0.22
5.2	24	2	2.33	77.9	14.1	0.51
5.2	24	2	0.76	72.7	15.1	0.17
6.0	2	2	2.23	76.7	10.2	0.35
7.0	2	2	2.23	88.8	6.0	0.24
7.0	2.2	2	2.44	90.6	4.2	0.19

a Lote de tubos 22-35 Todas las otras soluciones son del lote de tubos de 16-21.

También se ha inmovilizado dextransacarasa purificada por dos métodos diferentes:

- 1) fraccionamiento con etanol.
- 2) ultrafiltración y cromatografía sobre gel.

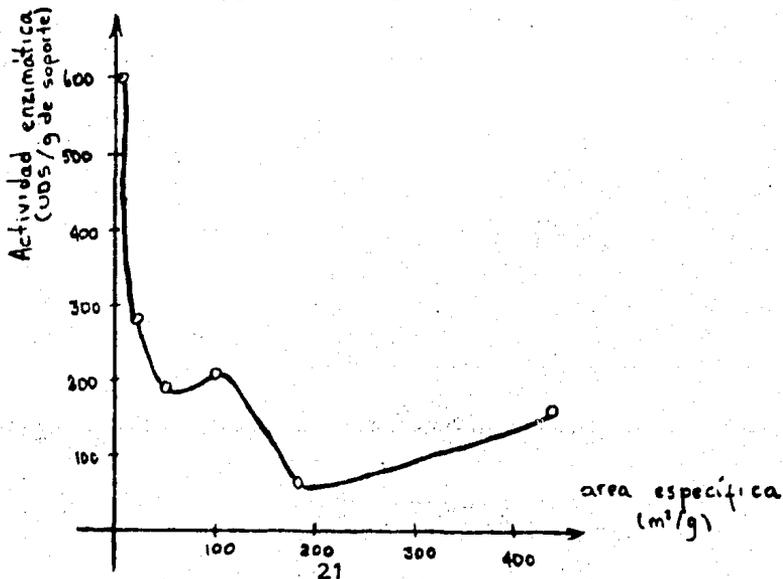
en sílice (Sphérosil Rhône Poulenc) de área específica variable, activada con solución de glutaraldehído al 2% (53). Los resultados obtenidos son:

#### Inmovilización de dextransacarasa sobre sílice porosa

- 1) Solución de enzima purificada por fraccionamiento con etanol:

Área específica de la sílice ( $m^2 g^{-1}$ )	Actividad enzimática (UDS/g de sílice)	
	Experiencia 1	Experiencia 2
6	480	124
24	214	215
50	218	55
122	250	127
179	156	120
445	114	114

- 2) Solución de enzima purificada por ultrafiltración y cromatografía sobre gel.



Se puede observar que una area específica baja es óptima para la inmovilización de la enzima.

Se ha estudiado la influencia en la inmovilización de dextranasa, de la cantidad de enzima puesta en contacto con el soporte (49). Los resultados se encuentran en la siguiente tabla:

Influencia de la cantidad de enzima puesta en contacto con el soporte sobre la inmovilización de la dextranasa

Area específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Cantidad de sílica (mg)	Actividad total puesta en contacto con la sílica. (UDS)	Actividad enzimática (UDS/g sílica)
6	100	200	90
6	100	1950	605
24	100	200	170
24	100	1950	287

Por otra parte se ha demostrado que la presencia de maltosa durante el acoplamiento enzima-soporte disminuye el efecto estérico provocado por las grandes cadenas de dextranas ligadas en los sitios activos de la enzima y así aumenta la cantidad de enzima fijada (49). Los resultados se encuentran en la tabla siguiente:

Influencia de la maltosa sobre la inmovilización de dextranasa.

Area específica de la sílica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Cantidad de sílica. (mg)	Actividad enzimática. (UDS/g de sílica)
6	100	605
6	100 <sup>a</sup>	830
24	100	287
24	100 <sup>a</sup>	634
6	200 <sup>a</sup>	446
6	200	495
24	200	477
24	200 <sup>a</sup>	486

Condiciones de inmovilización: 15 ml. de solución de enzima con una actividad de 130 UDS/ml, actividad específica 1340 UDS/mg de proteína puesta en contacto con el soporte .

<sup>a</sup>Se añadieron 200 mg. de maltosa a la solución de dextranasa durante la inmovilización.

La dextranasa también se ha inmovilizado sobre partículas de olote molido con un diámetro promedio de 180 micrones, activadas con solución de glutaraldehído al 2% (53). Los resultados se encuentran en la siguiente tabla:

Inmovilización de la dextranasa sobre partículas de olote molido.

Cantidad de soporte (mg)	Actividad total puesta en contacto con el sop. (UDS)	Actividad enzimática. (UDS/g de soporte)
133	258	227.6
145	258	226.2
232	534	186.0

## MATERIALES Y METODOS.

### Bacteria empleada

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F cepa perteneciente al Departamento de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado, mantenida en forma liofilizada en ampolletas de 5ml.

### Medio de cultivo

Se cultiva al microorganismo en un medio con la siguiente composición:

2% de  $K_2HPO_4$

2% de sacarosa (grado reactivo)

1% de extracto de levadura

0.02% de  $MgSO_4$

0.001% de  $FeSO_4$

0.001% de NaCl

0.001% de  $MnSO_4$

al cual se le ajusta el pH a 7 empleando ácido ortofosfórico.

### Obtención de la enzima

Para la obtención de la dextransacarasa se utilizan 3 l de medio de cultivo estéril en un fermentador de 5 l de capacidad, una temperatura de  $26^{\circ}C$ , una aereación de 0.1 vvm y un pH inicial de 7 aproximadamente.

Se emplea como inóculo un volumen de aproximadamente 8%, de un cultivo del microorganismo de 18 horas, resultante de la reactivación del cultivo liofilizado contenido en una ampolleta.

Dado que durante la fermentación se producen: etanol, ácido acético, ácido láctico, el pH es un buen criterio para "seguir" su desarrollo.

Debido a que la producción de dextran sacarasa depende de la suplementación de sacarosa, la competencia entre el microorganismo y la enzima extracelular, por el sustrato común sacarosa, representa una ineficiencia en el sistema de producción, (49). Por ello también se llevó a cabo para la obtención de enzima una fermentación en la cual se mantuvo una adición continua de sacarosa ( $20 \text{ gl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ya empleada antes (54).

#### Aislamiento de la enzima

Puesto que la enzima es extracelular puede ser recuperada fácilmente en forma libre de células por centrifugación o filtración. Así al cultivo del microorganismo obtenido se le ajusta el pH a 5 (pH de máxima estabilidad de la enzima) y se centrifuga a 3200 rpm durante 45 minutos a una temperatura promedio de  $7^{\circ} \text{C}$ .

Al sobrenadante obtenido de ésta manera se le agrega  $\text{CaCl}_2$  (0.05%  $\text{Ca}^{++}$ ), pues se ha comprobado que estabiliza la enzima soluble, se mantiene en refrigeración, además de que se le añade 0.03% de azida de sodio.

#### Actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática está basada en la medida de azúcares reductores libres. La medición de fructosa liberada bajo condiciones que proporcionan una reacción de orden cero, es la base para la estimación de la actividad de la dextran sacarasa. El método que se usa para la determinación de azúcares reductores libres, producidos a diferentes intervalos de tiempo, es el de ácido dinitro salicílico (DNS) (84) que consiste en su reducción en solución alcalina y la medición espectrofotométrica a 540 nm del producto de reacción, probablemente ácido nitroamino salicílico (56).

Para llevar a cabo ésta determinación de actividad se utiliza una mezcla de 2 ml de solución de sacarosa al 60% y 10 ml del sobrenadante de fermentación pH 5 (solución enzimática).

En éste trabajo se informa en unidades de dextransacarasa (UDS). Una UDS se define como la cantidad de enzima que puede convertir 1 mg de sacarosa a dextranas en una hora liberando 0.52 mg de fructosa bajo condiciones específicas (39)  $T = 30^{\circ} \text{C}$  pH 5.

La actividad de la dextransacarasa puede ser estimada también notando la velocidad de aparición de opalescencia, actividad serológica, material precipitable por alcohol y otras propiedades de las dextranas mismas (26).

#### Purificación de la enzima.

La purificación de la enzima se lleva a cabo filtrando a través de una columna de Pharmacia enchaquetada de 2.6 x 100 cm empacada con gel de agarosa (Bio-Gel A-5m de Bio Rad Laboratories) la cual ha sido equilibrada previamente con solución reguladora de citratos pH5 y eluyendo con la misma solución. Debido a que la enzima fácilmente forma agregados se encuentra principalmente cerca del volumen muerto; la temperatura que se mantiene para llevar a cabo la purificación es de  $4^{\circ} \text{C}$ . Las porciones de solución enzimática pura se mezclan y se mantienen en refrigeración hasta su inmovilización.

#### Inmovilización de la enzima.

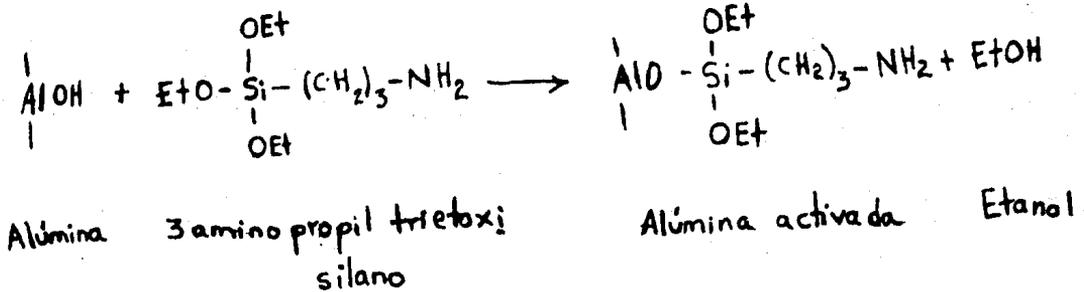
Para la inmovilización de la enzima se investigó un soporte a base de alúmina. Los soportes utilizados fueron:

Alúmina sin activar  $A_0$  con una area superficial de  $7.5 \text{ m}^2/\text{g}$ ; alúmina activada  $A_{25}$  durante 30 minutos con una velocidad de calentamiento de  $5^{\circ} \text{C}$  por minuto a una temperatura de  $250^{\circ} \text{C}$  con una area superficial de  $33 \text{ m}^2/\text{g}$  y alúmina activada durante 30 minutos con una velocidad de calentamiento de

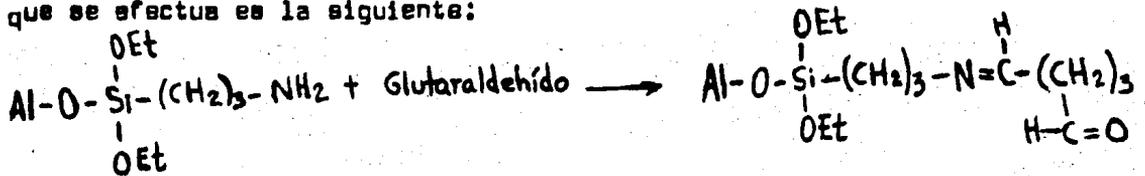
5° C por minuto a una temperatura de 450° C y una area superficial de 245m<sup>2</sup>/g.

Activación del soporte.

El proceso de activación del soporte se lleva a cabo mediante un método similar al reportado para vidrio y sílice (98). Consiste en una reacción de silanización orgánica:



para lo cual el soporte se trata con HNO<sub>3</sub> al 5 % a una temperatura entre (80-90)° C durante una hora despues de la cual se lava con agua destilada, enseguida se trata con 3 amino propil trietoxisilano el 10% (v/v) en tolueno (50 ml por g de soporte), se deja en reflujo durante toda la noche, finalmente se hidrata con la mínima cantidad de agua destilada ( 1 gota) y se lleva a cabo un acoplamiento con solución de glutaraldehído al 5% en solución reguladora de fosfatos a pH 8.6 durante 4 horas a temperatura ambiente, mezclando continuamente. La reacción que se efectua es la siguiente:



finalmente se decanta y se lava 3 veces empleando:

- 1) solución reguladora de citratos pH 5
- 2) solución de NaCl 1M
- 3) nuevamente solución reguladora de citratos pH 5

Para la reacción de inmovilización se utilizan: 100 mg. de soporte (no activado y activado), 15 ml. de solución de enzima pura, - 100 mg. de maltosa; se colocan en tubos de ensayo de (16 X 150) mm, con tapón de rosca, los cuales se mantienen mezclando durante aproximadamente 15 horas a una temperatura de 4<sup>o</sup> C. Después de transcurrido éste tiempo, se decanta y se retira la solución enzimática -- sobrenadante y se efectuen nuevamente los tres lavados con solución reguladora de citratos pH 5 y solución de NaCl 1M en el orden mencionado. Una vez que se ha lavado se lleva a cabo la determinación de actividad enzimática empleando el mismo método que para la enzima soluble se utilizan 2 ml. de solución de sacarosa al 60%, 10ml. de solución reguladora de citratos pH 5, 100 mg. de soporte activado + enzima; se emplea un mezclador giratorio de tubos y se decanta el soporte unos segundos antes de la toma de muestra. Ésta determinación se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Se lleva a cabo también la determinación de la cinética enzimática variando la concentración de sacarosa de 0.25% a 10 %.

Los valores de  $K_m$  y  $v_{max}$  se obtienen por las ecuaciones de -- Michaelis- Menten, Lineweaver - Burk y Eadie - Hofstee.

## RESULTADOS

En la producción de enzima se utilizó tanto el método tradicional (88) como el de la fermentación semicontinua (54), obteniéndose actividades enzimáticas promedio de 40 y 120 UDS/ml. respectivamente.

Los rendimientos de purificación fueron cercanos al 100 % y con una dilución mínima de la enzima.

Se realizó una caracterización de la enzima libre determinándose:

-El efecto del ión  $\text{Ca}^{++}$  en la vida de almacen de una solución de enzima mantenida a  $4^{\circ}\text{C}$  y a  $30^{\circ}\text{C}$ , en presencia y en ausencia de  $\text{CaCl}_2$  ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ) (Fig. 1 y Fig. 2)

-El efecto en la velocidad de reacción de la temperatura en el intervalo de  $5$  a  $30^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3)

-El efecto en la velocidad de reacción de la concentración de sustrato, sacarosa, empleando concentraciones comprendidas en el intervalo de  $0.25$  a  $10\%$  (Tabla II y Fig. 4)

El efecto en la velocidad de reacción de la concentración de maltosa, en un intervalo de concentraciones comprendido entre  $0$  y  $10\%$  (Tabla III y Fig. 5).

Para la inmovilización de la enzima se utilizó tanto la enzima contenida en el sobrenadante de fermentación libre de células así como la enzima purificada por permeación en gel.

Inicialmente se utilizaron como soporte para la inmovilización de la enzima, resinas de intercambio iónico (Amberlitas  $\text{XAD}_2$ ,  $\text{XAD}_4$ ,  $\text{XAD}_7$ ) pero los resultados obtenidos no fueron aceptables.

Los primeros resultados que permitieron la selección del soporte más adecuado, a base de alúmina silanizada y activada, se encuentran en la Tabla IV.

El efecto de la variación en la relación cantidad de soporte concentración de enzima, en la eficiencia de inmovilización, se muestra en la Tabla V.

El efecto provocado por una hidratación del soporte previa a su activación con solución de glutaraldehído se puede observar en la Tabla VI.

Los resultados obtenidos en la determinación de la cinética enzimática de la enzima inmovilizada se encuentran en la Tabla VII. En la figura 6 se encuentran graficados estos datos y se comparan con el comportamiento de la enzima libre descrito por Michaelis-Menten.

Tabla I

EFEECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE REACCION

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	v (mg Sacarosa/ml h)
5	6.25
10	11.65
18	22.89
30	41.0

\* a pH 5 y T  $30^{\circ}$  C .

TABLA II

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO  
EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOLUBLE \*

[SACAROSA] (M)	v (mg de Sac/ ml h)	1/v	1/S	v/S
0.292	41.36	0.0242	3.42	141.5
0.234	41.0	0.0244	4.275	175.3
0.175	39.28	0.0255	5.7	223.9
0.146	42.44	0.0236	6.84	290.3
0.117	40.27	0.0245	8.55	349.4
0.088	37.87	0.0264	11.4	431.7
0.058	36.87	0.0271	17.1	630.5
0.029	29.24	0.0342	34.2	1000.0
0.015	20.58	0.0486	68.4	1407.7
0.007	14.5	0.0690	136.8	1983.6

\* a pH 5 y T 30° C.

TABLA III

EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MALTOSA EN LA VELOCIDAD DE REACCION OBSERVADA DE LA DEXTRANSACARASA.

v	MALTOSA
(mg de Sac/ ml h)	(%)
35.28 **	0
43.8 **	0.1
45.7 **	0.5
50.64 - 53.07	1.0
86.85 - 107.11	5.0
116.51	7.5
74.6 - 80.09	10.0

\* Se utilizaron 10 ml de solución enzimática con 33.29 y 37.3 UDS/ ml de actividad respectivamente.

\*\* promedio.

TABLA IV

INFLUENCIA DEL AREA ESPECIFICA DEL ALUMINA ACTIVADA  
EN LA INMOVILIZACION DE LA ERZIMA DEXTRANSACARASA.

Soporte	Area esp. (m <sup>2</sup> /g)	Soporte (mg)	Act. ofrecida*		Act. observada/g soporte		Rendimiento	
			(UDS)		(UDS)		(%)	
			a	b	a	b	a	b
Alúmina	7.5	200	285.8	487.7	88.1	141.76	6.29	6.61
Alúmina	33.0	200	285.8	487.7	93.32	156.3	6.66	7.29
Alúmina	245.0	200	285.8	487.7	84.36	158.37	6.02	7.38
Sílice**	6.0	200				415		4.25

\* Se utilizaron 10 y 15 ml de solución enzimática con 28,58 UDS/ml de actividad respectivamente.

\*\* López Munguía C. A. y Monsan P. (52)

TABLA V.

INFLUENCIA DE LA RELACION CANTIDAD DE SOPORTE/CONCENTRACION DE ENZIMA  
EN LA EFICIENCIA DE INMOVILIZACION DE LA ENZIMA DEXTRANSACARASA.

Soporte (mg)	Act. ofrecida * (UDS)	<u>Act. observada</u> g soporte (UDS)	Rendimiento. (%)
100	232.3	56.41	2.43
200	232.3	148.0	12.7
500	232.3	86.13	18.0
1000	232.3	11.78	5.07

\* Se utilizaron 10 ml de solución enzimática con 23.23 UDS/ml de act.

TABLA VI

INFLUENCIA DE LA HIDRATACION PREVIA DEL SOPORTE EN  
LA INMOVILIZACION DE LA ENZIMA DEXTRANSACCHARASA.

Características	Act. ofrecida (UDS)	Act. observada/g (UDS)	Rendimiento (%)
Alúmina (200mg) sin hidratar	152	17.4	2.28
Alúmina (200mg) hidratada 10h	152	59.5	7.8
Alúmina (200mg) hidratada 56h	152	149.7	19.6

• se utilizaron 10 ml de solución enzimática con 15.24 UDS/ml de actividad.

TABLA VII

ESTUDIO CINETICO DE LA ENZIMA DEXTRANSA  
 CARASA INMOVILIZADA EN ALUMINA ACTIVADA.

[Sacarose] (M)	v (mg Sac/h g) soporte.	1/S	1/v	1/S
0.292	127.42	3.425	0.0078	434.93
0.2046	93.98	4.887	0.010	459.33
0.146	114.50	6.849	0.0087	784.24
0.0877	82.15	11.402	0.012	936.7
0.029	65.23	34.48	0.015	2249.3
0.007	30.90	142.85	0.032	4414.28

• complejo enzima-soporte resultante de poner en contacto: 10 ml de solución enzimática con 52.9 UDS/ml y 200 mg de alúmina silanizada y activada.

38

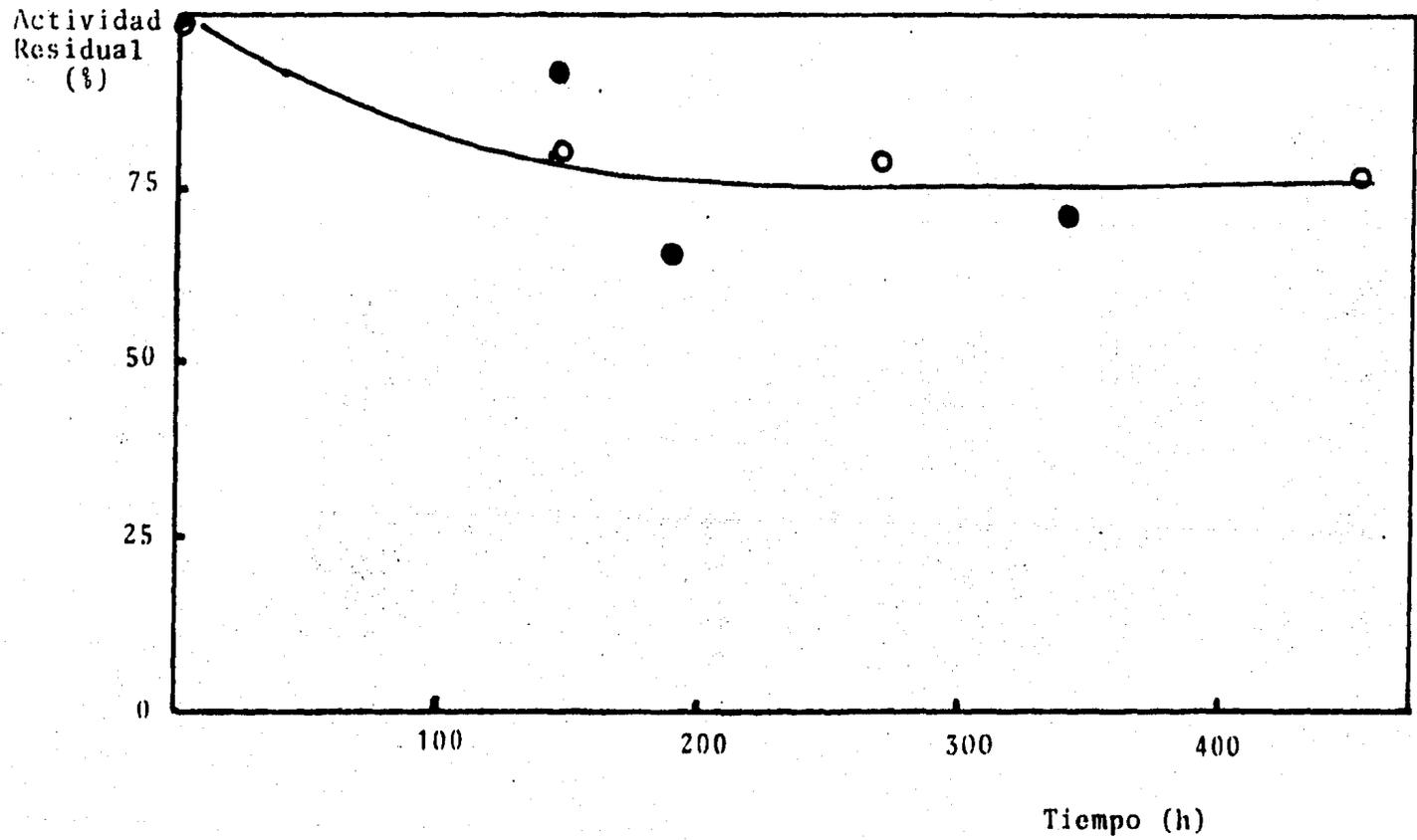


FIG. 1

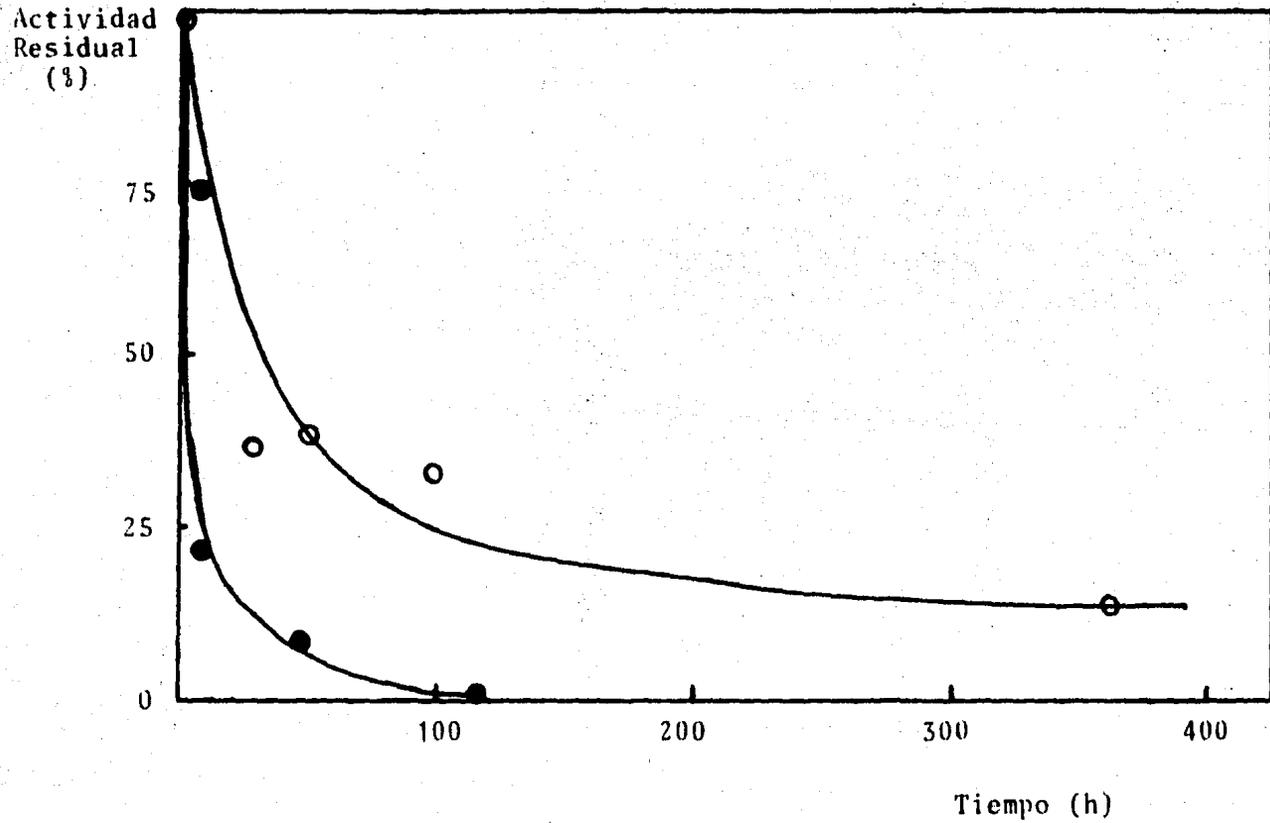


FIG. 2.

07

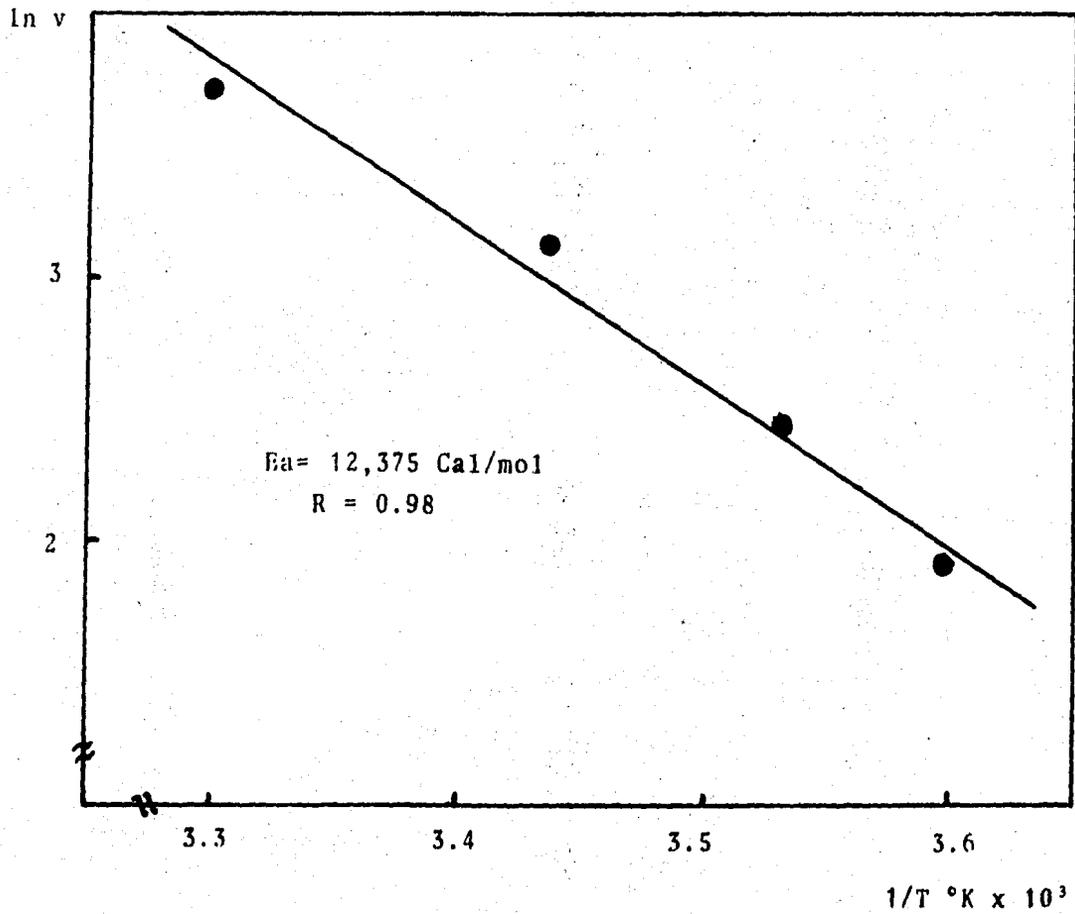


FIG. 3

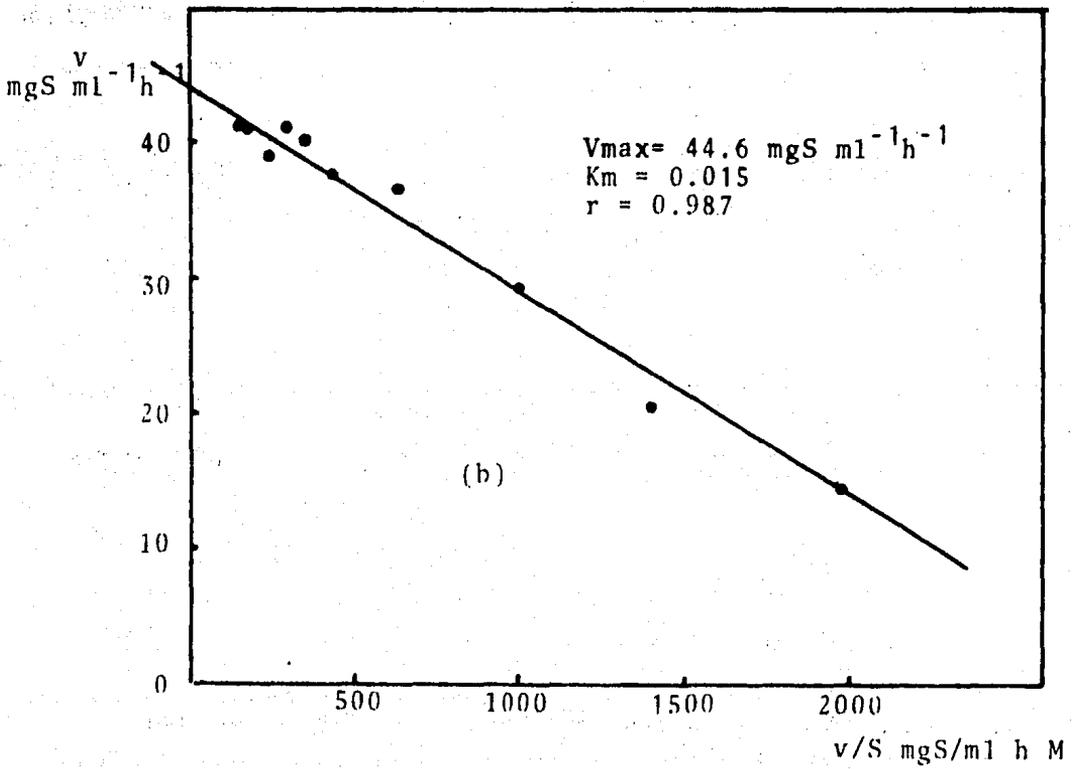
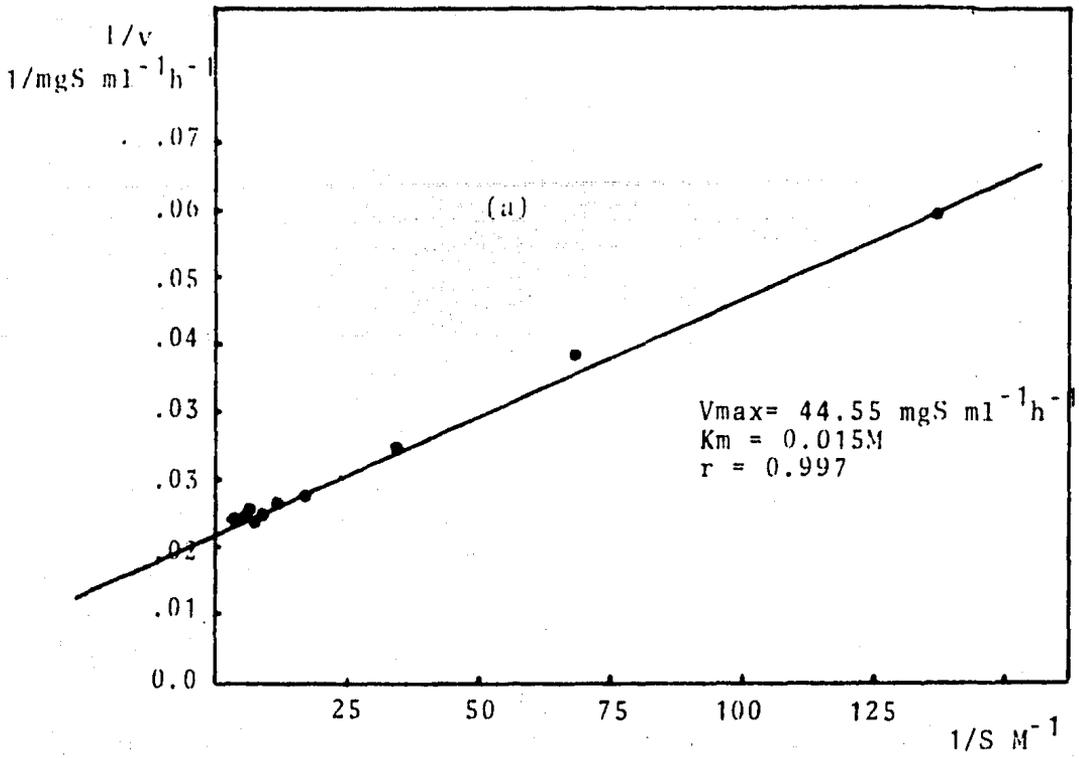


FIG. 4

42

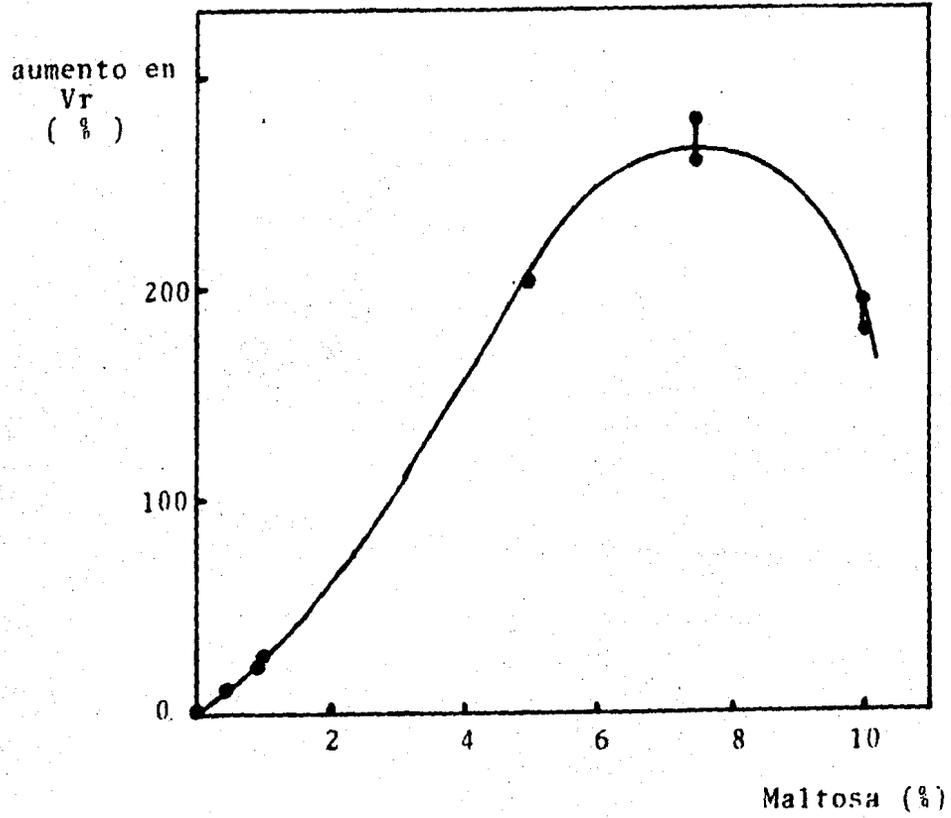


FIG. 5

43

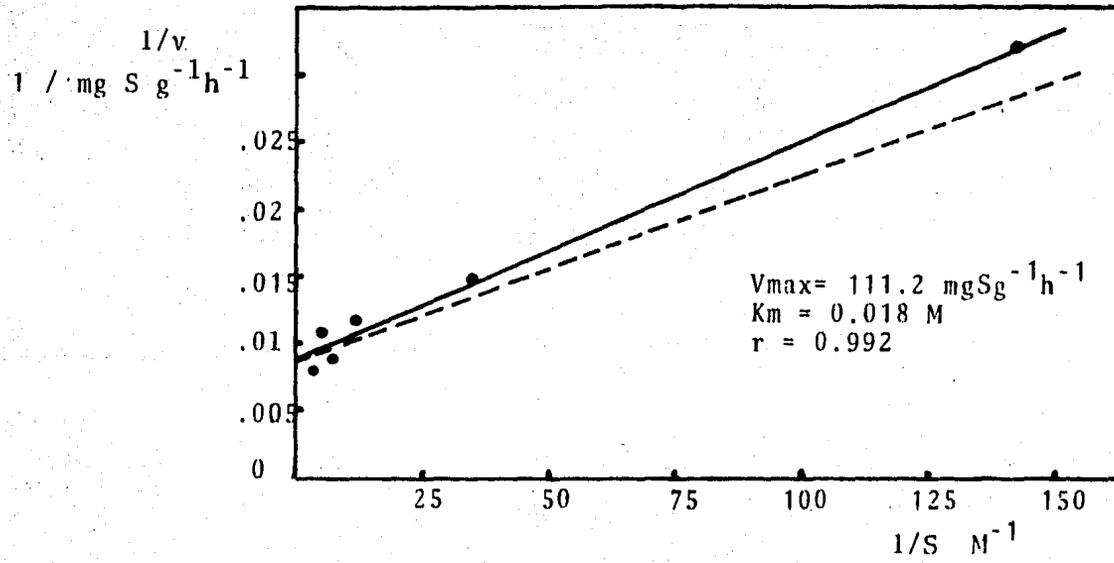


FIG. 6

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Caracterización de la enzima libre.

Efecto del ión  $\text{Ca}^{++}$

El efecto estabilizador de los iones  $\text{Ca}^{++}$  no resulta evidente en la solución enzimática almacenada a  $4^{\circ}$  pero si la solución enzimática se almacena a  $30^{\circ}$  C la pérdida de actividad es drástica y el calcio retarda la pérdida total de actividad.

Efectos en la velocidad de reacción

a) Efecto de la temperatura

De la representación gráfica de la ecuación de Arrhenius (Fig.3) se desprende un valor de  $12.4 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$  para la energía de activación de la enzima libre; éste resultado es superior al publicado por Keboli (41) de  $8.6 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$  aunque se trabajó un intervalo de temperaturas más reducidas.

b) Efecto de la concentración de sustrato.

En las representaciones de Lineweaver-Burk y Eadie Hofstee (Fig. 4) se observa un valor de  $K_m=0.015$  M que concuerda con lo informado en las diferentes publicaciones.

c) Efecto de la concentración de maltosa.

Se observa que el efecto es máximo aproximadamente 7.5% de maltosa hasta el cual el aumento en la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de maltosa.

Inmovilización de la enzima

Los resultados obtenidos con los soportes a base de alúmina silicada y activada (Tabla IV) pueden compararse con los obtenidos para sílice aminada (53). Los rendimientos son ligeramente superiores y se observa que la actividad específica del soporte puede incrementarse

aumentando la concentración de enzima de la solución que se pone en contacto; sin embargo, el porcentaje de enzima inmovilizada y activa no mejora sino por el contrario el rendimiento disminuye.

Puede observarse (Tabla V) que el hecho de contar con una alta actividad por gramo de soporte, no da una idea clara sobre la eficiencia del proceso de inmovilización. La eficiencia mas alta (18%) no corresponde a la actividad por gramo de soporte mas alta (148 UDS/g).

Se observa (Tabla VI) que la hidratación previa del soporte tiene un efecto positivo en la eficiencia del proceso de su activación.

Al comparar los resultados de la cinética enzimática de la enzima inmovilizada (Fig.6) con los de la cinética de la enzima libre, se observa que el  $K_m$  prácticamente permanece constante y la variación con respecto al comportamiento de la enzima libre es pequeña. Esto permite afirmar que para las condiciones de reacción utilizadas, los efectos difusionales son despreciables y la cinética enzimática controla el proceso.

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un soporte a base de alúmina silanizada y activada con glutaraldehído.

El acoplamiento de la dextranacarasa con la alúmina silanizada y activado con glutaraldehído da un derivado altamente activo cuando se utiliza un soporte de área específica baja. Esto puede ser atribuido a:

- 1) La ausencia de cualquier efecto estérico a nivel de la enzima.
- b) La menor limitación de difusión interna.

La eficiencia de inmovilización se incrementó en un 250% por la adición de maltosa durante la reacción de acoplamiento enzima-soporte debido a la liberación de las dextranas de los complejos enzima-dextranas.

La aplicación de la dextranacarasa unida por enlace covalente a alúmina silanizada y activada para la síntesis continua de dextranas parece ser más adecuada para la producción de dextranas de bajo peso molecular, si consideramos la alta viscosidad de las soluciones de dextranas de alto peso molecular.

La baja estabilidad de la enzima no parece mejorarse con los tratamientos de inmovilización siendo hasta ahora una de las limitaciones más importantes para el uso de la enzima en sistemas continuos.

## RECOMENDACIONES

Determinar la estabilidad de la enzima inmovilizada en alúmina silicada y activada con glutaraldehído para conocer la posibilidad de ser utilizada en un proceso continuo de producción de dextranas.

Hacer las consideraciones económicas necesarias para evaluar la adaptabilidad de la reacción a proceso de gran escala.

Investigar la posibilidad de utilizar las dextranas producidas por la enzima inmovilizada como estabilizante en alimentos dietéticos.

Emplear otros soportes para tratar de inmovilizar con mayor eficiencia la dextransecarasa de Leuconostoc mesenteroides NRRL 8-512F.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Baken J.A. (1966) Methyl cellulose-dextran microcapsules. Patente francesa No. 1.453.745
- 2.- Barker, S.A.; Bourne E.J. (1953), Enzymic synthesis of polysaccharides. Quarterly reviews. London Vol 7 pp 56-83
- 3.- Barker, Bourne, James, Stacey (1955) Immuno polysaccharides Part. V. Structure of a modified Betacoccus arabinosaceus Dextran. Journal of the Chemical Society: pp.2096-2099
- 4.- Bixler, G.H.; Hines, G.E.; Mc Ghee, R.M.; Shurther, R.A. (1953) A staff industry collaborative report ... Industrial and engineering chemistry Vol. 45 (4) pp 692-705
- 5.- Bovey, F.A.; (1959) Enzymatic polymerization. I molecular weight and branching during the formation of dextran J. Polym Sc. pp.138-204.
- 6.- Boyer P.D. Lardy H, Myrbäck K. (1962) Enzymes catalyzing glucosyl transfer from sucrose. Dextran sucrose. The enzymes Second edition Volume 6 Academic Press pp. 285-287.
- 7.- Braswell E.; Goodman, A.; Stern, K.G.; (1962) Studies on the - - - enzymatic Synthesis of dextran Part II. J. Polym Sci 61 pp.143-154
- 8.- Breed, R.S.; Murray E.G.D.; Hitchens A.P. (1948), Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams Wilkins Company, - - Baltimore M.d.
- 9.- Callahan M.F.; William M.P.; Heitz J.R. (1976), Anal. Biochem. 70 - pp.542-546
- 10.- Carruthers A.; Cooper E.A. (1936), Enzyme formation and polysaccharides synthesis by bacteria II Biochemical Journal. Vol. 30 pp.1001-1009
- 11.- Chen Y.E.; Kaboli H. (1976) En project. 1045 Eng. Res. Inst. Iowa - - State University Ames Iowa Final report pp.136-162.
- 12.- Chen Y.E.; Reilly P.J. (1976), Iowa State University Resultados - - no publicados.
- 13.- Chludzinski A.M.; Germaine G.R.; Schachtele C.F. (1976), J. Dent. Res. 55 c75 c86

- 14.- Ebert K. H.; Shenk G. ( 1962), " Fermentopolymerization III - -  
Reindarstellung und charakterisierung von Dextranaccharase --  
aus Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512 F." Z.Naturforschg.--  
17 b pp. 732-738.
- 15.- Ebert K.H.; Grosche I. (1967), "Origin of branches in native -  
dextran", Biopolymere 5, pp. 423-430.
- 16.- Ebert K.H.; Schenk G. (1968), "Mechanisms of biopolymer growth:  
The formation of dextran and levan", Adv. in Enz.; Vol.30, pp.179.
- 17.- Edwards C.R.; Drew S.W. (1971), Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. - -  
Microbiol. 77, pp.251
- 18.- Epton R.; Thomas T.H. (1971), "An Introduction to water insoluble  
enzymes" (Koch- Light. Laboratories Ltd.; Coln brook Bucks., -  
England.)
- 19.- Figures W.R.; Edwards J.R. (1876), "Carbohydrate Research, Vol.  
48, pp.245
- 20.- Genghof D.S.; Hehre E.J. (1972), "De novo glycosidic linkage-  
synthesis by glucosylases:  $\alpha$ D - glucosyl fluoride polymerization  
by dextranucrase" (36662), Proc. Soc. Expt.Biol.Med., Vol.140,  
pp.1298-1301.
- 21.- Goldstein I.J.; Hollerman C.E.; Merrick J.M. (1965), Biochim. -  
Biophys. Acta 97, pp. 68-73
- 22.- Goodman A.; Weill R.M.; Stern K.G. (1955), "On the mechanism -  
of dextran formation", Journal of Biochemical Chemistry, Vol. -  
217, pp. 977-985.
- 23.- Gronwall A.; Ingelman B. (1945), "Dextran as a substitute for -  
plasma" Nature p. 45
- 24.- Hammond R.B.; Gutfreund H. (1955), Biochem.J.; Vol.61, pp.187.
- 25.- Hehre E.J. (1941), "Production from sucrose of a serologically  
reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract". Science  
Vol. 93, pp. 237-238.
- 26.- Hehre E.J. (1946), "Studies on the enzymatic synthesis of dextran  
from sucrose", J. Biol. Chem., Vol. 163, pp. 221-233.
- 27.- Hehre E.J. (1951), " Dextranucrase", Advances in enzymology, -  
vol. XI, Interscience Publishers, INC. pp. 308-312.
- 28.- Hehre E.J. (1953), "Low molecular weight dextran as a modifier  
of dextran synthesis", Journal of the American Chemical Society,  
Vol. 75, p. 4866.

- 29.- Hehre E.J. (1955), " Polyaaccharide synthesis from disaccharides",  
Methods in enzymology, Vol. I, Chapter 21, Colowick S.P.; Kaplan -  
N.O.; Academic Press, New York. pp. 178-184.
- 30.- Hehre E.J.; Suzuki H. (1966), "New reactions of dextranucrase: -  
 $\alpha$ - D - glucosyl transfers to and from the anomeric sites of - -  
lactulose and fructose", Archives of Biochemistry and Biophysics,-  
113,pp. 675-683.
- 31.- Hellman N.N.; Tsuchiya H.M.; Rogovin S.P.; Lamberts B.L.; Tobin R.  
Glass C.A.; Stringer C.S.; Jackson R.W.; Senti F.R. (1955), - - -  
"Controlled enzymatic synthesis of dextran. Conditions for produ -  
cing clinically suitable molecular weight", Industrial and - - -  
Engineering Chemistry, Vol. 47, No 8, pp.1593-1598.
- 32.- Hestrin S. (1944), Nature, 154 pp. 581
- 33.- Hestrin S.; Shapiro-Avineiri S. (1944), "The mechanism of poly - -  
saccharide production from sucrose", Biochem J., 38 (2) pp. 2-10
- 34.- Hestrin S. (1962), " Dextran", The Bacteria, Vol.III, Biosynthesis,  
Gunsalus I.C.; Stainer R.Y., Academic Press. pp.374-378.
- 35.- Hucker G.J.; Pederson C.S. (1930), N.Y. State Agr. Expt. Sta (Geneva  
N.Y.) Tech. Bull 167 3
- 36.- Itaya K.; Yamamoto T. (1975), "Dextranucrase as an enzyme - - -  
associating with alkaline earth metal ions", Agr. Biol. Chem., 39  
(6) pp. 1187-1192
- 37.- Jeanes A.; Wilham C.A.; Miers J.C. (1948), " Preparation and - -  
characterization of dextran from Leuconostoc mesenteroides". - -  
Journal of Biological Chemistry, Vol. 176, pp. 603-615
- 38.- Jeanes A.; Wilham C.A. (1950), "Periodate oxidation of dextran" -  
Journal of the American Chemical Society, Vol. 72, pp.2655-2657.
- 39.- Jeanes A. (1965), "Dextran", Methods in Carbohydrate Chemistry,  
Vol. 5., Ed. Whistler R.L., Academic Press., New York.pp.118-132.

- 40.- Jeanes A. (1966), "Dextran", Encyclopedia of Polymer Science and technology, Volume 4, Editorial Board, Interscience Publishers a division of John Wiley and Sons, INC. pp. 805-823
- 41.- Kaboli H.; Reilly P.J. (1980), "Immobilization and properties of Leuconostoc mesenteroides dextransucrase", Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXII. pp. 1055-1069
- 42.- Kobayashi M.; Matsuda K. (1974), "The dextransucrase isoenzymes of Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299", Biochim. Biophys. Acta Vol. 370, pp. 441-449.
- 43.- Kobayashi M.; Matsuda K. (1975). "Purification and characterization of two activities of the intracellular dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299", Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 397, pp. 69-79
- 44.- Kobayashi M.; Matsuda K. (1976), "Purification and properties of extracellular dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299", Journal Biochem. (Tokyo), Vol. 79, pp.1301-1308.
- 45.- Koepsell H. J.; Tsuchiya H.M. (1952), "Enzymatic synthesis of dextran", Journal of Bacteriology, Vol. 63, pp.293-295
- 46.- Koshland D.E. Jr.; Ray W.J.; Erwin M.J. (1958), Federation Proc. 17 pp. 1145
- 47.- Lafar F. ( ), Handbuch der Technischen Mykologie Bd. 1-2 - Jena 1904-7
- 48.- Lerner J.; Gillespie R.E. (1955), Arch. Biochem. Biophys.; Vol. - 58, pp. 252
- 49.- Lawford G.R.; Kligerman A.; Williams T. (1979), "Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of Leuconostoc mesenteroides", Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXI pp. 1121-1131.
- 50.- Levi I.; Hawkins L.; Hibbert H. (1942), "Studies on reactions relating to carbohydrate and polysaccharides. LXVI Structure of -

the dextran synthesized by the action of Leuconostoc mesenteroides on sucrose", Journal of the American Chemical Society, Vol.64, - - pp. 1959- 1962.

- 51.- Liesenberg C.; Zopf W. (1892), Centr. Bakt. Parasitenk 12:659-661.
- 52.- Lindberg B.; Svensson S. (1968), "Structural studies on dextran - from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512", Acta Chemica Scandinavica, Vol. 22, No. 6 pp. 1907-1912.
- 53.- López Munguía C.A. (1979), "Production, purification et immobilisation de la dextrane-saccharase de Leuconostoc mesenteroides", Tesis Doctoral, INSA Toulouse, Francia.
- 54.- López Munguía C.A.; Monsan P. (1980), "Dextran synthesis by - - - immobilized dextranase", Biochimie, Vol.62, pp.323-329.
- 55.- Messing R.A. (1975), "Immobilized enzymes for industrial reactors", Academic Press., New York, U.S.A.
- 56.- Meyer K.H.; Noeltling G.; Bernfeld P. (1948), "Détermination du poids moléculaire de polysaccharides naturels par dosage colorimétrique" Helvetica Chimica Acta, Volumen XXXI, pp.103-105
- 57.- Michal G. (1974), "Determination of Michaelis constant and inhibitor constants", Methods of enzymatic analysis, Second english edition, Ed. Hans Ulrich Bergmeyer, Karlfried Gawehn, Vol. 1, Academic Press., pp.143-156.
- 58.- Microbial classification (1962), Twelfth symposium of the society for general microbiology held at the Royal Institution London, - published by society of general microbiology, University Press.
- 59.- Minger F.R.; Bennett W.R. (1960), "Purifying caustic soda solutions" Patente americana No. 2.958.585.
- 60.- Monsan P.; López Munguía C.A. (1981). "On the production of - - - dextran by free and immobilized dextranase", Biotechnology and Bioengineering, Vol.XXIII pp.2027-2037

- 61.- Nadel H.; Randless C.I.; Stahly G. L. (1953), Appl. Microbiol. Vol. 1, pp. 217
- 62.- Neely W.B. (1958), Nature, 182 pp.1107
- 63.- Neely W.B. (1958), "Studies on the enzyme dextransucrase I. - The effect of pH on the enzyme activity, Journal of the American Chemical Society, Vol. 80, pp. 2010-2013.
- 64.- Neely W.B. (1959), "Studies on the enzyme dextransucrase IV. - Altering the substrate specificity pattern of the enzyme", -- Journal of the American Chemical Society, Vol.81 pp.4416-4418.
- 65.- Neely W.B.; Hallmark J. (1961), "Dextransucrase V and the role of metal ions in enzyme catalysis", Nature Vol. 191 pp.385-386
- 66.- Neely W.B.; Nott J. (1962), "Dextransucrase, an induced enzyme from Leuconostoc mesenteroides", Biochemistry Vol.1, N<sup>o</sup>. 6, -- pp.1136-1140.
- 67.- Neely W.B. (1960), "Dextran: structure and synthesis", Advances in Carbohydrate Chemistry, Volume XV, Academic Press, INC., - New York- London, pp. 341-369.
- 68.- Ogino S. (1970), "Formation of the fructose-rich polymer by - water insoluble dextransucrase and presence of a glycogen - - value- lowering factor", Agr. Biol Chem., Vol. 34, N<sup>o</sup> 8, pp.- 1268-1271.
- 69.- Owen W. (1959), "Production of mud laden drilling fluids", -- Patente americana N<sup>o</sup> 2.868.725.
- 70.- Prescott, S.C.; Dunn C.G. (1959), "Dextrans", Industrial - - Microbiology Third edition, Mc Graw Hill Book Company, INC. - pp. 370-392.
- 71.- Robyt J.F.; Kimble B.K.; Walseth T.F. (1974), "The mechanism- of dextransucrase action", Archives of Biochemistry and - - - Biophysics, Vol. 165, pp. 634-640.

- 72.- Robyt J.F.; Taniguchi H. (1976), "The mechanism of dextranucrase action", Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.174, pp.129 - 135.
- 73.- Robyt J.F.; Walseth T.F. (1978), "The mechanism of acceptor - -- reactions of Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F dextranucrase", Carbohydrate Research, Vol. 61. pp. 433-445.
- 74.- Robyt J.F.; Walseth T.F. (1976), "Production, purification and -- properties of dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F", Carbohydrate Research, Vol. 68, pp.95-111.
- 75.- Scales W.R.; Long L.W.; Edwards J.R. (1975), Carbohydrate Research, Vol. 42, pp.325.
- 76.- Sidebotham R. (1974), "Dextrans", Advances in Carbohydrate - - - Chemistry, Vol. 3D Academic Press., INC, New York pp.371-444.
- 77.- Sloan J. W.; Alexander S.H.; Lohmar R.L.; Wolff I.A.; Rist C.E. - - (1954), "Determination of dextran structure by periodate oxidation techniques", Journal of the American Chemical Society, Vol. 76, - pp. 4429-4441.
- 78.- Smiley K.L.; Strandberg G.W. (1972), "Immobilized enzymes", - -- Advances in applied microbiology, Volume 15, Edited by Perlman -- Academic Press.; pp. 13-38.
- 79.- Smith III N.L.; Lenhoff H.M. (1974), Anal. Biochem. Vol. 61, pp.392
- 80.- So L.L.; Goldstein I.J. (1968), "Protein - carbohydrate interaction XIII. The interaction of concanavalin A with mannans from a - - variety of microorganisms". Journal of Biological Chem. Vol.243 pp. 2003-2010.
- 81.- Stacey M. (1942), "Enzymatic production of bacterial polysaccha - rides" Nature 149 pp. 639

- 82.- Stacey M.; Swift G. (1948), "Structure of the dextran synthesised from sucrose by a new strain of Betacoccus arabinosaceus", - Journal of Chemical Society pp. 1555-1559.
- 83.- Stringer C.S.; Tsuchiya H.M. (1958), "A kinetic study of - - dextranucrase", Journal of the American Chemical Society, Vol. 80, pp. 6620-6625.
- 84.- Sumner J. B. (1921), "Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine". Journal of Biological Chem. Vol. 47 pp. 5-9.
- 85.- Tarr H.L.A.; Hibbert H. (1931), "Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides", Canadian Journal - - Research, Vol. 5, pp. 414-427.
- 86.- Toulmin H.A. (1958), "Thickened fruit composition comprising - carboxymethyl dextran", Patente Americana 2.938.797.
- 87.- Toulmin H.A. (1960), "Citrus Juice concentrates", Patente - americana 2.938.799.
- 88.- Tsuchiya H.M.; Koepsell H.J.; Corman J.; Bryant G.; Bogard -- M.D.; Feger V.H.; Jackson R.W. (1952), "The effect of certain cultural factors on production of dextranucrase by - - - Leuconostoc mesenteroides" Journal of Bacteriology, Vol. 64, pp. 521-526.
- 89.- Tsuchiya H.M.; Hellman N.N.; Koepsell H.J. (1953), "Factors - effecting molecular weight of enzymatically synthesised - -- dextran", Journal of the American Chemical Society, Vol. 75, - pp. 757-758
- 90.- Tsuchiya H.M.; Hellman N.N.; Koepsell H.J. Corman J.; Stringer C.S.; Rogovin S.P.; Bogard M.D.; Bryant G.; Feger V.H.; - -- Hoffman C.A.; Senti F.R.; Jackson R.W. (1955), "Factors -- - effecting molecular weight of enzymatically synthesised - - dextran", Journal of the American Chemical Society, Vol. 77,

pp.2412-2419.

- 91.- Taumuraye V.; Nakamura N.; Kobayashi T. (1976), "Dextranase, and the role of metallic ions in the formation of branch links - in dextran synthesis", Agr. Biol. Chem. Vol.40., N<sup>o</sup> 8, pp.1471 -- 1477.
- 92.- Van Cleve J.W.; Schaefer W.C.; Rist C.E. (1956), "The structure of NRRL B-512 dextran. Methylation studies", Journal of the - - American Chemical Society, Vol. 78, pp.4435-4438.
- 93.- Vieth W.R.; Venkatasubramanian K. (1973), Enzyme engineering - - Part I "The utility of supported enzyme systems", CHEMTECH, - - November pp.677-684.
- 94.- Vieth W.R.; Venkatasubramanian K. (1974), Enzyme engineering - - Part II "Materials for immobilized enzyme reactors", CHEMTECH, - Jan, pp. 47-55.
- 95.- Vieth W.R.; Venkatasubramanian K. (1974), Enzyme engineering - Part III "Properties of immobilized enzymes systems", CHEMTECH, May, pp. 309- 320.
- 96.- Vieth W.R.; Venkatasubramanian K. (1974), Enzyme engineering -- Part IV "Process engineering for immobilized enzyme systems", CHEMTECH, July, pp.434-444.
- 97.- Walseth T.F. (1977), "Production, purification, properties and acceptor reaction mechanism of dextranase from Leuconostoc - mesenteroides NRRL B-512", Tesis Doctoral, Iowa State - - - University, Ames Iowa, U.S.A.
- 98.- Weethall H.H. (1976), "Covalent coupling methods for inorganic-support materials" Methods in Enzymology, Colowick S.P.; Kaplan N.O., Academic Press, New York, Vol. 44, "Immobilized enzymes", pp. 134-148

- 99.- Weil L.; Buchert A.R. (1952), Federation Proc. II pp. 307.
- 100.- Weil L.; Buchert A.R.; Maher J. (1952), Arch. Biochem. Biophys.  
Vol. 40, pp.245.
- 101.- Wilson I.B.; Bergmann F. (1950), "Acetylcholin esterase. VIII.-  
Dissociation constants of the active groups". Journal of - - -  
Biological Chemistry Vol. 126, pp. 683-691, 693-703.