



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



03072
21
2eje.

PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE UN
BIOCATALIZADOR CON ACTIVIDAD
GLUCOSILTRANSFERASA

TESIS DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

DEPARTAMENTO DE BIOINGENIERIA,
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UACP y P - CCH

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

JURADO ASIGNADO AL TEMA

Dr. Agustín López Munguía Canales	Presidente
Dra. Amelia Farrés González-Sarabia	Vocal
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich	Secretario
Dr. Enrique Galindo Fentanes	Suplente
Dr. Eduardo Bárzana García	Suplente

Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos.

Sustentante del tema: Q.F.B. Maricamen Quirasco Baruch

Asesor: Dr. Agustín López Munguía Canales.

A Luis Carlos.

Gracias por el apoyo y la paciencia. Después de todo, el tiempo no se fue tan rápido como hubiéramos esperado, pero valió la pena el esfuerzo.

A mis papás.

Por el apoyo y los ánimos que me han impulsado y motivado durante los últimos 29 años.

Una vez más... gracias Señor.

Agradezco al Dr. Agustín López por la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo, así como por su confianza y amistad.

A mis amigos y compañeros: Mónica, Marisol, Beatriz, Ignacio, Sonia, Angeles, Marina, Alejandra, Ernesto, Miguel. Por los consejos y por haber compartido conmigo los buenos, y los no tan buenos momentos.

Agradezco a Edmundo, Mónica, María Elena y Fernando su colaboración en la parte experimental de este trabajo.

INDICE

Página.

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES	
Dextranas.	7
Estructura de las dextranas.	7
Dextrana de la cepa B-1299.	9
Dextransacarosas.	13
Mecanismo de reacción.	14
Reacciones de aceptor.	16
Dextransacarasa de la cepa B-1299.	19
Reacciones de aceptor.	20
Producción de la dextrana y de la dextransacarasa.	20
Purificación de la dextransacarasa.	22
Dextransacarasa inmovilizada.	22
Aplicaciones de los oligosacáridos de dextrana.	23
MATERIALES Y METODOS	
Conservación de la cepa, medio de cultivo y condiciones de fermentación.	25
Concentración-purificación de la actividad extracelular.	26
Medición de la actividad enzimática.	26
Síntesis de oligosacáridos.	26
Análisis de productos por HPLC.	27
Determinación del perfil de actividad enzimática al pH.	27
Determinación de las constantes cinéticas de la fracción insoluble con actividad dextransacarasa.	27
Reacciones de desproporciónación con la enzima B-1299.	27
Evaluación de estabilidad de las preparaciones enzimáticas al pH.	28
Producción del catalizador.	28
Determinación de densidad del biocatalizador.	29
Determinación de humedad del biocatalizador.	29
Determinación de la fracción vacía del biocatalizador.	29
Determinación de los efectos difusionales internos del biocatalizador.	29

Determinación de la caída de presión en el sistema de lecho empacado.	30
Determinación de la distribución de tiempos de residencia.	31
Preparación del sustrato utilizado en la síntesis de oligosacáridos.	34
Determinación del modelo cinético de la enzima inmovilizada.	34
Determinación de los efectos difusionales externos.	34
Operación del reactor de lecho empacado.	35
Evaluación de la estabilidad operacional.	38

RESULTADOS Y DISCUSION

CARACTERIZACION DE LA ENZIMA

I. Producción de la glucosiltransferasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1299.	37
II. Síntesis de oligosacáridos con la glucosiltransferasa extracelular y asociada a la fracción insoluble de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.	39
III. Estabilidad de las preparaciones enzimáticas al pH.	41
IV. Determinación del perfil de pH de la fracción enzimática insoluble.	45
V. Estudio cinético de la fracción insoluble de la enzima B-1299.	48
VI. Reacciones de desproporción.	50

CARACTERIZACION DEL BIOCATALIZADOR

VII. Inmovilización de la glucosiltransferasa, fracción insoluble.	54
VIII. Efecto difusional interno.	55
IX. Caracterización física del catalizador.	57
X. Modelo cinético de la reacción en lote.	60

CARACTERIZACION DEL REACTOR DE LECHO EMPACADO

XI. Determinación de la caída de presión en el reactor.	67
XII. Determinación de la distribución de tiempos de residencia.	69
XIII. Operación del reactor a diferentes conversiones.	75
XIV. Evaluación del efecto difusional externo.	78
XV. Estabilidad operacional.	82

CONCLUSIONES	85
--------------	----

NOMENCLATURA	87
--------------	----

ANEXO A	89
---------	----

BIBLIOGRAFIA	90
--------------	----

RESUMEN

Las enzimas glucosiltransferasas, en particular las dextranasacarasa producidas por *Leuconostoc mesenteroides*, son de interés debido a que producen polisacáridos conocidos como dextranas. Adicionalmente, estas enzimas se han utilizado en la producción de diversos oligosacáridos con gran potencial de aplicación industrial. Tal es el caso de los oligosacáridos producidos por la dextranasacarasa de cepa NRRL B-1299 de *Leuconostoc mesenteroides*, que por su alto contenido de enlaces α -(1 \rightarrow 2) han encontrado aplicación como complemento en la alimentación animal.

Con la finalidad de establecer un proceso de obtención de estos oligosacáridos de interés, a nivel piloto en el presente trabajo se realizó la caracterización de las glucosiltransferasas producidas por la cepa NRRL B-1299 (actividad extracelular y asociada al paquete celular) en lo que respecta a la estabilidad en función del pH, al comportamiento cinético en presencia de aceptor y al perfil de oligosacáridos producidos.

Se decidió utilizar la enzima inmovilizada, por lo que se elaboró un biocatalizador con la enzima asociada a las células por atrapamiento en gel de alginatos. Se estudió el efecto del tamaño de catalizador sobre la transferencia de masa intrapartícula y se determinaron características físicas del catalizador de importancia en el diseño del reactor, como son la distribución del tamaño de partícula, la densidad y la fracción vacía.

Finalmente, con el interés de establecer un proceso en continuo, se dispuso un reactor de lecho empacado. Se verificó el modelo cinético, el comportamiento de flujo dentro del reactor, los efectos difusionales externos y la estabilidad operacional.

INTRODUCCION

La química de los azúcares en las ciencias biológicas tiene sus cimientos en la notable contribución del químico alemán Emil Fischer en 1891 al comprobar la configuración de la forma aldehídica abierta de la D-(+)-glucosa. Durante la evolución de la bioquímica, la química de carbohidratos fue sinónimo de los grandes descubrimientos de las rutas metabólicas de glicólisis y gluconeogénesis. La presencia de azúcares asociados con proteínas fue reconocida por el año de 1900. Para el año de 1949, la modificación covalente de cadenas de polipéptidos por polímeros de azúcares fue establecida totalmente. No obstante, el foco del interés bioquímico internacional fue capturado primero por las proteínas y luego por los ácidos nucleicos. El estudio de carbohidratos como efectores biológicos o determinantes funcionales de proteínas no se dio sino hasta años recientes, ya que los estudios durante la primera mitad de este siglo se concretaron al metabolismo intermediario y a la química de productos naturales, pues durante mucho tiempo se tuvo la noción de que los glúcidos eran solamente compuestos de reserva energética o de soporte.

Durante los años 60's algunos grupos de bioquímicos hicieron contribuciones importantes en la definición de estructuras de polímeros de carbohidratos, resaltando la importancia funcional y la enorme versatilidad de esta clase de biopolímeros. Las características de los polisacáridos, tales como la capacidad de formar geles, la función como hidrocoloides, las propiedades de dureza o de elasticidad, sus características neutras o altamente cargadas parecían suficientes para justificar su presencia en superficies celulares o en tejidos intersticiales.

Una de las causas por las cuales las investigaciones sobre carbohidratos sufrieron retraso, tiene que ver con los muchos problemas de índole químico que se presentan al tratar con estas sustancias. La manipulación de un determinado grupo hidroxilo de un carbohidrato plantea a menudo serios problemas, dada la similitud en reactividad química de todos los hidroxilos presentes en la molécula. Existe una complicación adicional en el hecho de que las proteínas y ácidos nucleicos forman polímeros lineales, mientras que los polisacáridos suelen estar ramificados. Esta característica aumenta notablemente en número de estructuras posibles y, con ello, las dificultades del estudio de los polisacáridos. Por este razón, el reciente despertar del interés por los carbohidratos va paralelo al desarrollo de métodos analíticos mejorados. Los bioquímicos de la primera mitad del siglo basaban su investigación casi exclusivamente en transformaciones químicas cuidadosamente controladas y en mediciones ópticas (principalmente polarimetría). El advenimiento de la cromatografía en sus diversas formas y de métodos analíticos instrumentales poderosos -espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, espectrometría de infrarrojo y el análisis por difracción de rayos X- así como la disponibilidad de

enzimas que actúan con gran especificidad sobre los carbohidratos, ha resultado en una transformación radical en la capacidad de estudio de la relación estructura-función.

Como consecuencia de la introducción de estas nuevas técnicas, la bioquímica de carbohidratos ha recibido un gran impulso, de tal forma que se ha planteado una nueva disciplina en las ciencias biológicas: la glicobiología. El panorama general del estudio sobre la bioquímica y la biotecnología de carbohidratos comprende aspectos de investigación básica (aislamiento, síntesis y análisis de azúcares) y desarrollo de procesos tecnológicos, ejemplificados en la tabla 1.

Tabla 1. Desarrollos tecnológicos recientes en la glicobiología.

Síntesis de medicamentos (ej. heparinas sintéticas)
Surfactantes (ej. derivados de sacarosa)
Edulcorantes (ej. sucralosa)
Incorporación de azúcares en medicamentos como señales de dirección hacia un tejido específico (ej. nuevos agentes antiinflamatorios)
Producción de polisacáridos por vías fermentativas (ej. gomas xantanas, alginatos)

En años recientes se ha observado un interés comercial importante sobre el área de carbohidratos. Existen, incluso, compañías que se especializan en la síntesis de toda una gama de gluco-derivados tales como neoazúcares, carbohidratos halogenados o aminados, ésteres de azúcares y oligosacáridos. Algunos de éstos se pueden aislar de fuentes naturales pero existen limitantes, como son la disponibilidad de materias primas, bajos rendimientos, difícil purificación, etc. La biotecnología constituye una alternativa en la síntesis de estos compuestos, ya sea por vía fermentativa o por medio de una bioconversión enzimática. Para estos fines es necesaria la utilización de enzimas que catalicen reacciones de transferencia estereoespecífica de grupos hacia mono u oligosacáridos.

Las enzimas glucosiltransferasas (E.C. 2.4.1.5) se caracterizan porque catalizan reacciones de transferencia de residuos glucosilo para la síntesis de polisacáridos, teniendo como único sustrato la sacarosa. Se encuentran principalmente en bacterias de los géneros *Streptococcus*,

Leuconostoc y *Lactobacillus* (Aisop, 1983). En particular las glucosiltransferasas obtenidas de *Leuconostoc mesenteroides* sintetizan polisacáridos conocidos como dextranas. Las dextranas son polímeros compuestos por unidades de D-glucosa unidas con enlaces α -(1 \rightarrow 6) en su cadena principal y con enlaces α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4) en los puntos de ramificación. La variabilidad en la estructura de la cadena principal y de las ramificaciones depende de la enzima y ésta de la cepa del microorganismo que la produce, otorgándole diferentes propiedades al polímero (Jeanes, 1979; Robyt, 1986).

Hasta la fecha, el polímero producido por la cepa NRRL B-512F de *Leuconostoc mesenteroides* es la dextrana más estudiada y la única producida a nivel industrial. Contiene 95% de enlaces α -(1 \rightarrow 6) y 5% de enlaces α -(1 \rightarrow 3) (Robyt, 1986). Se han realizado numerosos estudios sobre este polímero y la enzima que lo produce, por lo que se conoce bastante sobre su mecanismo de síntesis y su estructura.

Además de catalizar la síntesis de polímeros, las glucosiltransferasas en presencia de moléculas aceptoras, principalmente azúcares de bajo peso molecular, catalizan la transferencia del residuo glucosilo de la sacarosa al aceptor, dando lugar a una serie de oligosacáridos. Se ha descrito el mecanismo de estas reacciones, concluyendo que la incorporación de los aceptores a la cadena de dextrana finaliza el crecimiento del polímero y favorece la síntesis de oligosacáridos de bajo peso molecular. Existen diferentes carbohidratos de bajo peso molecular que pueden actuar como aceptores, siendo los más activos la maltosa y la isomaltosa (Robyt *et al.*, 1974; Robyt & Walseath, 1978; Paul *et al.*, 1986).

En los últimos años ha aumentado el interés en la producción de oligosacáridos. Sus aplicaciones se han incrementado en la industria de alimentos, principalmente como edulcorantes sustitutos de la sacarosa; en la industria farmacéutica como agentes trombolíticos, inmunoestimulantes y en la industria pecuaria como aditivos para mejorar el aprovechamiento de los alimentos consumidos por animales monogástricos estabulados (Yazawa & Tamura, 1982; Nilsson, 1989; Monsan *et al.*, 1989).

Existe una limitación en los procedimientos de producción de oligosacáridos de peso molecular y de estructura controlada. Uno de los procesos industriales utilizado desde la década pasada es la hidrólisis ácida o enzimática de polisacáridos microbianos o de origen vegetal. Avances recientes en la enzimología han demostrado el uso potencial de hidrolasas en fase reversa para la síntesis de oligosacáridos (Monsan *et al.*, 1989). Sin embargo, los bajos rendimientos y la pérdida de especificidad de algunas hidrolasas en estos sistemas son las principales razones por las que esta tecnología no sea aún de utilización a nivel industrial. La otra alternativa enzimática consiste en el establecimiento de procesos de bioconversión utilizando glucosiltransferasas.

Particularmente, en los grupos de trabajo del Dr. Agustín López (Instituto de Biotecnología de la UNAM) y del Dr. Pierre Monsan (Compañía BioEurope en Toulouse, Francia) se tiene el interés conjunto y específico en la obtención de oligosacáridos con propiedades alimentarias. Este trabajo forma parte de una línea de investigación sobre glucosiltransferasas cuyo objetivo global es aislar y caracterizar glucosiltransferasas con capacidad de sintetizar oligosacáridos con propiedades tales como peso molecular, tipo de enlaces, número y posición de las ramificaciones controladas. Es probable que en el corto o mediano plazo, estos productos -por su estructura y/o propiedades fisicoquímicas- sean de utilidad en los campos alimentarios y de química fina o como intermediarios en síntesis orgánicas.

Esta línea de investigación se justifica igualmente, ante la necesidad de diversificar la utilización del azúcar de caña, con el fin de obtener productos de mayor valor agregado. Adicionalmente, se realiza investigación básica enfocada a la profundización del conocimiento cinético de estas enzimas (con el objeto de contar con un eventual control sobre la estructura de los productos) abriendo nuevas perspectivas dentro de la química de carbohidratos.

Específicamente, esta investigación está orientada hacia el estudio y diseño de procesos biocatalíticos para la producción de glucooligosacáridos con una alta proporción de enlaces α -(1 \rightarrow 2), utilizando la cepa NRRL B-1299 de *Leuconostoc mesenteroides*. Este interés se debe a que se ha comprobado la utilidad de estos oligosacáridos como agentes preprobióticos en la alimentación animal (Valette *et al*, 1993).

OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es contribuir al estudio de las glucosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides*, así como al desarrollo de un proceso para la producción de oligosacáridos de interés comercial por bioconversión enzimática utilizando glucosiltransferasas de *L. mesenteroides* NRRL B-1299 inmovilizada.

Los objetivos particulares son:

- Producir la enzima glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 en cultivo alimentado.
- Caracterizar la enzima en términos de actividad y estabilidad al pH.
- Realizar un estudio cinético en presencia de maltosa como aceptor y determinar el perfil de oligosacáridos producidos.
- Producir un catalizador con la enzima de interés y caracterizarlo en lo que respecta a rendimiento de inmovilización, propiedades físicas y fisicoquímicas. Determinar el modelo cinético de la enzima inmovilizada.
- Diseñar un reactor de lecho empacado para verificar el modelo cinético y el comportamiento del flujo dentro del reactor: distribución de tiempos de residencia, caída de presión, efectos difusionales externos y estabilidad operacional.

ANTECEDENTES

DEXTRANAS

Un problema común relacionado con los alimentos que contienen azúcar es el cambio en sus propiedades reológicas como consecuencia de contaminación microbiana. Lo anterior se ha observado en frutas en conserva, cerveza de raíz, jugos de fruta, vinos, embutidos curados con sacarosa, etc. Específicamente, el aumento de viscosidad en jugos de caña representa un problema serio en la industria azucarera debido a que provoca obstrucciones en filtros y tuberías, inhibe la cristalización y disminuye los rendimientos durante el refinamiento del azúcar.

Pasteur, en 1861, contribuyó grandemente a esclarecer el origen de la gomosidad en jugos de frutas al demostrar que se debía a la actividad de microorganismos. Posteriormente, en 1874, Scheubler encontró que dicha viscosidad se debía a la presencia de un carbohidrato con fórmula empírica $C_6H_{10}O_5$ que presentaba rotación óptica positiva, por lo que se le llamó dextrana. Cuatro años más tarde, Van Tieghem aisló e identificó a la bacteria causante del problema como *Leuconostoc mesenteroides*. Investigaciones posteriores demostraron que la dextrana podía ser producida por otros microorganismos, pero no se contaba con una estructura ni propiedades específicas definidas del polímero. No fue sino hasta mediados de este siglo cuando se contó con información más precisa sobre la estructura y características de la dextrana (Alsop, 1983; Robyt, 1986).

Dextrana es el nombre colectivo que se le da a una gran clase de homopolisacáridos extracelulares de origen bacteriano compuestos por unidades de α -D-glucopiranosas unidas principalmente por enlaces α -(1 \rightarrow 6) en la cadena principal, con grado variable de ramificación. Estos polisacáridos son producidos a partir de sacarosa por acción de enzimas glucosiltransferasas denominadas dextranacarasas. Dichas enzimas son producidas por bacterias lácticas de las especies *Leuconostoc* y *Streptococcus* que sintetizan dextranacarasas de diferente naturaleza, lo que origina glucanos de estructuras variadas. Estos microorganismos están muy relacionados entre sí, siendo ambos cocos, gram positivo y anaerobios facultativos. Sin embargo, se ha demostrado que la dextranacarasa es una enzima inducible en las especies de *Leuconostoc*, mientras que es constitutiva en las especies de *Streptococcus* (Neely & Nott, 1962; Robyt, 1986).

ESTRUCTURA DE LAS DEXTRANAS

En 1954, el grupo de Jeanes (Jeanes *et al*, 1954) aisló, purificó y caracterizó las dextranas de 86 cepas de *L. mesenteroides*, encontrando que los polisacáridos presentaban una gran variedad

de propiedades fisicoquímicas. Los polisacáridos se analizaron por medio de la técnica de oxidación con peryodato, determinándose el tipo y proporción de enlaces que constituían cada dextrana. Algunas cepas producían dextranas insolubles en agua y otras formaban más de un tipo de dextrana. Por precipitación diferencial con etanol se pudieron separar dos tipos de glucanos producidos por algunas cepas. Los más solubles -que precipitaban con 40-44% de etanol- se denominaron S y los menos solubles -que precipitaban con \approx 36% de etanol- se designaron L. Se encontró que las diferentes dextranas tenían una alta proporción de enlaces α -(1 \rightarrow 6), y enlaces α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4) en proporciones variables dependiendo de la cepa. La estructura definitiva y la naturaleza de las ramificaciones de muchas de estas dextranas se determinaron posteriormente por análisis de metilación y por resonancia magnética nuclear de C^{13} . Con base en estos estudios, se sabe que la cepa B-512F sólo sintetiza un tipo de dextrana, mientras que las cepas B-1355, B-742 y B-1299 producen dos tipos de polisacáridos. En la tabla 2 se presenta la proporción de enlaces y las características de solubilidad de algunos tipos de dextranas. (Alsop, 1983; Robyt, 1986).

Tabla 2. Proporción de enlaces en diferentes dextranas. Información obtenida por análisis de metilación. (Robyt, 1986)

Origen	Proporción de enlaces (%)				
	Cadena principal		Ramificaciones		
	α -(1-6)	α -(1-3)	α -(1-3)	α -(1-2)	α -(1-4)
<i>L. mesenteroides</i> B-512F	95		5		
<i>L. mesenteroides</i> B-742	50		50		
<i>L. mesenteroides</i> B-1299	65			35	
<i>L. mesenteroides</i> B-1355	54	35	11		
<i>S. mutans</i> 6715	64		36		
DEXTRANA PRINCIPALMENTE SOLUBLE					
<i>L. mesenteroides</i> B-742	87				13
<i>L. mesenteroides</i> B-1299	66		7	27	
<i>L. mesenteroides</i> B-1355	95		5		
DEXTRANA PRINCIPALMENTE INSOLUBLE					
<i>S. mutans</i> 6715	4	94	2		

Streptococcus mutans produce dos glucosacarosas: la dextranosa y la mutanosa. La dextranosa sintetiza la dextrana soluble (fracción S) que tiene un alto grado de ramifi-

cación; mientras que la mutansacarasa sintetiza un glucano, denominado mutana, que tiene más del 93% de enlaces α -(1 \rightarrow 3) en la cadena principal y es altamente insoluble. Ambos glucanos son sintetizados en la cavidad oral formando parte de la placa dental. Cuando la proporción de enlaces α -(1 \rightarrow 6) no predomina, el polisacárido se conoce con otro nombre como ocurre con la mutana; así mismo, el polímero de *Leuconostoc mesenteroides* B-1355, conocido como alternana, contiene en la cadena principal enlaces α -(1 \rightarrow 6) alternados con enlaces α -(1 \rightarrow 3).

La fracción soluble (S) de la dextrana de *L. mesenteroides* B-742 presenta una estructura muy interesante, ya que la cadena principal está constituida exclusivamente por enlaces α -(1 \rightarrow 6) y cada unidad de glucosa presenta una ramificación con enlace α -(1 \rightarrow 3) de una sola unidad de glucosa. Esta estructura, conocida como "de peine", presenta el mayor grado de ramificación y una resistencia absoluta a la hidrólisis por endodextransasas. En la figura 1 se representan las estructuras de algunas dextranas donde se puede observar otro tipo de estructuras como la de peine alternado (estructura B).

DEXTRANA DE LA CEPA B-1299.

La cepa de *L. mesenteroides* B-1299 sintetiza dos tipos de polisacárido. Existen muchas publicaciones relacionadas con el estudio de ambas dextranas en lo que respecta a la síntesis, composición y determinación de estructura. Se ha analizado la estructura de ambas dextranas por los métodos de hidrólisis ácida, oxidación con peryodato, acetólisis, metilación, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, estudios inmunoquímicos, cromatografía gas-líquido acoplada con espectrometría de masas e hidrólisis enzimática con dextranasas y enzimas desramificadoras específicas para enlaces (1 \rightarrow 2). Por lo que, después de las dextranas de la cepa B-512, las producidas por la B-1299 son las más estudiadas.

Por observaciones realizadas sobre la enzima de *L. mesenteroides* B-512, en uno de los primeros estudios sobre la dextransacarasa de la cepa B-1299 se supone la existencia de un complejo entre la enzima (que parecía se encontraba asociada a la célula) y la dextrana soluble (S), la que al término de la síntesis era liberada al sobrenadante (Ebert & Schenk, 1968; Smith, 1970). Posteriormente, otros trabajos confirman que una misma enzima es capaz de sintetizar diferentes enlaces glucosídicos: α -(1 \rightarrow 6), α -(1 \rightarrow 2) y α -(1 \rightarrow 3) (Kobayashi & Matsuda, 1977).

Por tratamiento hidrolítico ácido se pudieron aislar los siguientes disacáridos: kojibiosa, nigerosa e isomaltosa (disacáridos de D-glucosa con enlaces α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 6) respectivamente). La existencia y proporción de estos enlaces se verifica posteriormente por resonancia magnética nuclear (Seymour *et al*, 1979 b). Por otra parte, la presencia de isomalto-hexaosa en

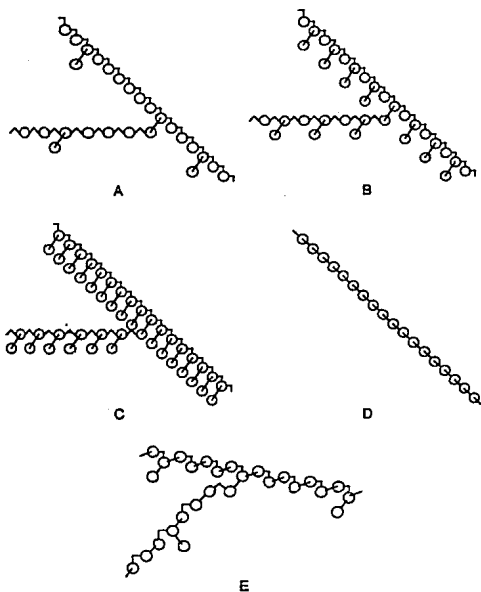






Figura 1. Estructuras de algunas dextranas.

A. Dextrana de *L. mesenteroides* B-512F. B. Estructura de peine alternado. Dextrana soluble de

S. mutans. C. Estructura de peine regular. Dextrana soluble de *L. mesenteroides* B-742.

D. Mutana. E. Alternana.

Donde  representa un enlace α -(1 \rightarrow 6).    representa un enlace α -(1 \rightarrow 3).

hidrolizados parciales de ambas dextranas muestra que contienen secuencias de al menos 6 residuos de D-glucosa unidos por enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Bourne *et al*, 1972; Kobayashi *et al*, 1973 a).

La localización de los enlaces α -(1 \rightarrow 2) y α -(1 \rightarrow 3) se pudo determinar, en parte, por medio de análisis inmunológicos. Utilizando anticuerpos anti-dextrana obtenidos de suero de conejo se pudo determinar que una alta proporción de cadenas de ambas dextranas terminaban en residuos α -kajibiosilo, mientras que sólo algunas lo hacían en residuos α -nigerosilo (Torii *et al*, 1966; Bourne *et al*, 1972; Seymour *et al*, 1977; Torii *et al*, 1980).

Por medio del análisis de metilación se demostró que las fracciones L y S tienen estructuras ramificadas, con una alta proporción de enlaces α -(1 \rightarrow 2) en los puntos de ramificación y que casi la mayoría de los enlaces α -(1 \rightarrow 3) presentes en ambas dextranas están en porciones lineales, específicamente en los extremos no reductores de las cadenas (Bourne *et al*, 1972; Kobayashi *et al*, 1973 b; Bourne *et al*, 1974; Seymour *et al*, 1979 a).

Como conclusión, en lo que respecta a la estructura de ambas dextranas, se puede decir que las dos contienen el mismo tipo de enlaces glucosídicos, pero que la dextrana L presenta mayor proporción de enlaces α -(1 \rightarrow 3) en posiciones terminales (Bourne *et al*, 1972; Kobayashi *et al*, 1973 a; Seymour *et al*, 1979 a y b). Esta diferencia estructural sugiere que las dextranas S y L representan etapas sucesivas en la síntesis, siendo la última etapa la síntesis de los enlaces α -(1 \rightarrow 3) para formar la dextrana L (Bourne *et al*, 1972).

Otra herramienta importante en el estudio de la composición de las dextranas, que complementa la información obtenida por los métodos ya citados, es la utilización de enzimas que hidrolizan un tipo de enlace específicamente (Bourne *et al*, 1974; Kobayashi *et al*, 1984). Este es el caso de la endo-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucanasa (dextranasa, E. C. 3.2.1.11), la endo-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucanasa (E. C. 3.2.1.59), la exo-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucohidrolasa (glucodextranasa, dextrannglicosidasa E. C. 3.2.1.70) y la exo-isomaltohidrolasa (isomaltodextranasa E. C. 3.2.1.94). Las dos endo- α -D-glucanasas reconocen cadenas con enlaces (1 \rightarrow 6) o (1 \rightarrow 3) secuenciales; así, cualquier oligosacárido ramificado obtenido como resultado de esta hidrólisis específica, provee información acerca de las ramificaciones del polisacárido. Una desventaja es que la hidrólisis es restringida cuando se trata de polímeros con un alto grado de ramificación. Las exoenzimas proveen información acerca de secuencias del extremo no reductor de las cadenas. Otras enzimas que se han utilizado incluyen exo-hidrolasas específicas para enlaces (1 \rightarrow 2) provenientes de *Flavobacterium* spp y para enlaces (1 \rightarrow 3) de *Streptomyces* spp (Kobayashi *et al*, 1984; Mitsuishi *et al*, 1984; Mc Cleary & Matheson, 1986).

Estudios de resonancia magnética nuclear complementaron la información sobre la estructura de las dextranas B-1299, siendo ésta de tipo peine alternado (Watanabe *et al*, 1980). En la figura 2 se representa un segmento de la dextrana soluble de la capa B-1299 (Boume *et al*, 1974; Mc Cleary & Matheson, 1986).

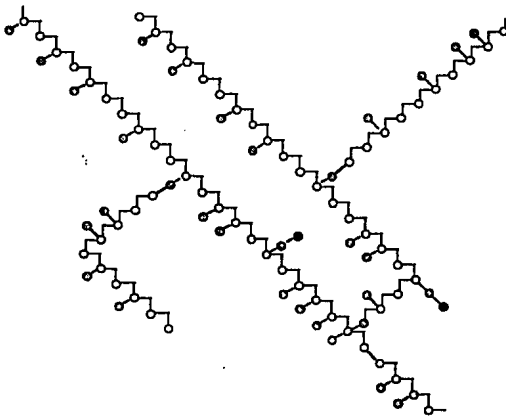






Figura 2. Estructura propuesta para la fracción S de la dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299.

Donde:  representa un enlace α -(1→6);  representa una ramificación en α -(1→2);  representa un enlace α -(1→2) lineal y  representa un enlace α -(1→3).

Las bacterias de la especie *Leuconostoc* son microorganismos encapsulados. Se podría pensar que el polisacárido constituyente de la cápsula debe ser necesariamente dextrana. Se han realizado experimentos para conocer la naturaleza de la cápsula demostrándose que ésta es un complejo que contiene glucosa y galactosa en proporciones variables de acuerdo a la cepa (Bailey & Oxford, 1959). Los mismos autores señalan que en algunas cepas de *Leuconostoc* crecidas en presencia de sacarosa se puede encontrar dextrana asociada a la cápsula y que ésta es muy difícil de remover. Por otra parte, demuestran que se pueden obtener organismos que, aun creciendo en presencia de sacarosa, poseen un polisacárido capsular libre de dextrana.

La síntesis de dextrana asociada a la pared celular se confirmó por estudios de microscopía electrónica (Brooker, 1977). Cuando la cepa B-1299 de *L. mesenteroides* crecía en medio sin sacarosa, la pared celular se observaba como una estructura de triple capa similar a la de otras bacterias gram positivas. Pero cuando a cultivos en fase logarítmica de crecimiento se les agregaba sacarosa en el medio de cultivo, se observaba la formación de material capsular sobre la superficie de la pared celular. Después de 2 horas de permanecer en presencia de sacarosa, se completaba la formación de esta cubierta superficial de 110 a 130 nm de espesor, constituida en gran parte por dextrana. Al término de 18 horas la cápsula alcanzaba el máximo de tamaño, con un diámetro máximo de 6 μ m. En investigaciones previas (Ebert & Schenk, 1968; Smith, 1970) se suponía que la dextransacarasa se encontraba asociada a la cadena de dextrana durante la síntesis. Con base en la inferencia anterior, se pensó que la cubierta superficial de las células de *L. mesenteroides* B-1299 crecidas en sacarosa estaba constituida por un complejo dextrana-dextransacarasa asociado a la célula. En reportes anteriores también se detectó actividad dextransacarasa tanto en el sobrenadante, como asociada al paquete celular (Kobayashi & Matsuda, 1974).

DEXTRANSACARASAS

Las dextransacarasas (EC 2.4.1.5), (α -1,6-glucan:D-fructosa-2-glucosiltransferasas) catalizan reacciones de transferencia de residuos glucosilo de la sacarosa -molécula donadora- hacia una molécula aceptora. En la síntesis de polímero la molécula aceptora es la cadena creciente de dextrana. Si bien la sacarosa es el único sustrato natural de la enzima, se encuentran otros sustratos como el fluoruro de α -D-glucopiranosilo y el p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido; sin embargo éstos son utilizados por la enzima a una velocidad mucho menor en comparación con la sacarosa (Robyt, 1986). La reacción que se lleva a cabo en la síntesis de polímero está representada en la figura 3.

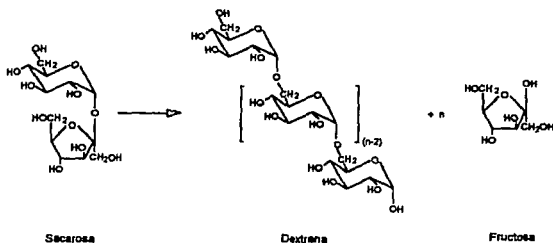


Figura 3. Reacción de síntesis de dextrana.

MECANISMO DE REACCION.

El mecanismo de la dextran sacarasa ha sido objeto de varios años de estudio. En 1943 Hehre observó que la enzima activa se mantenía asociada a la cadena creciente de polímero y además no encontró algún azúcar fosforilado relacionado con la síntesis de dextrana. Se pensaba que se requería de una molécula iniciadora y no se sabía con seguridad si la cadena de dextrana crecía a partir del extremo reductor (Ebert & Schenk, 1968). Más adelante, se demostró que la síntesis de dextrana difería de la del glucógeno y almidón en que no requiere de intermediarios fosforilados, ya que la energía necesaria para la condensación de los residuos glucosídicos es proporcionada por la hidrólisis del enlace glicosídico de la sacarosa. La reacción de síntesis de dextrana es irreversible debido a la diferencia entre la energía de hidrólisis de la sacarosa (-6.6 kcal/mol) y la energía necesaria para la formación del enlace α -(1 \rightarrow 6) en la dextrana (2.0 kcal/mol) (Hassid & Neufeld, 1962).

En estudios posteriores realizados sobre la dextran sacarasa de la cepa B-512F (Robyet *et al*, 1974; Robyt, 1986 y 1991) se demuestra que no se necesita de alguna molécula iniciadora en la síntesis de dextrana. El mecanismo de la enzima en la síntesis de enlaces α -(1 \rightarrow 6) involucra la existencia de dos nucleófilos en el sitio activo de la enzima. Al principio de la reacción, los dos nucleófilos llevan a cabo un ataque sobre dos moléculas de sacarosa liberando fructosa y formando un intermediario enzima-glucosilo. El hidroxilo del carbono 6 de uno de los residuos glucosilo es orientado para atacar el carbono 1 del residuo glucosilo contiguo para formar el enlace α -(1 \rightarrow 6). El nucleófilo que se libera ataca a otra molécula de sacarosa formando un nuevo intermediario enzima-glucosilo. El hidroxilo del carbono 6 de este nuevo intermediario

ataca al carbono 1 del residuo isomaltosilo, formando un intermediario isomaltotriosilo-enzima. El proceso continúa de tal forma en que el glucosilo y el residuo dextranosilo creciente son transferidos alternadamente entre los dos sitios nucleófilos del sitio activo durante la elongación del polímero de dextrana. De esta manera la elongación se lleva a cabo por el extremo reductor. En la figura 4 se esquematiza este proceso.

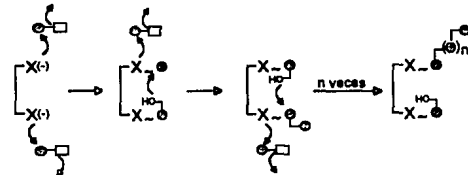


Figura 4. Mecanismo propuesto para la síntesis de dextranas.

Donde: ●□ = molécula de sacarosa; ● = glucopiranososa; □ = fructofuranosa;

●-● = enlace α -(1→6) y X(-) = nucleófilo del sitio activo.

Se puede postular un mecanismo similar para las diversas dextransacarosas que sintetizan otros tipos de enlace. Por ejemplo, en el caso de la mutansacarasa la diferencia es que las unidades glucosilo se orientan de tal manera que el hidroxilo del carbono 3 ataca al carbono 1 de la cadena creciente de mutana formando enlaces α -(1→3) en vez de α -(1→6). Se hace notar al respecto de la configuración de la D-glucopiranososa, que tanto el hidroxilo del carbono 6 como el del carbono 3 se encuentran del mismo lado del anillo piranosido y que la diferente orientación en el espacio de los dos grupos hidroxilo se puede obtener rotando el residuo glucopiranosido 180° en el plano del anillo.

Posteriormente, también el grupo de Robyt en Iowa (Fu & Robyt, 1986) demuestra que, en el sitio activo de la enzima, existen residuos histidina que son indispensables para la actividad enzimática. En la figura 5 se esquematiza el mecanismo propuesto.

Se sugiere, que en el mecanismo descrito anteriormente, dos grupos imidazonio (de los residuos de histidina) en el sitio activo, donan protones al átomo de oxígeno de las D-fructosas que se liberan; al ocurrir esto, los iones imidazonio pasan a ser grupos imidazol. Entonces, uno de los grupos imidazol extrae un protón del hidroxilo del carbono 6 de uno de los residuos D-glucosilo

que forman parte del complejo covalente enzima-glucosilo, facilitando así, el ataque nucleofílico de este grupo hidroxilo hacia el carbono 1 de la otra unidad D-glucosilo. El grupo imidazol protonado que extrajo el protón del hidroxilo del carbono 6 ahora transfiere su protón al residuo D-fructosilo saliente. Este proceso se repite entre los grupos nucleófilos (X) y los dos grupos imidazol del sitio activo.

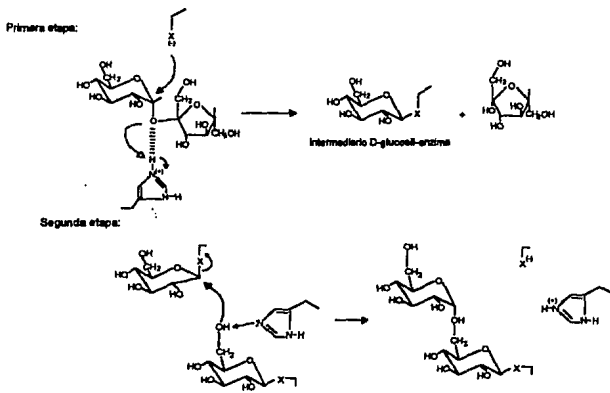


Figura 5. Mecanismo de reacción de los grupos imidazol en el sitio activo de la dextranasa.

Primera etapa: Función de un grupo imidazol en la ruptura de la molécula de sacarosa.

Segunda etapa: Intervención de otro imidazol en la formación del enlace α -(1→6).

REACCIONES DE ACEPTOR.

Las reacciones de aceptor ocurren cuando otros carbohidratos además de la sacarosa están presentes durante la reacción; cuando esto sucede, el residuo glucosilo de la sacarosa se

transfiere a la molécula que actúa como aceptor. Las reacciones de aceptor se han utilizado para producir dextranas de peso molecular controlado y en la síntesis de oligosacáridos, como la palatinosa (isomaltulosa; 6-O- α -D-glucopiranosil-D-fructofuranosa), que se ha utilizado como edulcorante (Smiley *et al.*, 1982).

Se piensa que la reacción de aceptor se lleva a cabo por un desplazamiento nucleofílico, de los grupos glucosilo y dextranosilo del complejo covalente con la enzima, por un grupo hidroxilo específico del aceptor. En esta reacción se forma un enlace glicosídico entre el aceptor y el residuo D-glucosilo y dextranosilo, respectivamente. Con base en esto se concluye que las reacciones de aceptor terminan la reacción de polimerización de la dextrana al desplazar la cadena creciente de dextrana del sitio activo de la enzima (Roby & Walseth, 1978). En la figura 6 se representa el mecanismo de la reacción de maltosa como aceptor con la dextranasa B-512.

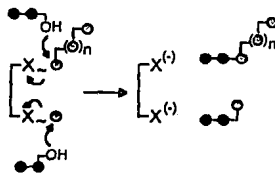


Figura 6. Mecanismo de término de polimerización de la dextrana.

Donde: $\text{---}\ominus$ representa un enlace α -(1 \rightarrow 6), $\bullet\text{---}\bullet$ representa una molécula de maltosa y $X^{(-)}$ representa el nucleófilo del sitio activo.

Las moléculas aceptoras reaccionan con diferentes eficiencias y son de naturaleza variada, siendo principalmente azúcares de bajo peso molecular. Se han reportado diversos compuestos que actúan como aceptores, sin embargo el más estudiado es la maltosa, seguido de la isomaltosa, nigerosa, α -metil-D-glucopiranosido, D-glucosa, lactosa, celobiosa y fructosa en orden decreciente de eficiencia, entre otros.

Durante la síntesis de dextrana, el glucano que se está sintetizando puede actuar como aceptor, entonces da lugar a la síntesis de ramificaciones. Hacia el final de la reacción de síntesis la

fructosa acumulada alcanza una concentración elevada y empieza a actuar como aceptor. El producto obtenido es un disacárido llamado leucrosa (α -D-glicopiranosil-1 \rightarrow 5-D-fructopiranosido), que es, a su vez, un aceptor muy pobre (Robyt, 1988 y 1991).

Cuando la molécula aceptora está presente desde el inicio de la reacción, el residuo glucosilo es transferido al aceptor, formando un producto que puede ser también aceptor. De ser así, se generan series homólogas de oligosacáridos. En el caso de la reacción de la dextranasa B-512 en presencia de maltosa, se obtiene como primer producto la panosa (6²-O- α -D-glicopiranosil maltosa), la cual, a su vez, es aceptor con el que se forma un tetrasacárido (6-O- α -D-isomaltosil maltosa), que también actúa como aceptor, y así sucesivamente. Cada oligosacárido es el producto de transferencia de una unidad glucosilo sobre un oligosacárido de grado de polimerización inferior, presentando un residuo maltosilo en el extremo reductor. De acuerdo a la relación de sacarosa/maltosa presente en la reacción se obtienen proporciones variables de la serie de isomalto-oligosacáridos (6²-isomaltodextrinosil maltosas) (Pauli *et al*, 1984 y 1988; Oriol *et al*, 1987).

Se han estudiado estas reacciones desde el punto de vista de la cinética de la dextranasa (Pauli *et al*, 1984 y 1988), observándose que la adición del aceptor provoca un aumento importante de la velocidad máxima de reacción en función a la concentración del aceptor. Los autores proponen que el aumento se debe a que la velocidad de transferencia del residuo glucosilo al aceptor es mucho mayor a la de transferencia al complejo enzima-dextranosilo.

Se ha observado que las dextranases llevan a cabo reacciones de desproporcionalación. Estas son reacciones en las que el azúcar donador de grupos glucosilo actúa también como aceptor. Por ejemplo, la reacción de la dextranasa B-512 con isomaltotriosa puede dar lugar, en una primera etapa, a isomaltosa y a isomaltotetraosa, y eventualmente a series de isomalto-oligosacáridos. Estas reacciones se han observado en la altemansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 y en otro tipo de enzimas, como la calúfala, la amilasa, la glucamilasa, la glucodextranasa e isomaltodextranasa (Binder *et al*, 1983; López-Munguía *et al*, 1993).

Las reacciones de aceptor tienen una aplicación potencial en la síntesis de oligosacáridos complejos: glicoproteínas y glicolípidos. Con este fin se han utilizado glicosidasas en reacciones de síntesis, pero la principal desventaja del uso de este tipo de enzimas a comparación de las glicosiltransferasas es que las reacciones catalizadas por glicosidasas no son regioespecíficas, obteniéndose mezclas racémicas. Esto ocasiona bajos rendimientos y procesos de purificación complejos. Por otra parte, diversas glicosidasas catalizan preponderantemente la síntesis de

enlaces α -(1 \rightarrow 6), mientras que la mayor parte de las estructuras de los glicoconjugados de interés contienen enlaces α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) o α -(1 \rightarrow 4) (Nilsson, 1991).

DEXTRANSACARASA DE LA CEPA B-1299

La dextranasa de la cepa NRRL B-1299 de *Leuconostoc mesenteroides* ocurre, como ya se ha mencionado, en forma extracelular y asociada a la célula. Por análisis cromatográficos en DEAE-celulosa y electroforéticos en geles de poliacríamida se encontró que la enzima extracelular se encuentra en forma de múltiples isoenzimas de naturaleza oligomérica (Kobayashi & Matsuda, 1974 y 1975 b). La isoenzima I, que es la forma monomérica, tiene un peso molecular de 42 000. La isoenzima II (dímero) tiene un P.M. de 83 000 y las otras isoenzimas de 127 000, 169 000, 212 000 hasta más de 450 000 sucesivamente. Esta fracción polimérica se identifica como enzima N. Trabajos posteriores de este mismo grupo de investigadores, demuestran que la actividad de la enzima N se incrementa con la presencia de iones Ca, Mg, Fe y Co, además se observa que la presencia de dextranas exógenas estimulan en mayor grado a la enzima N que a la I. La temperatura y pH óptimos de la enzima I son de 6.0 y 40°C, para la enzima N estos valores son de 5.5 y 35°C respectivamente. Los valores de K_m para ambas fracciones son similares, 13.9mM para la enzima I y 13.3mM para la fracción N (Kobayashi & Matsuda, 1976).

Por otro lado, se encontraron dos enzimas asociadas a la célula. Las isoenzimas difieren en la carga neta, pero presentan pesos moleculares semejantes: 69 000 para la enzima I y 79 000 para la enzima II (Kobayashi & Matsuda, 1974 y 1975 a). Con respecto a la caracterización cinética, se observó que la enzima I tiene un pH óptimo entre 6.3 y 6.5, una temperatura óptima de 45. Mientras que la temperatura y el pH óptimo de la enzima II son 5.5-5.9 y 37°C respectivamente.

Mediante análisis estructurales se ha demostrado que el polisacárido sintetizado por la enzima II es la dextrana característica B-1299, esto es, que contiene enlaces α -(1 \rightarrow 2) y α -(1 \rightarrow 3) además de los α -(1 \rightarrow 6). Pero se ha observado que la enzima N (extracelular) presenta una actividad mucho mayor en la síntesis de este tipo de polímero, por lo que se sugiere que la forma agregada de la dextranasa tiene mayor capacidad catalítica para sintetizar dextrana con una estructura altamente ramificada (Kobayashi & Matsuda, 1977).

REACCIONES DE ACEPTOR

La estructura de los oligosacáridos, producto de la reacción de aceptor, puede ser variada y depende de la dextranosa que se utilice. El grupo de Pierre Monsan en el INSA de Toulouse, Francia ha llevado a cabo estudios de cromatografía líquida de alta resolución y de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , para determinar la estructura de los oligosacáridos obtenidos en presencia de maltosa con dextranosas de varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. En particular con la dextranosa B-1299, se ha encontrado que como primer producto de una serie de oligosacáridos, se encuentra la panosa, el cual actúa como aceptor para formar dos tipos de tetrasacáridos: uno al transferir el residuo glucosilo en (1→6) (isomaltotetraosa) y el otro transfiriendo en (1→2). Estos, a su vez, actúan como aceptores dando lugar a pentasacáridos con estructuras diversas que se esquematizan en la figura 7 (Castillo *et al*, 1992). Se ha observado que se produce el mismo tipo de oligosacáridos utilizando la enzima extracelular, como la asociada a las células (Renaud-Simeon *et al*, 1993).

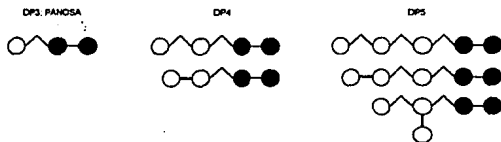


Figura 7. Principales productos de aceptor con maltosa utilizando la dextranosa B-1299.

Donde: ●● representa la maltosa; ○○ un enlace α -(1→2) y ○○○ un enlace α -(1→6).

PRODUCCION DE DEXTRANA Y DE DEXTRANSACARASA

El proceso tradicional de síntesis de dextrana consistía en llevar a cabo la fermentación sin control de pH. El proceso iniciaba a un pH de 7, el que disminuía hasta valores inferiores a 5 por el aumento de concentración de ácido láctico producto del metabolismo microbiano. Así, durante las primeras horas de fermentación se favorecía el crecimiento del microorganismo y la producción de enzima (pH de 7.0 a 6.5), ya que ésta se encuentra asociada al crecimiento. Al acercarse a un pH entre 5.4 y 5.2 se propiciaba la bloconversión con la enzima ya producida.

Este proceso duraba unas 20 horas y era poco eficiente debido a la baja concentración de sustrato que quedaba disponible para la bioconversión, lo que ocasionaba una baja productividad. Por otra parte, si se utilizaban altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo se presentaba represión catabólica, lo que disminuía los niveles de producción de enzima. De hecho, se obtenían unas 0.44 U/ml de medio. También se presentaban problemas de aumento de viscosidad a lo largo de la fermentación, haciendo difícil la separación de las células en las operaciones de recuperación del producto (Alsop, 1983).

Este proceso de obtención se mejoró en los años 50's haciendo primero la fermentación, controlando el pH para mantener las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo y la producción de enzima, minimizando así la producción de dextrana. En estas condiciones se producía de 1 a 2 U/ml de medio. La dextranasa extracelular se utilizaba cruda o parcialmente purificada para la síntesis de dextrana por medio de un proceso de bioconversión bajo las condiciones óptimas de temperatura y pH de la enzima (29°C y pH de 5.2). La concentración de sacarosa utilizada en la bioconversión es de aproximadamente 150 g/l, obteniéndose así un mayor rendimiento y un producto más puro (Tsuchiya *et al*, 1952; Alsop, 1983).

Se ha obtenido un mayor rendimiento en la síntesis de enzima controlando particularmente los niveles de sacarosa en la fermentación. López y Monsan (1980) desarrollaron un sistema de fermentación alimentada, que permite mantener baja la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Ésta se debe mantener constante, de 0.5 a 1%, por adición continua de sacarosa durante la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo. Lo anterior se logra por medio de la regulación del pH con una solución de sacarosa alcalina, a una velocidad aproximada de 20g/l-hr. De esta manera se elimina el fenómeno de represión catabólica y se incrementa la producción de enzima de 7 a 8 veces, obteniendo aproximadamente 9 U/ml. El pH se debe regular a 8.5 para minimizar la producción de polímero y favorecer la producción de enzima.

Se han realizado pocos trabajos sobre la producción en continuo de la dextranasa, reportándose rendimientos de 0.9 a 3.4 U/ml-h (Lawford *et al*, 1979; Paul *et al*, 1984). Sin embargo, el proceso de fermentación por lote alimentado es el más utilizado. El nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación también influye sobre el rendimiento de producción de la enzima. Recientemente se reportó la obtención de un alto rendimiento (≈ 20 U/ml) en una fermentación por lote alimentado sin suministro de aire y utilizando velocidades de agitación bajas (Barker & Aijongwen, 1991).

PURIFICACION DE LA DEXTRANSACARASA

Una vez terminada la fermentación, dependiendo de la cepa, la enzima se puede localizar en el caldo de fermentación o bien, asociada a las células. En el caso de que sea extracelular se debe concentrar y purificar para llevar a cabo posteriormente el proceso de bioconversión.

La concentración de la enzima extracelular se puede llevar a cabo por medio de una operación de ultrafiltrado del sobrenadante del medio de cultivo habiendo separado previamente la biomasa por centrifugación. Para la purificación de la enzima pueden aplicarse las técnicas de cromatografía de permeación en gel (habiéndose reportado el uso de Ultrogel Aca 34, DEAE-celulosa, Bio-Gel A, DEAE-Bio-Gel A) o de cromatografía de afinidad con Sephadex G-50 (López & Monsan, 1980; Binder *et al*, 1983). Una metodología que resulta original consiste en un sistema de concentración-purificación por extracción líquido-líquido con polietilenglicol (PEG) de peso molecular 1500. En la extracción líquido-líquido se forman dos fases debido a la incompatibilidad de dos polímeros, que termodinámicamente no pueden estar disueltos en la misma fase. Cuando una enzima se encuentra en un sistema de este tipo, migra preferencialmente a una de las fases, lográndose el efecto de concentración-purificación. En el caso de la dextranasa, la originalidad radica en que ésta se encuentra formando el complejo enzima-dextrana, por lo que al adicionar el polietilenglicol la enzima se ubica en la fase dextrana, mientras que los restos de medio de cultivo (rico en otras proteínas) permanecen en la fase PEG. Se pueden llevar a cabo extracciones sucesivas con el fin de obtener una preparación enzimática más pura. Para la enzima B-512F se reporta que como resultado de 5 extracciones se obtiene una actividad específica de 171 U/mg de proteína con un rendimiento final del 95%. Mientras que, partiendo del mismo extracto crudo (1.5 U/mg), por cromatografía de filtración en gel se obtuvieron sólo 103 U/mg de proteína. Comparando estos dos métodos se concluye que operaciones sucesivas de extracción con PEG resultan en un mayor grado de purificación de la enzima a comparación de la cromatografía (Paul *et al*, 1986, Monsan *et al*, 1987).

DEXTRANSACARASA INMOVILIZADA

Se han llevado a cabo numerosos trabajos acerca de la inmovilización de la enzima B-512, utilizando diferentes métodos de inmovilización, entre los que se encuentran: acoplamiento iónico a DEAE-Sephadex A-50, DEAE-celulosa, y unión covalente de la enzima con soportes como Biogel P-2, poli(acrilamida), membranas de acetato de celulosa y fibras huecas de polisulfato. En todos los casos los rendimientos de inmovilización fueron bajos (Alsop, 1983). Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados al utilizar como soporte sílica aminada porosa (Spherosil, de Rhône Poulenc) activada con glutaraldehído; se reporta que el rendimiento de inmovilización se

mejoró al añadir maltosa durante el proceso de producción del catalizador. Adicionalmente se encontró que el área específica de la sílica es uno de los parámetros más importantes de inmovilización, los mejores resultados se obtuvieron utilizando sílica con un área específica de 8 m²/g (Monsan & López-Munguía, 1981).

La dextrana de alto peso molecular producida se puede acumular en los poros del soporte, haciendo que aumente la resistencia a la transferencia de masa intrapartícula, por lo que este tipo de catalizador resulta de interés sólo para la síntesis de dextrana de peso molecular bajo o intermedio. Con este fin, la reacción de la dextranasa inmovilizada en presencia de maltosa puede ser de gran utilidad, ya que a diferencia del proceso industrial, no requiere de la hidrólisis ácida de dextrana de alto peso molecular (Monsan *et al.*, 1987). Sin embargo, la implementación de estos procesos a nivel industrial no se ha llevado a cabo entre otras causas por la baja estabilidad de los catalizadores obtenidos y el mercado limitado de los productos (Alsop, 1983).

La dextranasa no es la excepción a la tendencia actual de efectuar procesos fermentativos con células inmovilizadas. En estudios recientes se reporta el uso de células inmovilizadas en alginatos para la producción de dextranasa extracelular en fermentaciones por lote, lote alimentado y en proceso semicontinuo (El-Sayed *et al.*, 1990 a y b). Se reporta que las células libres presentan una actividad mucho mayor que las células inmovilizadas. Esto se debe a la formación de una barrera difusional causada por la acumulación de dextrana de alto peso molecular dentro del soporte. La actividad que se observa es únicamente la de la enzima presente en las regiones externas del soporte. Como conclusión, este tipo de sistema de producción es menos eficiente en comparación con el proceso tradicional de obtención de dextrana.

APLICACIONES DE LOS OLIGOSACARIDOS DE DEXTRANA

Los oligosacáridos con enlaces α -(1 \rightarrow 2) también tienen aplicación como aditivos alimentarios. El hecho de que estos oligosacáridos no sean hidrolizados por las enzimas presentes en la saliva les confiere propiedades no cariogénicas; tampoco son degradadas en el estómago lo que impide su absorción en el intestino delgado. Estas moléculas son degradadas en el intestino grueso por los sistemas enzimáticos de la flora intestinal. Son los microorganismos de la flora saprófita, especialmente las bifidobacterias, los que metabolizan preferentemente estos oligosacáridos formando ácidos grasos volátiles y CO₂. La flora potencialmente patógena (enterobacterias, clostridios, salmonellas, etc) no utiliza estos sustratos glucosídicos (Valette *et al.*, 1993).

Con base en lo anterior, ha aparecido un nuevo concepto nutricional: los oligosacáridos constituyen un sustrato selectivo que permite favorecer el desarrollo de la flora intestinal

benéfica, tanto en el hombre, como en los animales. Estos oligosacáridos no metabolizables pueden sustituir eficazmente la adición de microorganismos vivos -conocidos con el término genérico de probióticos (levaduras y bacterias lácticas)- y de antibióticos utilizados como factores de crecimiento en alimentación animal (Fuller, 1989; Hoover, 1993; Monsan, 1993; Valette *et al*, 1993)

Adicionalmente, los oligosacáridos interfieren con el mecanismo de adhesión de las bacterias patógenas sobre la superficie intestinal. Estos interactúan selectivamente con las proteínas superficiales de los patógenos (adhesinas), las cuales reconocen ciertos motivos glucosídicos presentes en la pared intestinal. Los oligosacáridos también provocan una estimulación de los mecanismos inmunológicos intestinales por medio de procesos que no están totalmente elucidados, aunque es probable que simulen la acción de determinantes antigénicos presentes en la superficie de los microorganismos (Monsan, 1993).

Se ha observado el efecto de los oligosacáridos particularmente en el área de nutrición animal. La adición de un 1.0% de glucooligosacáridos en la ración alimenticia permite disminuir significativamente la morbilidad causada por diarreas en ganado vacuno. Así mismo, se ha observado una disminución de más del 50% en la mortalidad de pollos a causa de la misma afección (Monsan, 1993).

Se han desarrollado aplicaciones no sólo en el campo alimentario, también se ha encontrado utilidad de los oligosacáridos en el área cosmetológica. Por ejemplo, la compañía francesa BioEurope ha desarrollado recientemente un nuevo producto basado en la aplicación de glucooligosacáridos en la conservación del equilibrio ecológico de la flora microbiana cutánea. De hecho, el desequilibrio de esta flora origina numerosos problemas cosmetológicos y dermatológicos (Monsan, 1993).

MATERIALES Y METODOS

Conservación de la cepa, medio de cultivo y condiciones de fermentación.

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 se obtuvo de la colección de Peoria, Illinois, como parte de un proyecto de colaboración con la compañía BioEurope, Francia. Se partió de células liofilizadas que, una vez reactivadas, se conservaron a -4°C en una solución de glicerol a una concentración de 15% (v/v). Las soluciones así preparadas se utilizaron como inóculos para las fermentaciones a nivel matraz.

En la tabla 3 se presenta el medio de cultivo utilizado para la reactivación y crecimiento de la cepa B-1299 de *L. mesenteroides*. El pH del medio se ajustó a 6.9 con ácido ortofosfórico, antes de esterilizar. Las fermentaciones alimentadas, se suplementaron con 0.1% (v/v) de antiespumante (Silicón 426R, Prolabo).

Tabla 3. Composición del medio de cultivo utilizado para *Leuconostoc mesenteroides* B-1299.

COMPONENTE	CONCENTRACION (g/l)
Sacarosa	40
Extracto de levadura	20
K_2HPO_4	20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.015
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
NaCl	0.01

Las fermentaciones a nivel matraz se llevaron a cabo en un volumen de 50 ml en matraces de 250 ml, en incubadoras (New Brunswick Scientific, modelo G-25) con agitación orbital a 200 rpm y a una temperatura de 30°C .

Se determinó el crecimiento del microorganismo por turbidez a 650 nm en un espectrofotómetro Spectronic 601. Los cultivos de 12 horas o con una densidad óptica aproximada de 4.0 se utilizaron como inóculos para las fermentaciones alimentadas.

Las fermentaciones alimentadas se llevaron a cabo en un fermentador SGI (Setric Genie Industrial, modelo 7F) de 2 litros, con un volumen de trabajo de 1 litro. Durante la fermentación se reguló el pH a 5.5 con la adición de sacarosa alcalina (sacarosa a una concentración de 400g/l en una solución de sosa 2N). La agitación se mantuvo a 400 rpm, la aireación en 0.5 vvm y la temperatura a 29°C.

Al final de la fermentación el pH se ajustó a 5.4. La concentración de insolubles se determinó por peso seco de una alícuota de 2 ml de cultivo. Posteriormente, las células y otros insolubles se separaron por centrifugación. El sobrenadante se conservó en refrigeración; una parte de los insolubles se mantuvo a -4°C y otra se liofilizó.

Concentración-purificación de la actividad extracelular.

El proceso de extracción de la fracción soluble de la enzima con polietilenglicol (PM 1500) se llevó a cabo agregando un volumen de PEG al 50% (w/v) a un volumen de sobrenadante de cultivo. La fase inferior rica en dextrana (asociada a la dextran sacarasa) se separó por centrifugación y se lavó con buffer de acetatos 0.05M pH 5.4. La pastilla obtenida se resuspendió en buffer y se conservó en refrigeración.

Medición de la actividad enzimática.

La actividad glucosiltransferasa se estimó midiendo los azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de 10% (w/v) de sacarosa a 30°C y buffer de acetatos 0.05 M, pH 5.4. Los azúcares reductores se determinaron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Sumner y Howell (1935). La reacción se lleva a cabo al poner en contacto 10 ml de una solución enzimática conteniendo de 0.5 a 2 U/ml con 2 ml de una solución de sacarosa (800 g/l), para dar lugar a una concentración final de sustrato de 100 g/l.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que libera una micromol de fructosa por minuto a pH 5.4 y a 30°C.

Síntesis de oligosacáridos.

Las reacciones de aceptor se llevaron a cabo con 300 g/l de sacarosa, 100 g/l de maltosa, 2.5 U/ml de dextran sacarasa libre en un volumen de 10 ml de buffer de acetatos 0.05M, pH 5.4, a

30°C. Después de 24 horas, la reacción se detuvo por calentamiento en baño a ebullición por 5 minutos.

Análisis de productos por HPLC.

Una vez inactivada la enzima, la muestra de reacción debe ser filtrada a través de una membrana Millipore de 0.45 μm . Los análisis de oligosacáridos se llevaron a cabo en un cromatógrafo Waters-Millipore con detector de índice de refracción con una columna $\mu\text{BONDA-PAK C18}$ Waters-Millipore. Como eluyente se utilizó agua a un flujo de 0.7 ml/min. Para detectar oligosacáridos de alto grado de polimerización, el eluyente consistió en una mezcla agua-metanol 94:6 (v/v).

Para el análisis de azúcares de bajo peso molecular se utilizó una columna de análisis de carbohidratos Waters-Millipore. El eluyente en este caso fue una mezcla de acetonitrilo-agua 65:35 (v/v) a un flujo de 1 ml/min.

Determinación del perfil de actividad enzimática al pH.

Se realizaron una serie de reacciones enzimáticas bajo las condiciones mencionadas anteriormente, pero en buffer de pH en un rango de 4.8 a 6.0. Se determinaron las velocidades iniciales de reacción midiendo los azúcares reductores liberados durante la reacción.

Determinación de las constantes cinéticas de la fracción insoluble con actividad dextranasa.

En el estudio cinético de la fracción enzimática insoluble, se utilizó la cantidad de enzima liofilizada necesaria para tener aproximadamente 1 UI/ml de reacción, agregándose cantidades variables de una solución concentrada de sacarosa para cubrir un rango de concentración de 10 a 300 g/l. La velocidad inicial se determinó con el método anteriormente descrito a pH 5.4 y 30°C.

Se siguió el mismo procedimiento para las reacciones en presencia de maltosa, manteniéndose una relación sacarosa/maltosa (w/w) de tres.

Reacciones de desproporción con la enzima B-1299.

Las reacciones de desproporción se llevaron a cabo poniendo a reaccionar la enzima libre, en ausencia de sacarosa, con oligosacáridos liofilizados. Se experimentó con oligosacáridos obtenidos con la cepa B-512, por estar constituidos de glucosa con enlaces α -(1 \rightarrow 6) exclusivamente, y con un grado de polimerización comprendido entre 3 y 15 (D.P. 3 a D.P. 15).

También se efectuaron las reacciones con oligosacáridos de la cepa B-1299, (que contienen enlaces α -(1 \rightarrow 2) y α -(1 \rightarrow 6)) en un rango de D.P. 3 a D.P. 8. Los oligosacáridos fueron proporcionados por la compañía BioEurope.

Estas reacciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 2U/ml de enzima en un volumen total de 10 ml, con una concentración de oligosacáridos de 10mg/ml a 30°C y pH 5.4. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción y se analizaron por HPLC.

Evaluación de estabilidad de las preparaciones enzimáticas al pH.

Se evaluó la estabilidad de tres preparaciones enzimáticas diferentes:

- a) Enzima soluble parcialmente purificada con PEG.
- b) Enzima insoluble liofilizada. Esta fracción está constituida por células y dextranosa asociada a éstas.
- c) Mezcla de ambas actividades. Esta preparación se obtuvo al agregar PEG directamente sobre el cultivo al término de una fermentación. De esta manera se separa por centrifugación una mezcla de la enzima insoluble con la soluble asociada a la fase dextrana en la proporción en que son sintetizadas durante la fermentación.

El experimento se llevó a cabo utilizando soluciones con una concentración de enzima de 1 U/ml en diferentes soluciones buffer de acetatos 0.05M en un rango de pH entre 4.8 y 5.6; las mezclas de reacción se mantuvieron en agitación continua a temperaturas de 32 y 40°C. Se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos y se les determinó actividad a pH 5.4.

Producción del catalizador.

Para la elaboración del biocatalizador se partió de la pasta de insolubles, obtenida de la centrifugación del medio de fermentación, mantenida en congelación. Se preparó una suspensión de esta pasta de tal forma que la mezcla presentara aproximadamente una actividad de 8 U/ml en buffer de acetatos 0.05M pH 5.4. Posteriormente esta suspensión se mezcló perfectamente con un volumen igual de una solución de alginato de sodio al 4% (w/v), para dar lugar a una suspensión final con concentración de alginatos de 2% (w/v) y de enzima equivalente a 3 U/ml.

La mezcla se dispersó, en forma de pequeñas gotas, en una solución 200mM de CaCl_2 ajustada a un pH de 5.4 con ácido acético. Las esferas gelificadas se mantuvieron por espacio de una hora en la solución de CaCl_2 , se lavaron y se conservaron en buffer de acetatos 0.05M, pH 5.4 con 0.1% (w/v) de CaCl_2 a 4°C.

Modificando el flujo de aire del sistema de aspersión se varió el tamaño de las esferas, obteniéndose por separación en tamiz, partículas con diámetros de 0.6, 1.6, 2.1, 3.8 y 4.2 mm. Estos catalizadores se utilizaron posteriormente para la determinación del efecto difusional intrapartícula. La distribución de tamaños se determinó midiendo el diámetro de una muestra de 50 esferas con un vernier.

Determinación de densidad del biocatalizador.

La densidad del catalizador se determinó evaluando el volumen desplazado por una determinada cantidad de catalizador. En una probeta con 10 ml de solución de CaCl_2 al 0.1% (w/v) se agregaron 3.6 g de catalizador húmedo y se observó el volumen desplazado.

Determinación de humedad del biocatalizador.

Se determinó gravimétricamente, por secado al vacío a 60°C y utilizando una termobalanza Ohaus. Las determinaciones en la termobalanza se realizaron a 85°C (0.5 watts), el tiempo de secado fue de aproximadamente una hora. Utilizando la termobalanza se evaluó la curva de secado del catalizador. En este caso es importante que la velocidad de secado sea lenta, para evitar la formación de una capa dura en la superficie de las esferas que dificulte la transferencia de masa.

Determinación de la fracción vacía del biocatalizador.

El valor de la fracción vacía (ϵ) es igual a la relación entre el volumen intrapartícula (vacío) y el volumen total que ocupa el catalizador y representa la fracción de volumen disponible para la reacción. Este parámetro se determinó midiendo el volumen desplazado por un volumen conocido de esferas.

Para la medición de la fracción vacía del catalizador, se tomó un volumen conocido de esferas y se secaron hasta alcanzar la humedad crítica. Posteriormente se vaciaron en 15 ml de solución de CaCl_2 al 0.1% (w/v). Se permitió que las esferas recuperaran el volumen original y se evaluó el volumen desplazado, éste corresponde al volumen que realmente ocupa la matriz del catalizador. La diferencia entre este volumen y el volumen total es el volumen vacío.

Determinación de los efectos difusionales internos del biocatalizador.

Para evaluar el efecto difusional intrapartícula sobre la velocidad inicial de la enzima inmovilizada, se calculó el factor de efectividad (η) para los diferentes tamaños de catalizador. El factor de efectividad corresponde a la relación de la velocidad inicial observada con el catalizador

completo entre la velocidad inicial observada con el catalizador previa desintegración. Las velocidades iniciales se determinaron a 30°C en presencia de 10% (w/v) de sacarosa como se describió anteriormente. En el caso de la evaluación del efecto de concentración de sustrato sobre el factor de efectividad, la concentración de sacarosa se varió en un rango de 10 a 300 g/l. Las reacciones se llevaron a cabo en reactores de 100 ml encaquetados, el medio de reacción se agitó con una propela para garantizar la homogeneidad de la reacción.

Determinación de la caída de presión en el sistema de lecho empacado.

Se montó un sistema según se ilustra en la figura 8, en el que se midió la caída de presión ocasionada por el biocatalizador a diferentes flujos volumétricos de solución de sustrato y a diferentes relaciones altura/diámetro del reactor. Se utilizó un manómetro de deformación del tipo de tubo Bourdon.

Las dimensiones del reactor utilizado fueron de 1.9 cm de diámetro interno (2.83 cm² de sección transversal) y una longitud de 1 a 5 veces el diámetro. Se introdujo sustrato (sacarosa 30% w/v + maltosa 10% w/v) a un flujo volumétrico constante en un rango entre 27 y 43 cm³/min. Las determinaciones se hicieron para el reactor empacado tanto con perlas de vidrio de 0.3 cm de diámetro ($\epsilon=0.4$), como con biocatalizador (diámetro=0.21 cm).

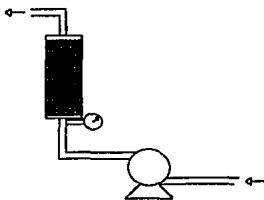


Figura 8. Esquema del sistema utilizado para la medición de la caída de presión dentro del reactor.

Para estimar la caída de presión se empleó la ecuación propuesta por Leva (Perry & Chilton, 1973):

$$\Delta P = \frac{2f_m \cdot G^2 \cdot L \cdot (1 - \varepsilon)^{3-n}}{d_p \cdot \rho \cdot g_c \cdot \Phi_s^{2-n} \cdot \varepsilon^3}$$

Donde:	$f_m = \frac{100}{Re}$	(para $Re < 10$).	Factor de fricción
	L		Longitud del lecho
	$Re = \frac{d_p \cdot G}{\mu}$		Número de Reynolds
	$G = \frac{Q \cdot \rho}{A}$		Velocidad másica por unidad de área seccional del lecho
	$n=1$	(para $Re < 10$)	
	$\Phi_s = 1$	para esferas.	Factor de forma

Determinación de la distribución de tiempos de residencia.

Se llevó a cabo el experimento del impulso con el fin de determinar la distribución de tiempos de residencia dentro del reactor de lecho empacado. Dicho experimento consiste en introducir instantáneamente una cierta cantidad de un trazador en el fluido que entra al reactor y registrar la concentración del trazador en el fluido que abandona el recipiente. De este experimento se genera una curva de respuesta de concentración de trazador con el tiempo C vs t . Posteriormente se evalúa el área por debajo de la curva, la media y la varianza de la distribución (Levenspiel, 1985).

El trazador utilizado fue una solución al 50% (v/v) de ácido ortofosfórico. Es importante que el volumen del trazador sea menor a 0.01 veces el volumen del reactor. Tomando en cuenta que el reactor tenía una capacidad de 2.1 cm^3 el volumen del trazador fue de 0.02 ml. El fluido utilizado fue un buffer de fosfatos 0.01M, pH 7.0 con 0.1% (w/v) de CaCl_2 . El pH a la salida del reactor se detectó con un microelectrodo Cole-Palmer. El potenciómetro se acopló a una computadora Macintosh con un programa capaz de adquirir datos a intervalos muy pequeños, en este caso 2 segundos. El sistema se representa en la figura 9. El reactor enchaquetado que se utilizó tenía 2.2 cm de altura por 1.1 cm de diámetro (sección transversal de 0.95 cm^2).

Los valores de pH adquiridos se convierten a concentración equivalente de iones hidronio. Posteriormente se calcula el área por debajo de la curva, que representa la cantidad total de trazador introducido (ecuación 1).

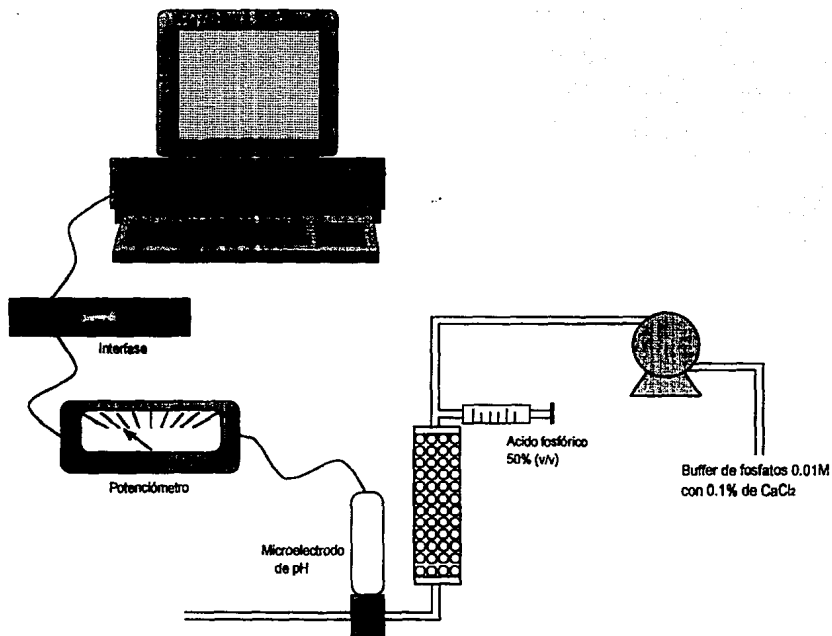


Figura 9. Diagrama del sistema utilizado para determinar la distribución de tiempos de residencia.

$$A = \int_0^{\infty} C dt = \sum C_j \Delta t_j \quad \dots (1)$$

Donde C es la concentración de trazador y t el tiempo.

La curva se normaliza dividiendo cada área individual entre el valor de A. Los valores obtenidos se grafican contra el tiempo, obteniéndose una curva cuya área es igual a 1. Con ésto se evalúa la media de la curva, que representa el tiempo de residencia promedio (ecuación 2).

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} t C dt}{\int_0^{\infty} C dt} \quad \dots (2)$$

En el caso que se tengan lecturas instantáneas de puntos equidistantes se puede utilizar una forma simplificada que se presenta en la ecuación 3.

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} (t_i + t_{i+1})(C_j + C_{j+1})(t_{i+1} - t_j)}{2 \sum_{i=1}^{n-1} (C_j + C_{j+1})(t_{i+1} - t_j)} \quad \dots (3)$$

Posteriormente se evalúa la varianza, que representa la dispersión de la distribución (ecuación 4).

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} t^2 C dt}{\int_0^{\infty} C dt} - \bar{t}^2 \quad \dots (4)$$

De igual forma se utilizó una forma simplificada para lecturas equidistantes, representada en la ecuación 5.

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} (t_i + t_{i+1})^2 (C_j + C_{j+1})(t_{i+1} - t_j)}{4 \sum_{i=1}^{n-1} (C_j + C_{j+1})(t_{i+1} - t_j)} - \bar{t}^2 \quad \dots (5)$$

Por último se calcula el número de dispersión, número adimensional, definido como: $\frac{D}{uL}$. O en

términos del número de Peclet: $\frac{D}{uL} = \frac{dp}{Pe \cdot L}$

Es posible demostrar que este número se encuentra relacionado con la varianza de la curva de distribución de tiempos de residencia de acuerdo con la ecuación 6 (Levenspiel, 1985).

$$\sigma^2 = 2 \frac{D}{uL} \quad \dots (6)$$

Los experimentos se llevaron a cabo a 30°C, con el reactor empacado con perlas de vidrio de 0.59 mm de diámetro o con biocatalizador (diámetro=0.21 cm).

Preparación del sustrato utilizado en la síntesis de oligosacáridos.

La composición del sustrato se presenta en la tabla 4. La nutritosa es un producto comercial y consiste en una solución concentrada que contiene 80% de maltosa. Fue proporcionada por la compañía BioEurope.

Tabla 4. Sustrato utilizado para la síntesis de oligosacáridos.

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	300
Nutritosa	125
Sulfito de sodio	1.0
Sorbato de potasio	1.0
Cloruro de calcio	0.7

El pH se ajusta 5.4 con H₂SO₄ al 50% (v/v).

Determinación del modelo cinético de la enzima inmovilizada.

Con el fin de proponer un modelo cinético que explicara el comportamiento de la enzima inmovilizada en la síntesis de oligosacáridos, se siguió el consumo de sacarosa durante el transcurso de una reacción por lote. El volumen de reacción fue de 90 ml, se agregó suficiente catalizador para tener 1.7 UI/ml de reacción. Se utilizó el sustrato para la síntesis de oligosacáridos, descrito anteriormente. La reacción se llevó a cabo a 30°C en un reactor agitado.

La concentración de sacarosa se determinó tanto por azúcares reductores previa inversión así como con un analizador YSI 2700 (Yellow Springs Instruments) equipado con una membrana para determinar sacarosa y otra para determinar D-glucosa.

Determinación de los efectos difusionales externos.

Para la determinación de los efectos difusionales externos se utilizó un sistema recirculado como el esquematizado en la figura 10.

La carga de enzima utilizada fue de 0.7281 UI/ml y el volumen de reacción de 25 ml, utilizando el sustrato para la síntesis de oligosacáridos. Se determinó la velocidad inicial a flujos volumétricos que se variaron entre 1.87 y 5.8 ml/min, estando el menor flujo determinado por la capacidad de la bomba utilizada. Se determinó la velocidad inicial en el recipiente fuera del reactor. El reactor empacado fue el mismo que se utilizó para determinar la distribución de tiempos de residencia. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C.

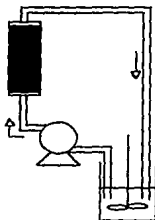


Figura 10. Diagrama del sistema experimental empleado en el estudio del efecto difusional externo en el reactor empacado con el biocatalizador de dextranosa.

Operación del reactor de lecho empacado.

Se montó un reactor encaquetado, empacado con catalizador (con una relación $L/D=1$) (figura 11) operando en continuo. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C con el sustrato definido para la síntesis de oligosacáridos. La alimentación se llevó a cabo por la parte superior del reactor. Se colocó un papel filtro a una distancia de aproximadamente 5 cm sobre la cama de catalizador con el fin de distribuir el sustrato en la sección transversal del reactor. El reactor tenía un área transversal de 78,5 cm².

Para verificar el modelo cinético, se varió el flujo volumétrico de alimentación y se determinó la conversión alcanzada midiendo azúcares reductores a la salida del reactor. El volumen de catalizador fue de 500 ml, que corresponde a 1682 UI totales. Cada vez que se modificaba el flujo, se dejaba pasar un tiempo equivalente al doble del tiempo de residencia, para asegurar que el reactor se encontraba en condiciones estables, de régimen permanente.

Evaluación de la estabilidad operacional.

El reactor descrito anteriormente se mantuvo operando en continuo durante 200 horas, con un flujo volumétrico de entrada igual a 1.4 ml/min. Se evaluó la conversión alcanzada determinando azúcares reductores a la salida del reactor.

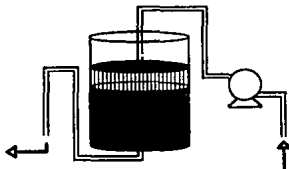


Figura 11. Esquema del reactor de lecho empacado en continuo empleado para evaluar el modelo cinético y la estabilidad operacional.

RESULTADOS Y DISCUSION

CARACTERIZACION DE LA ENZIMA

I. Producción de la glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299.

Se cuenta con un proceso estándar para la producción de la glucosiltransferasa (GT) de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 mediante una fermentación alimentada de un litro, siguiendo la metodología propuesta por López y Monsan (1980) y por Remaud-Simeon, *et al* (1993), de tal manera que se mantiene baja la concentración de sacarosa en el medio de cultivo durante la fermentación. Esto se lleva a cabo por adición continua de sacarosa durante la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo. Así se incrementa la producción de la enzima y se evita el fenómeno de represión catabólica.

En la figura 12 se presenta la cinética de una fermentación. Se encuentra actividad glucosiltransferasa asociada al paquete celular y otros insolubles (fracción insoluble), así como actividad extracelular. Como es de suponerse, la producción de enzima asociada a la fracción insoluble esta asociada al crecimiento, pues al haber mayor cantidad de biomasa, habrá mayor cantidad de enzima asociada a ésta. No ocurre lo mismo con la activada extracelular, es interesante que no se detecta actividad en el sobrenadante sino hasta después de transcurridas tres horas de fermentación. A las 6 horas se alcanza una concentración celular aproximada a 8.2 mg/ml ($D.O_{650nm}=14$); entonces, se centrifuga el caldo de fermentación. Bajo estas condiciones se obtiene un crecimiento y producción de enzimas según se reporta en la tabla 5.

Se puede observar que se obtiene una alta proporción de actividad glucosiltransferasa asociada a la fracción insoluble. La hipótesis que se reporta en la literatura considera que la enzima se encuentra formando un complejo con la dextrana: al sintetizarse alrededor de la célula (como parte de la cápsula) es de esperarse que se encuentre actividad enzimática asociada a las células (Brooker, 1977). Otra hipótesis posible es que la enzima contenga un péptido de anclaje a la membrana celular, el cual puede ser sujeto a una escisión posterior dando origen a la enzima extracelular. Estos péptidos de anclaje se encuentran en algunas enzimas presentes en las bacterias lácticas (Kok, 1990). La confirmación de esta hipótesis, para este caso en particular, implica el conocimiento de la genética molecular involucrada en la biosíntesis de las dextran-sacarosas.

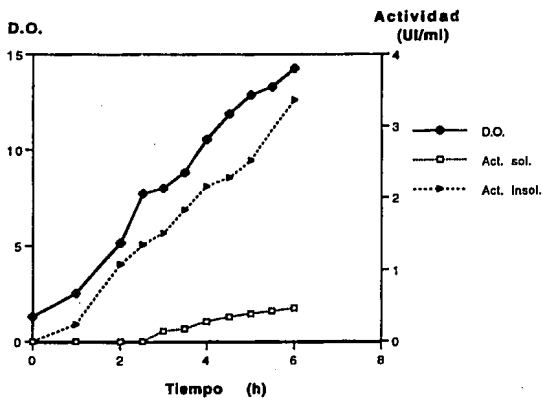


Figura 12. Cinética de una fermentación alimentada con la cepa B-1299 de *Leuconostoc mesenteroides*

V de trabajo=1L, pH=5.5, agitación 400 rpm,
aireación 0.5 vvm, T=29°C.

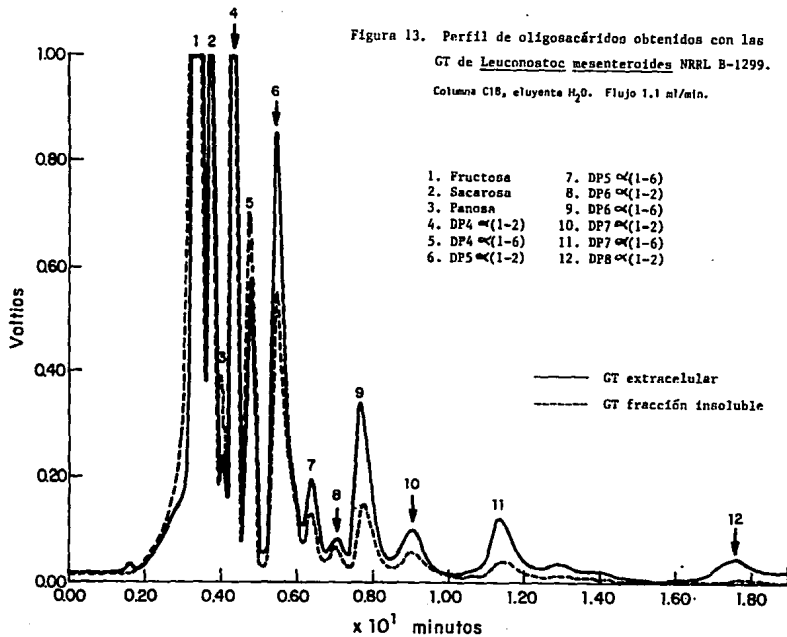
Tabla 5. Producción y distribución de la actividad GT B-1299 en cultivo alimentado.

Volumen de fermentación	900 ml
Actividad GT total	3.563 UI/ml ($\sigma=0.242$)
Actividad extracelular	0.447 UI/ml ($\sigma=0.0198$)
Porcentaje de actividad GT en la fracción extracelular	12.6%
Actividad en la fracción insoluble	0.379 UI/mg ($\sigma=0.0088$)
Concentración de la fracción insoluble	8.2 mg/ml ($\sigma=0.4$)
Actividad en la fracción insoluble	3.118 UI/ml ($\sigma=0.222$)
Porcentaje de actividad GT en la fracción insoluble	87.4%

II. Síntesis de oligosacáridos con la glucosiltransferasa extracelular y asociada a la fracción insoluble de *L. mesenteroides* B-1299.

Se llevó a cabo la síntesis de oligosacáridos en presencia de maltosa como azúcar aceptor con el fin de comparar el perfil de productos obtenidos con la enzima extracelular y la enzima asociada al paquete celular. Ambas síntesis se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de reacción (concentración de sustrato, aceptor y enzima), como ya se mencionó en materiales y métodos. Los cromatogramas correspondientes se presentan en la figura 13.

Como se puede observar, ambas fracciones sintetizan el mismo tipo de productos, por lo que se podría utilizar cualquiera de estas dos preparaciones para la síntesis de los oligosacáridos de interés. Sin embargo, esta no es una prueba de que se trate de la misma enzima. El perfil de oligosacáridos obtenido es el mismo que el reportado anteriormente por Remaud-Simeon, *et al* (1993). En dicho trabajo se hace un estudio de RMN de ^{13}C de los oligosacáridos obtenidos, determinándose la presencia de enlaces α -(1 \rightarrow 2) en algunos de ellos. Los compuestos marcados con una flecha, en la figura 13, representan los oligosacáridos con enlace α -(1 \rightarrow 2), los cuales se encuentran con un grado de polimerización de 4 a 8.



Teniendo conversiones similares ($\approx 90\%$), la enzima extracelular presenta una mayor producción de oligosacáridos, lo que puede deberse a que la enzima presente en la fracción insoluble está sujeta a un efecto difusional de sustrato y productos, especialmente cuando éstos son de alto peso molecular ($> D.P. 4$).

III. Estabilidad de las preparaciones enzimáticas al pH.

Se pueden obtener tres preparaciones enzimáticas al término de la fermentación: enzima soluble (extracelular) parcialmente purificada con PEG; fracción insoluble (actividad asociada a dextrana y a células) y una mezcla de ambas actividades.

Tomando en cuenta los resultados anteriores se consideró la posibilidad de inmovilizar la fracción de GT insoluble o la mezcla de las actividades soluble e insoluble. Se pensó que, en vista de la baja actividad extracelular obtenida en la fermentación, no valía la pena considerar la inmovilización de esta fracción, sin embargo se determinó su estabilidad únicamente para tomarla como referencia.

Con el fin de definir ventajas y desventajas al optar por alguna de las posibilidades, fue necesario determinar la estabilidad de la enzima a diferentes pHs. Esto es importante, ya que en experiencias anteriores, del grupo de Monsan en Francia, se observó que al llevar a cabo la reacción de síntesis de oligosacáridos, en ocasiones había una disminución de pH, debido a que las células inmovilizadas aún presentaban actividad metabólica.

Las determinaciones se llevaron a cabo, de manera preliminar, con la fracción soluble a 32 °C. Los resultados se muestran en la figura 14. Después de 400 horas de almacenamiento a diferentes pHs, la enzima extracelular presentó una mayor actividad residual a pH de 5.4, mientras que a un pH de 4.8 fue menos estable; por esta razón se tomaron dichos valores como los extremos en experimentos posteriores. A pH 5.2 la GT extracelular presentó una vida media de aproximadamente 340 horas. La vida media ($t_{1/2}$) se define como el tiempo en que se pierde el 50% de la actividad inicial. Al trabajar a 32 °C, los ensayos llevaban mucho tiempo, por lo que se trabajó posteriormente a 40 °C. A esta temperatura la fracción soluble a pH 5.2, presentó un $t_{1/2}$ de aproximadamente 30 minutos. Los resultados se presentan en la figura 15.

Si se considera que la desactivación enzimática sigue una cinética de primer orden, al graficar el logaritmo natural de la actividad contra el tiempo, se obtiene una recta cuya pendiente es la constante de inactivación. En la tabla 6 se muestran las constantes de inactivación a 32 y 40 °C en función del pH, para la enzima extracelular.

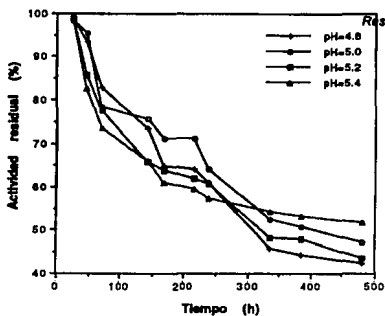


Figura 14. Estabilidad de la GT B-1299 soluble al pH. (32 °C)

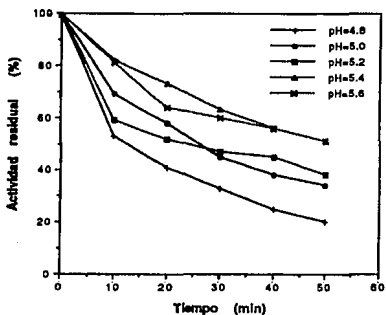


Figura 15. Estabilidad de la GT B-1299 soluble al pH. (40 °C)

Tabla 6. Constantes de inactivación de la GTB-1299 extracelular.

pH	k 32 °C (h ⁻¹)	k 40 °C (min ⁻¹)
4.8	1.97 E-3	3.01 E-2
5.0	1.60 E-3	2.63 E-2
5.2	1.67 E-3	1.65 E-2
5.4	1.23 E-3	1.32 E-2

Al analizar los valores de k se observa que, un valor mayor corresponde a una pendiente de inactivación mayor y, por lo tanto, a una menor estabilidad. Debido a que el efecto del pH es más evidente a 40 °C, los siguientes experimentos se llevaron a cabo a esta temperatura.

En la figura 16 se compara el resultado del comportamiento de las tres preparaciones enzimáticas a 40 °C bajo las condiciones de pH extremas (4.8 y 5.4). A pH 5.4 la enzima extracelular presentó un $t_{1/2}$ de casi 15 minutos, mientras que la enzima de la fracción insoluble al mismo pH tuvo un $t_{1/2}$ mayor de 50 minutos. Se observa una tendencia similar a pH 4.8. En la tabla 7 se presentan los valores de las constantes de desactivación para las tres preparaciones enzimáticas.

Tabla 7. Constantes de inactivación de las preparaciones de GTB-1299 en función del pH.

	pH 4.8 k (min ⁻¹)	pH 5.4 k (min ⁻¹)
Fración insoluble	1.66 E-2	1.14 E-2
Fración soluble	4.31 E-2	2.76 E-2
Mezcla de ambas	3.43 E-2	1.48 E-2

La enzima extracelular fue la preparación enzimática menos estable, mientras que la fracción asociada al paquete celular (insoluble) presentó mayor estabilidad; como es de suponer, la mezcla de ambas fracciones tuvo un comportamiento intermedio. Esto se puede deber a que la enzima insoluble tiene un microambiente diferente a la enzima extracelular, donde no se observa un efecto tan importante del pH sobre la velocidad de desactivación de la enzima.

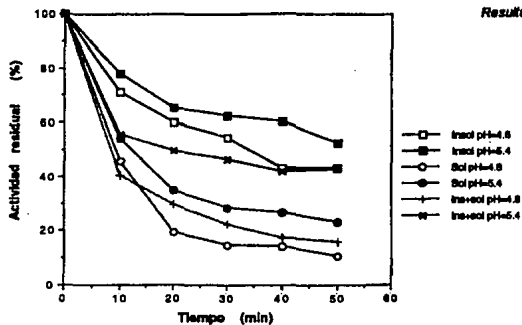


Figura 16. Estabilidad de las GT B-1299 al pH.
(40 °C)

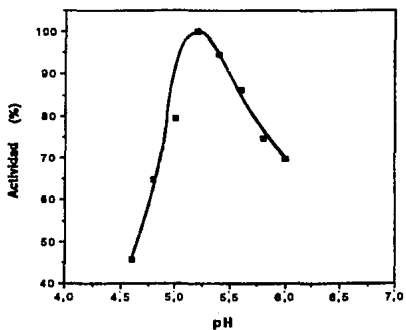


Figura 17. Perfil de pH de la GT B-1299 insoluble.
(30 °C)

Tomando en cuenta estos resultados, se concluye que la enzima asociada a la fracción insoluble es la más indicada para la elaboración del biocatalizador. Adicionalmente se debe tomar en cuenta que la utilización del PEG aumenta el costo del catalizador. El costo de manufactura debe mantenerse bajo, considerando que los oligosacáridos sintetizados serán utilizados como aditivo en alimentos para consumo animal.

Los experimentos subsecuentes se llevaron a cabo con la enzima asociada a la fracción insoluble únicamente o con el catalizador elaborado con esta porción del cultivo.

IV. Determinación del perfil de pH de la fracción enzimática insoluble.

Se determinó el perfil de actividad enzimática al pH, obteniéndose el comportamiento que se presenta en la figura 17, donde se puede observar que la actividad enzimática se presenta en un rango relativamente estrecho de pH, disminuyendo drásticamente en condiciones ácidas. Este comportamiento es similar al observado con las cepas B-512 y B-523 de *Leuconostoc mesenteroides* (Alsop, 1983; Durán, 1990).

Se sabe que el pH del medio de reacción influye en la distribución de cargas en los aminoácidos básicos y ácidos de la enzima. Este efecto es particularmente importante en la superficie y en las zonas vecinales al sitio activo.

De acuerdo al mecanismo de reacción propuesto por Robyt (Fu & Robyt, 1988), existen dos residuos de histidina en el sitio activo, esenciales para la actividad enzimática. El mecanismo involucra diferentes estados de ionización de los respectivos grupos imidazol. Dado que en condiciones ácidas los grupos se encuentran preferentemente protonados, y que la especie no protonada es necesaria en la reacción, resulta congruente observar una caída drástica de actividad hacia el pH ácido. En un reporte más reciente, se aislaron y secuenciaron dos péptidos que aparentemente pertenecen a los respectivos sitios activos de las glucosiltransferasas I y S de *Streptococcus sobrinus*. En ambos se encuentran grupos aspárticos que parece están implicados en la catálisis, ya que actúan como los grupos nucleófilos del sitio activo (Moojer et al, 1991). En este caso, también se supone que el grupo carboxilo debe estar no protonado. Tomando en cuenta lo anterior, se puede explicar el efecto tan severo del pH sobre la actividad de la enzima.

El pH óptimo resultó ser de 5.2; sin embargo es importante establecer un compromiso entre el pH de máxima actividad y el pH de máxima estabilidad. Se decidió, entonces, que el pH de trabajo sería el de máxima estabilidad, ésto es a pH 5.4 (a este pH se tiene el 95% de la actividad, tomando como 100% la actividad al pH óptimo).

V. Estudio cinético de la fracción insoluble de la enzima B-1299.

En el estudio cinético de la fracción enzimática insoluble, se utilizó 1 UI/ml de reacción y se determinó la velocidad inicial en presencia de sacarosa en un rango de 10 a 300 g/l. Se siguió el mismo procedimiento para las reacciones en presencia de maltosa, manteniéndose una relación sacarosa/maltosa (w/w) de tres. En la figura 18 se observa el comportamiento cinético de la enzima bajo ambas condiciones de reacción.

La enzima, en presencia de sacarosa, sigue el modelo de Michaelis-Menten, con una K_m de 10.15 g/l y una $V_{máx}$ de 0.988 UI/ml (determinados por la linealización de Lineweaver-Burk), pero se observa un ligero efecto inhibitorio a concentraciones de sustrato mayores de 200 g/l. Este comportamiento, que se observa también en la dextranasa de la cepa B-512F (Martínez-Espíndola & López-Munguía, 1985), es un efecto inhibitorio por exceso de sustrato. Recientemente, se ha explicado como el resultado de la interacción de la sacarosa con un tercer sitio de unión (de baja afinidad) con la enzima, que da como resultado cambios alostéricos en la conformación del sitio activo de tal manera que no se puede sintetizar dextrana, pero sí productos de aceptor (Tanriseven & Robyt, 1993).

Por otra parte, en presencia de un azúcar aceptor (maltosa) se observa un aumento de la velocidad máxima de reacción, efecto también observado en la dextranasa de la cepa NRRL B-512F (Paul *et al*, 1986). Al linealizar la ecuación de Michaelis-Menten por el método de Lineweaver-Burk se obtiene un valor de K_m de 13.67 g/l y un valor de $V_{máx}$ de 1.44 UI/ml, diferenciando considerablemente de lo observado en la figura 18. El método de Lineweaver-Burk tiene la desventaja de que los puntos determinados a altas concentraciones de sustrato no tienen un impacto significativo en la linealización. Por esta razón, se probaron los métodos de Woolf-Augustinsson-Hofstee, de Eadie-Scatchard y la de Hanes-Woolf, siendo este último el que mejor se ajustó a los resultados experimentales. Con este método se obtuvo un valor de K_m de 45.3 g/l y un valor de $V_{máx}$ de 2.73 UI/ml. En las figuras 19 y 20 se presentan ambas linealizaciones, y en el anexo A se resumen los métodos de linealización.

Tomando en cuenta que las reacciones se llevaron a cabo con 50 mg de insolubles en un volumen de 12 ml, en la tabla 8 se reporta la velocidad máxima en UI/mg de insolubles.

La presencia de maltosa en la reacción aumenta la velocidad máxima aproximadamente 3 veces. Esta activación puede deberse a que el residuo glucosilo se transfiere con mayor velocidad al azúcar aceptor que al complejo enzima-dextranosilo que se forma cuando la sacarosa es el único sustrato, probablemente ocurre algún cambio conformacional en el sitio activo que favorece la transferencia hacia el aceptor. Otra posible explicación es que en presencia de aceptor, a un tiempo determinado, cada grupo nucleófilo del sitio activo sea responsable de la síntesis de una

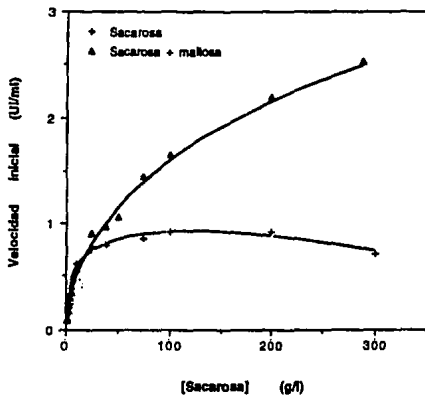


Figura 18. Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad inicial de la GT B-1299. (30 °C, pH 5.4, 1U/ml)

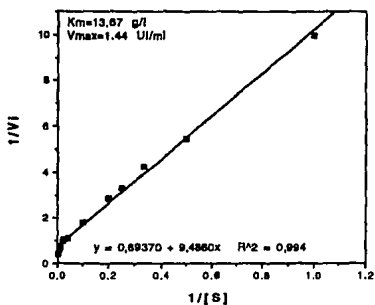


Figura 19. Linearización de Lineweaver-Burk.

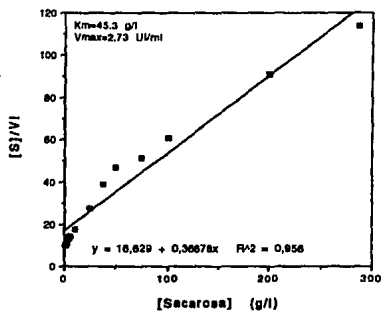


Figura 20. Linearización de Hanes-Woolf.

Tabla 8. Propiedades cinéticas de la GT insoluble de *Leuconostoc mesenteroides* B-1289

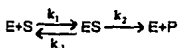
Condiciones de reacción	K_m para sacarosa (g/l)	V_{max} (UI/mg insolubles)
Sacarosa	10.15	0.237
Sacarosa/maltosa=3 *	45.39	0.654

* Calculados por el método de Hanes-Woolf.

molécula de oligosacárido, ésto es, se consumen simultáneamente dos moléculas de sustrato por molécula de enzima, mientras que en ausencia de aceptor, en el mismo tiempo, sólo se consume una molécula de sustrato por molécula de enzima.

Por otra parte, el valor de K_m aumenta en presencia del aceptor. Dado que el sustrato es el mismo y que la velocidad de reacción es mayor en presencia de aceptor, no se puede interpretar este aumento como una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Si tomamos en cuenta que la reacción catalizada por la enzima es la siguiente:



Donde E=enzima libre, S=sustrato, ES= complejo enzima-sustrato, P=producto y k_1 , k_{-1} y k_2 son constantes de velocidad.

De acuerdo a la teoría del estado estacionario, la constante de Michaelis-Menten se define como:

$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$. Si $K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$, donde K_S es la constante de disociación del complejo ES, la cual se

relaciona con la afinidad de la enzima por el sustrato. Entonces $K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_1} \approx K_S$, sólo cuando

$k_2 \ll k_{-1}$.

Si suponemos que las constantes k_1 y k_{-1} tienen el mismo valor en presencia y en ausencia del aceptor, el aumento en el valor de la K_m se explicaría por un aumento en el valor de k_2 . De hecho, si la reacción involucra a otro sustrato, y si consideramos a la maltosa como sustrato, su efecto se debe incluir en k_2 (Dixon & Webb, 1979).

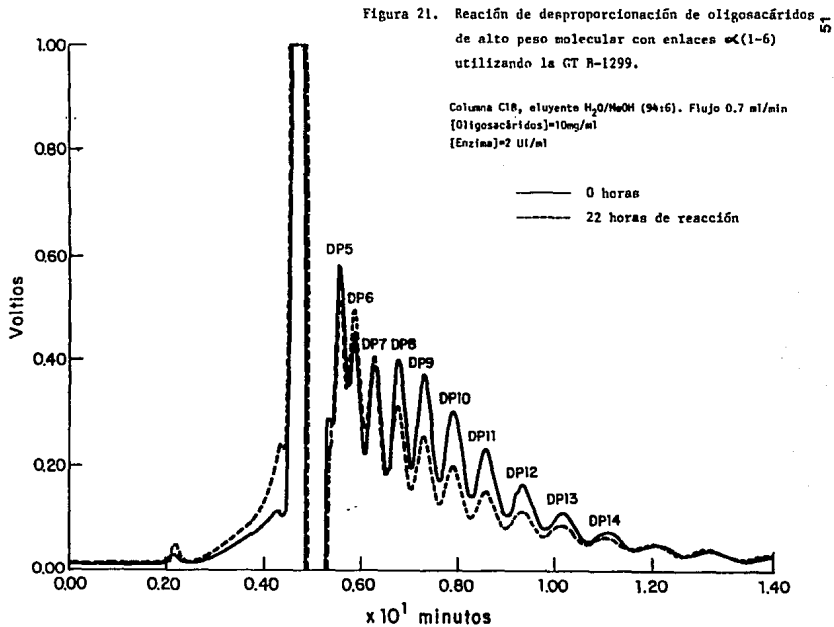
VI. Reacciones de desproporción.

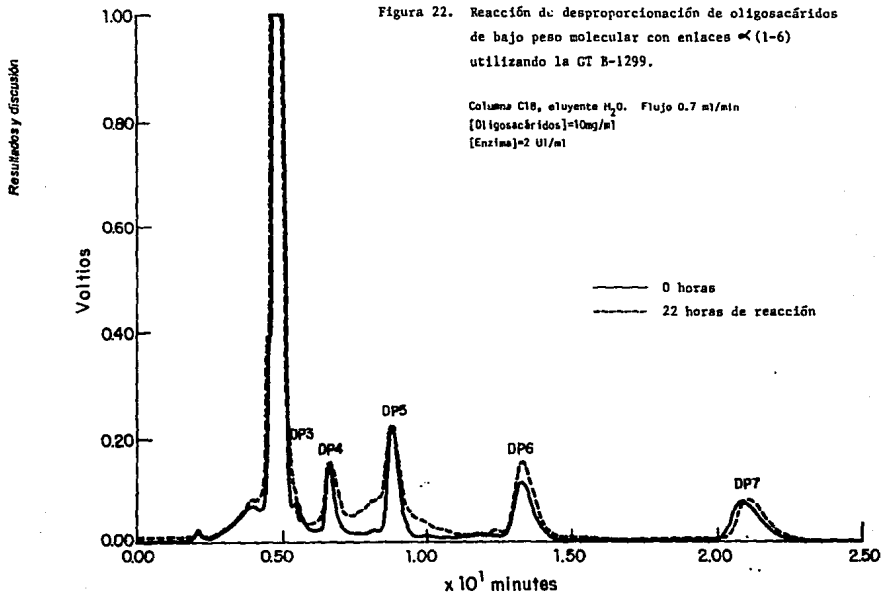
Las reacciones de desproporción se llevaron a cabo con la fracción insoluble de la enzima B-1299 bajo las condiciones previamente descritas. Se experimentó con oligosacáridos obtenidos con la GT de la cepa B-512, que presentan enlaces α -(1 \rightarrow 6) exclusivamente, con un grado de polimerización de 3 a 15 (D.P. 3 a D.P. 15). También se hicieron las reacciones con oligosacáridos obtenidos con la GT B-1299, con presencia de enlaces α -(1 \rightarrow 2) y α -(1 \rightarrow 6), en un rango de D.P. 3 a D.P. 8.

Las figuras 21 y 22 muestran el cambio de perfil de productos B-512 después de 22 horas de reacción. Por otro lado, el cambio de perfil de oligosacáridos obtenidos con la enzima B-1299 después de 22 horas de reacción se presenta en la figura 23.

Se realizó una curva patrón para relacionar el área de los picos del cromatograma con el peso de muestra inyectada, encontrándose una relación lineal peso/área con un valor de pendiente de 1.037×10^{-9} . Las concentraciones de los productos se obtuvieron tomando en cuenta que se inyectaron 10 μ l de muestra. En la tabla 9 se presenta la velocidad de desproporción de los oligosacáridos.

En las reacciones de desproporción, que se llevan a cabo en ausencia de sacarosa, se transfiere un residuo glucosilo de un oligosacárido a otro. Se puede observar que con los oligosacáridos B-512 se favorece la transferencia hacia oligosacáridos de bajo grado de polimerización, al aumentar la cantidad de D.P. 3, 4, y 6. En el caso de los oligosacáridos B-1299 se observa que se transfiere a oligosacáridos con enlaces α -(1 \rightarrow 6). Es importante hacer notar que en ninguno de los casos se transfiere en posiciones α -(1 \rightarrow 2). Este comportamiento resulta sorprendente, pues era de esperar que se transfiriera con ambos tipos de enlace. Probablemente, los grupos nucleofílicos del sitio activo se orientan de manera diferente durante la síntesis "de novo" del oligosacárido que en el caso de que el azúcar donador sea otro oligosacárido. Probablemente por razones estéricas no se transfiere hacia oligosacáridos de alto grado de polimerización. También se observa que ocurre un aumento de la concentración de glucosa y maltosa, por lo que se concluye que la enzima bajo estas condiciones lleva a cabo reacciones de hidrólisis, siendo el aceptor una molécula de agua.





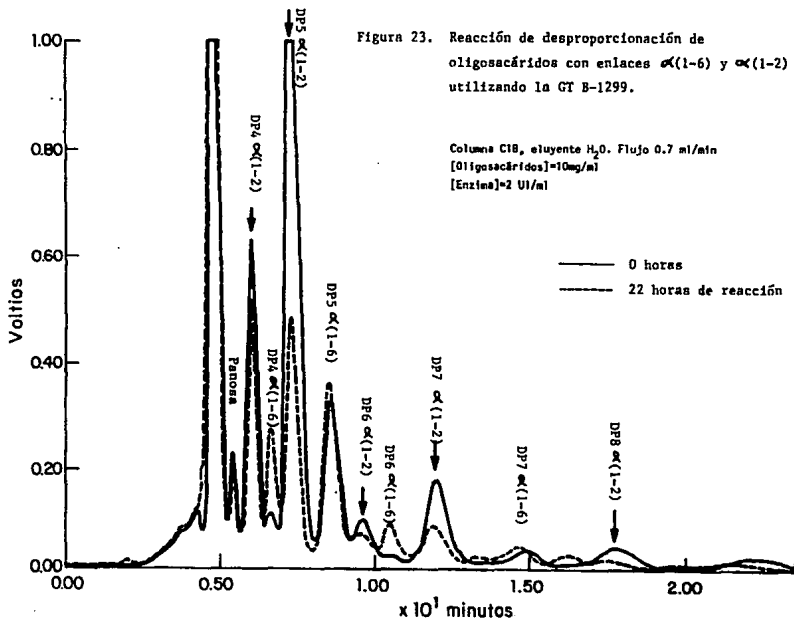


Tabla 9. Velocidad de las reacciones de desproporción con la GT B-1299.

Oligosacáridos B-512				Oligosacáridos B-1299			
	S_0 (g/l)	S_f (g/l)	V (g/l/h)		S_0 (g/l)	S_f (g/l)	V (g/l/h)
G+M+D.P. 3	3.089	3.322	1.08 E-02	G+M	3.277	4.419	5.19E-02
D.P. 4	0.262	0.270	3.55 E-04	Panosa	0.326	0.037	-1.31E-02
D.P. 5	0.887	0.808	-3.67E-03	D.P. 4 $\alpha(1\rightarrow2)$	1.551	1.060	-2.23E-02
D.P. 6	0.644	0.928	1.28 E-02	D.P. 4 $\alpha(1\rightarrow6)$	0.042	0.592	2.50E-02
D.P. 7	0.794	0.838	-7.18E-03	D.P. 5 $\alpha(1\rightarrow2)$	3.270	1.281	-9.13E-02
D.P. 8	0.700	0.888	-5.43E-04	D.P. 5 $\alpha(1\rightarrow6)$	0.950	1.262	1.42E-02
D.P. 9	0.887	0.583	-4.74E-03	D.P. 6 $\alpha(1\rightarrow2)$	0.259	0.035	-1.02E-02
D.P. 10	0.546	0.460	-3.92E-03	D.P. 6 $\alpha(1\rightarrow6)$	0.0	0.183	8.34E-03
D.P. 11	0.327	0.319	-3.78E-04	D.P. 7 $\alpha(1\rightarrow2)$	0.748	0.284	-2.20E-02
D.P. 12	0.178	0.162	-6.32E-04	D.P. 7 $\alpha(1\rightarrow6)$	0.138	0.111	-1.13E-03
D.P. 13	0.122	0.071	-2.31E-03	D.P. 8 $\alpha(1\rightarrow2)$	0.227	0.032	-8.85E-03
D.P. 14	0.081	0.053	-1.29E-03				
D.P. 15	0.05	0.010	-1.81E-03				

Donde G=glucosa, M=maltosa, D.P.=grado de polimerización, S_0 =concentración de sustrato inicial y S_f =concentración final. Estas velocidades corresponden a una actividad enzimática de 2 UI/ml. (El signo negativo representa disminución en la concentración del oligosacárido).

CARACTERIZACION DEL BIOCATALIZADOR

VII. Inmovilización de la glucosiltransferasa, fracción insoluble.

Tomando en cuenta que la GT B-1299 insoluble se produce en mayor proporción y que presenta una mayor estabilidad ante variaciones de pH, se decidió inmovilizar esta fracción enzimática. Se inmovilizó por atrapamiento en gel de alginatos, ya que es un soporte que presenta buenas características de resistencia, es inerte, de bajo costo y poco agresivo para la enzima.

El procedimiento de inmovilización se describe en materiales y métodos. Se partió de 75 ml de una suspensión de insolubles con 6 UI/ml. Se obtuvieron 102g (peso húmedo) de catalizador con 4.1 UI/g de catalizador húmedo, esto representa un rendimiento de inmovilización de 93%.

De la misma manera, se produjeron 5 lotes de catalizador de diferentes tamaños y con distribuciones relativamente uniformes. A continuación se presentan los valores de los diámetros promedio, las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis:

0.59 mm (tamizado en malla 30),	1.6 mm ($\sigma=0.2159$),
2.1 mm ($\sigma=0.1288$),	3.8 mm ($\sigma=0.447$),
4.2 mm ($\sigma=0.1295$).	

VIII. Efecto difusional interno.

Las limitaciones difusionales internas representan con frecuencia un problema importante en los catalizadores de células inmovilizadas por atrapamiento en gel. En estos sistemas, la velocidad de reacción se ve afectada por la velocidad de difusión del sustrato desde la superficie del biocatalizador hasta el sitio donde se encuentra la enzima en el interior de la partícula.

Específicamente, en el caso de la síntesis de oligosacáridos este efecto resulta importante, considerando el peso molecular de los productos. Se han propuesto dos alternativas para minimizar los efectos difusionales internos: disminuir la carga de enzima (disminuir la velocidad del proceso cinético) o disminuir el tamaño de partícula. Se prefiere la segunda opción, eligiendo un tamaño de partícula pequeño, pero lo suficientemente grande para evitar caídas de presión considerables en el caso de que el catalizador vaya a ser utilizado en un reactor de lecho empacado.

Con el fin de elegir un tamaño de partícula que no presente una barrera difusional interna importante, se determinó el factor de efectividad para los diferentes catalizadores. El factor de efectividad (η) representa la relación entre la velocidad inicial de reacción observada en condiciones de limitación difusional (V_{obs}) y la velocidad inicial de reacción sin resistencias difusionales (V^*). Esta última se determina con el catalizador desintegrado, ya que el tamaño de partícula es lo suficientemente pequeño como para suponer que la difusión es mucho más rápida que la velocidad de reacción. La V_{obs} podrá estar determinada por la velocidad de transferencia de masa intrapartícula, mientras que la V^* será controlada cinéticamente; el control será cinético cuando ambas sean iguales, esto es, cuando se trabaja bajo régimen permanente.

En la figura 24 se puede observar el efecto del tamaño de partícula sobre el factor de efectividad. De acuerdo a estos resultados, un tamaño de partícula de 2 mm es recomendable, ya que no presenta limitaciones difusionales ($\eta=0.995$). Los experimentos subsecuentes se llevaron a cabo con catalizadores de este diámetro.

Es interesante conocer la dependencia del factor de efectividad al variar la concentración de sustrato. En la figura 25 se observa que a concentraciones menores de 100 g/l la velocidad de

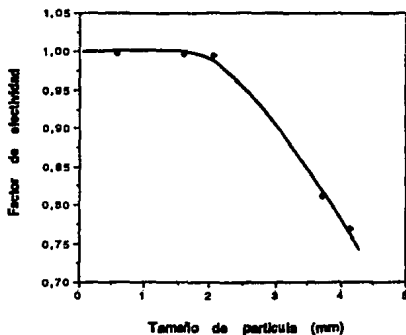


Figura 24. Efecto del tamaño de partícula sobre el factor de efectividad de un catalizador de células inmovilizadas con actividad GT. $S=100\text{g/l}$

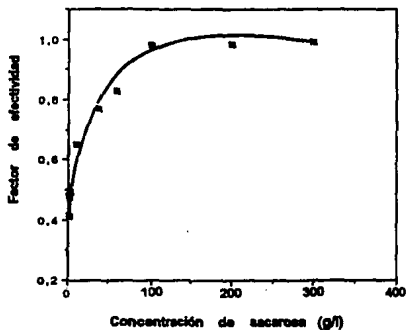


Figura 25. Efecto de la concentración de sustrato sobre el factor de efectividad de un catalizador de células inmovilizadas con actividad GT. $d_p=0,2\text{cm}$

reacción cambia de un control cinético a un control difusional. Esto se debe a que al haber menor cantidad de sustrato, la difusión de éste hacia la enzima (que bajo estas condiciones se encuentra en exceso) será el paso limitante de la reacción. Si se toma en cuenta que el catalizador se va a encontrar en un reactor de lecho empacado, este efecto puede resultar importante en la zona de la salida del reactor, donde la concentración de sustrato, en las condiciones óptimas, será muy baja.

IX. Caracterización física del catalizador.

Una vez elegido el tamaño de partícula óptimo, en términos de resistencia difusional interna, se siguió con la determinación de las características físicas del biocatalizador.

La densidad se determinó por desplazamiento de un volumen de agua por una cantidad determinada de catalizador húmedo. Se hicieron varias determinaciones y se encontró que, en promedio, el catalizador presenta una densidad de 0.894 g/cc ($\sigma=0.0341$).

En lo que respecta a la medición de humedad se obtuvo un valor promedio de 90.6% ($\sigma=0.4038$).

Un parámetro muy importante dentro de la caracterización de un biocatalizador, es la fracción vacía (ϵ). Esta fracción representa el volumen interpartícula, no ocupado por el catalizador, que queda disponible para ser ocupado por el líquido de la reacción. Este valor es necesario para la posterior caracterización del reactor de lecho empacado, pues se ve involucrado en los cálculos de la caída de presión, tiempos de residencia, etc. como se verá más adelante.

No existen muchos métodos para determinar el valor de este parámetro. Además del método de desplazamiento de un volumen de líquido por las partículas de catalizador, se pueden utilizar otros, más sofisticados, que consisten en hacer una cromatografía de exclusión. En el caso de querer conocer solamente el volumen interpartícula se utiliza un marcador de peso molecular extremadamente alto, como la dextrana azul. Y si se quiere conocer el tamaño de poro se pueden utilizar proteínas de tamaño conocido (Buchholz, 1979; Stewart, 1993).

Utilizando el método de desplazamiento de volumen, descrito en materiales y métodos, se encontró que el biocatalizador húmedo presenta una $\epsilon=0.56$ (5 ml de catalizador desplazan 2.2 ml). Sin embargo, al hacer el estudio de la distribución de tiempos de residencia, se observó que tomando en cuenta este valor para el cálculo de tiempo de residencia (ecuación 12), el resultado difiere de las observaciones experimentales. De acuerdo al tiempo de residencia experimental, el catalizador debería tener una $\epsilon>0.56$.

Resulta evidente que el gel de algínatos presenta cierta cantidad de agua que puede ser sustituida por la solución de sustrato. Se propone que esta última fracción representa el "agua libre" de hidratación del gel. Con el fin de evaluar la fracción vacía del catalizador una vez eliminada el agua libre de hidratación, se determinó la curva de secado.

En la figura 26 se presenta la curva de secado y en la figura 27 la velocidad de secado en función del contenido de humedad.

Se pueden observar 3 periodos de secado:

1. Un período donde la velocidad va en aumento (en los primeros 4 min). Al principio el catalizador tiene que alcanzar la temperatura de equilibrio, lo que ocasiona una alta velocidad de evaporación.
2. Un período de velocidad de secado constante (de 4 a 16 minutos de secado), que corresponde a la evaporación del agua libre. En esta zona la velocidad de transferencia de calor está en equilibrio con la velocidad de transferencia de masa en la superficie. El agua libre puede difundir dentro del sólido hacia la superficie donde se evapora a velocidad constante. Este período se mantiene mientras la velocidad de difusión hacia la superficie sea igual que la velocidad de evaporación.
3. Un período de velocidad de secado decreciente (de los 16 minutos en adelante). Cuando el agua libre se elimina, el agua ligada se empieza a evaporar. Debido a que es inmóvil y a su ubicación, el agua se debe evaporar dentro de la partícula y después difundir fuera de la partícula hacia el gas que la rodea, por esto la velocidad de secado es más lenta. Este período comienza cuando se alcanza el contenido de humedad crítico.

De acuerdo a los resultados se observa que la humedad crítica es de aproximadamente 40%. Por lo que se secó el catalizador hasta alcanzar esta humedad y se determinó la fracción vacía, como se describió previamente, resultando ser de 0.7389 ($\sigma=0.00516$) (3.55 ml desplazados por 13.6 ml de catalizador). En la tabla 10 se resumen las características físicas del biocatalizador.

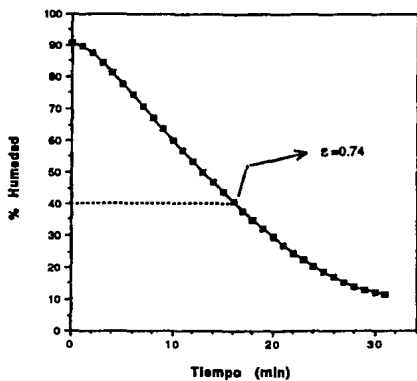


Figura 26. Curva de secado del catalizador de alginatos.

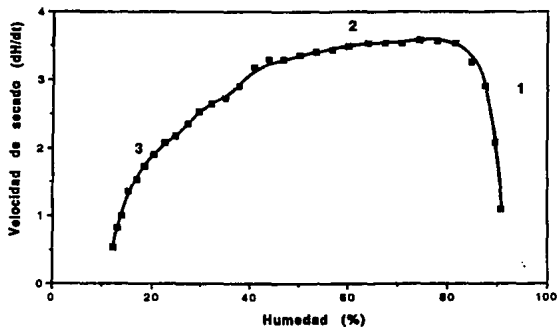


Figura 27. Velocidad de secado del catalizador de alginatos.

Tabla 10. Propiedades del biocatalizador.

Actividad	4.1 UI/g
Tamaño de partícula	2.1 mm
Factor de efectividad*	0.995
Densidad	0.894 g/ml
Humedad	90.6%
Fracción vacía	0.74

*Para una [S] de 100 g/l.

X. Modelo cinético de la reacción en lote.

Para el diseño de un reactor, es necesario contar con un modelo cinético que represente adecuadamente el comportamiento de la reacción. Con este modelo se podrá determinar la velocidad de reacción lo que permitirá definir el tiempo necesario para alcanzar cierta conversión y el volumen necesario para una determinada productividad.

La determinación de las constantes cinéticas de la enzima se lleva a cabo en los primeros minutos de la reacción y no se toma en cuenta lo que sucede posteriormente. Por esta razón es importante verificar el comportamiento de la enzima inmovilizada durante la síntesis de oligosacáridos a lo largo de toda la reacción. Para verificar la validez del modelo, se siguió el consumo de sacarosa durante el transcurso de una reacción en lote.

La concentración inicial de sacarosa fue de 300g/l (877.2mM), en un volumen de reacción de 90 ml y la carga de catalizador fue equivalente a una actividad de 1.6807 UI/ml de reacción, medida en presencia de maltosa. Cuando la actividad se midió sólo con sacarosa fue de 0.918 UI/ml. Adicionalmente, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten y con los valores para los parámetros obtenidos previamente, se calculó la concentración de sustrato a cada tiempo. Se utilizaron los valores de K_m obtenidos por los métodos de Lineweaver-Burk (13.67g/l=40mM) y Hanes-Woolf (45.39g/l=132.46mM). En la figura 28 se presentan los resultados experimentales, así como el resultado de la predicción teórica con los dos valores de K_m .

Se observa que la predicción que mejor se ajusta es la obtenida utilizando el K_m calculado por la linearización de Hanes-Woolf; comprobando que, a pesar de haber tenido un mal coeficiente de correlación, representa mejor el comportamiento de la enzima. Por otra parte, la mejor predicción se desvía de las observaciones experimentales a partir de los 250 min. Esto es, se sigue el

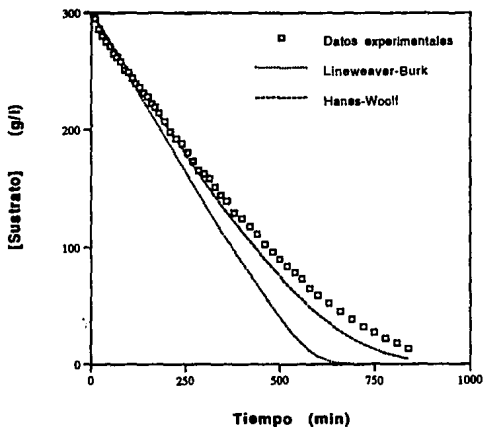


Figura 28. Reacción en lote con células inmovilizadas con actividad GT B-1299.

(30°C, pH 5.4, act. equivalente a 1.68 UI/ml)

Sustrato: Sacarosa 300 g/l, maltosa 100 g/l.

comportamiento del modelo de Michaelis-Menten durante los primeros minutos, pero conforme transcurre el tiempo, la reacción se hace más lenta desviándose del modelo. Una posible explicación es que al principio de la reacción el aceptor inicial (maltosa) es el más activo; conforme avanza la reacción, la concentración de maltosa decrece apareciendo productos de la reacción de aceptor (panosa, D.P.4, D.P.5, etc.) Cada producto es un aceptor más débil que el previo, de tal manera que la velocidad de reacción va cambiando con el transcurso del tiempo. El modelo, por el contrario, supone que la relación sacarosa/maltosa se mantiene constante. Se propone, entonces, que la velocidad de la reacción está determinada por la suma de las velocidades de reacción con los diferentes aceptores:

$$V_T = -\frac{dS}{dt} = V_{DP3} + V_{DP4} + V_{DP5} \quad \dots (1)$$

Donde V_{DP3} , V_{DP4} y V_{DP5} representan las velocidades de formación de panosa, de D.P.4 y de D.P.5, es decir la velocidad de reacción de aceptor con la maltosa, la panosa y el D.P.4 respectivamente.

$$V_{DP3} = -\frac{d \text{ Malt}}{dt} = f(S, \text{ Malt}) \quad \dots (2)$$

$$V_{DP4} = -\frac{d \text{ D.P.3}}{dt} = f(S, \text{ D.P.3}) \quad \dots (3)$$

$$V_{DP5} = -\frac{d \text{ D.P.4}}{dt} = f(S, \text{ D.P.4}) \quad \dots (4)$$

Donde cada reacción depende de las concentraciones de aceptor (panosa, D.P. 4 y D.P. 5) y de sacarosa respectivamente. Por otro lado, el modelo debe incluir un término que incluya la influencia de la concentración de aceptor; además es importante considerar que en la reacción se cuenta con dos "sustratos" (la sacarosa y el aceptor), por lo que el modelo no es el clásico propuesto por Michaelis y Menten. La comprobación de este modelo requiere llevar a cabo las determinaciones de los parámetros cinéticos en presencia de cada uno de los aceptores, pues sólo se cuenta con los valores para la síntesis de panosa. Para esto habría que sintetizar y purificar cada uno de los oligosacáridos, lo cual saldría de los objetivos de esta tesis, por lo que se decidió desarrollar una ecuación empírica del tipo Michaelis-Menten basada en unas constantes cinéticas globales.

Para el cálculo de estas constantes, se ajustó un polinomio de tercer grado (ecuación 5) a la curva experimental de consumo de sacarosa (ver figura 29).

$$S = 295.13 - 0.4717t + 6.6523 \times 10^{-5}t^2 + 1.1371 \times 10^{-7}t^3 \quad \dots (5)$$

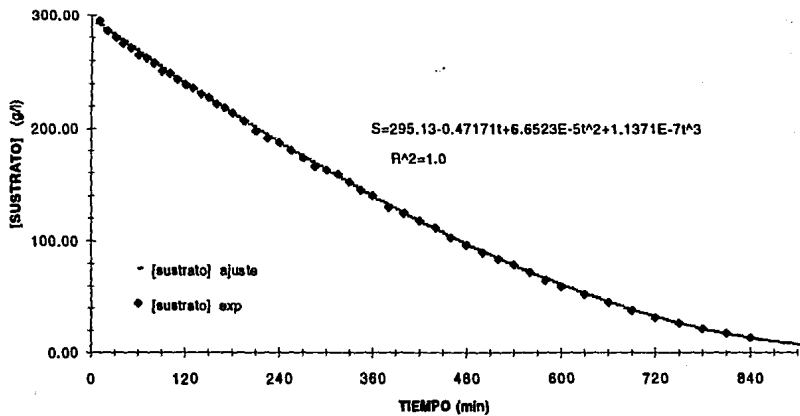


Figura 29. Cinética de reacción por lote de consumo de sacarosa por la enzima B-1299 inmovilizada y ajuste de un polinomio de tercer grado. (30°C, pH 5.4, act. equivalente 1.68 U/ml)

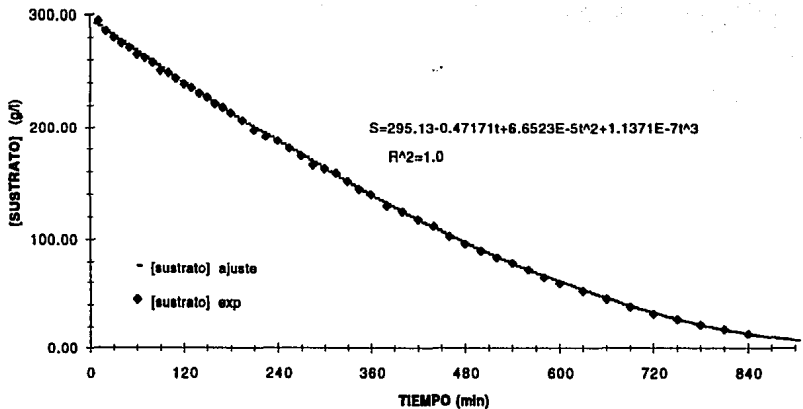


Figura 29. Cinética de reacción por lote de consumo de sacarosa por la enzima B-1299 inmovilizada y ajuste de un polinomio de tercer grado. (30°C, pH 5.4, act. equivalente 1.68 U/ml)

Con el polinomio se pudo determinar fácilmente la pendiente entre cada punto (la derivada), de donde se generó la ecuación de la relación $V_t=f(S)$:

$$\frac{dS}{dt} = V = -0.4717 + 1.3305 \times 10^{-4} t + 3.4113 \times 10^{-7} t^2 \quad \dots (6)$$

En la figura 30 se observa que la gráfica de la ecuación 6 genera un perfil como el del modelo de Michaelis-Menten, por lo que se determinaron las constantes cinéticas utilizando el método de Lineweaver-Burk. La lineartización de la ecuación 6 se muestra en la figura 31.

Como es de esperarse, al utilizar las constantes globales de Michaelis-Menten obtenidas de la figura 31 para la predicción del consumo de sustrato en la reacción batch, se describen adecuadamente los resultados obtenidos experimentalmente (figura 32).

En la tabla 11 se resumen los valores de las constantes cinéticas para esta reacción, determinadas bajo diferentes condiciones.

Tabla 11. Propiedades cinéticas de la GT B-1289 inmovilizada.

Condiciones	K_m para sacarosa (mM)	V_{max} (U/ml)
Sacarosa/maltosa=3 (w/w) ^a	132.5	1.68
Sacarosa	29.7	0.918
Global ^b	120.5	1.412

a) Se supone que la relación sacarosa/maltosa se mantiene constante durante toda la reacción.

b) Valores empíricos que involucran el cambio de aceptores a lo largo de la reacción.

Es de esperarse que el mayor valor de velocidad máxima sea el determinado en presencia de maltosa, seguida del valor global y por último en presencia sólo de sacarosa (bajo estas condiciones sólo se sintetiza dextrana). Con respecto al valor de K_m se obtuvo un valor intermedio entre el determinado en presencia del mejor aceptor y el determinado sólo con sacarosa, situación bastante justificable tomando en cuenta que bajo las condiciones globales se considera una velocidad intermedia de formación de producto, entre la de síntesis de dextrana y la de formación de panosa.

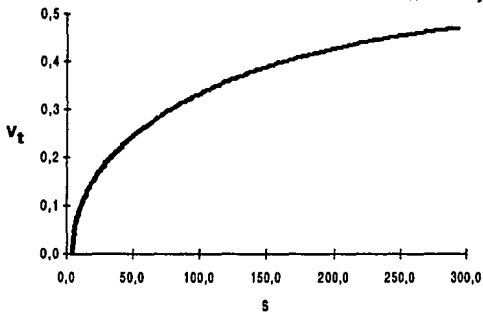


Figura 30. Representación gráfica de los datos de velocidad generados de la cinética en reacción por lote obtenidos a partir de un ajuste polinomial. (30 °C, pH 5.4, actividad equivalente 1.68 UI/ml)

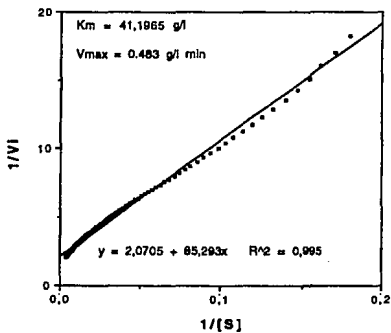


Figura 31. Representación de Lineweaver-Burk de la cinética de Michaelis-Menten definida en la figura 30.

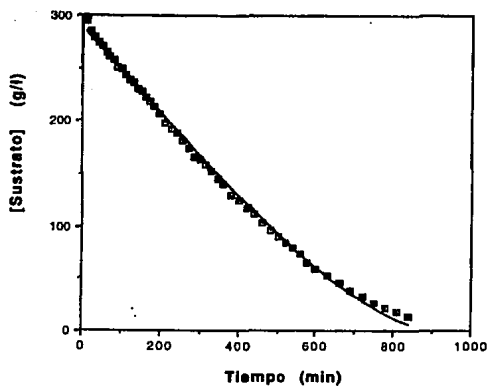


Figura 32. Reacción en lote con células inmovilizadas con actividad GT B-1299. (30°C, pH 5.4, act. equivalente a 1.68 UI/ml)

La línea continua representa la predicción teórica con las constantes obtenidas a partir del ajuste.

CARACTERIZACION DEL REACTOR DE LECHO EMPACADO

XI. Determinación de la caída de presión en el reactor.

La caída de presión es un factor muy importante que debe considerarse para el diseño de un reactor de lecho empacado con biocatalizadores. Se recomienda determinar este parámetro experimentalmente; especialmente si el lecho es compresible ya que cuando se presenta una alta caída de presión se provoca deformación de las partículas, baja transferencia de masa y resistencia al flujo que puede llegar al extremo de obstruir el sistema.

Se determinó la caída de presión experimentalmente con el catalizador y con perlas de vidrio, para comparar el comportamiento entre un lecho compresible y uno no compresible, con diferentes gastos de alimentación y variando la relación altura/diámetro, como se detalla en materiales y métodos. En la tabla 12 se resumen las condiciones de trabajo y en la figura 33 se presentan los resultados experimentales del reactor empacado con el catalizador.

Tabla 12. Condiciones a las que se determinó la caída de presión dentro del reactor de lecho empacado.

Q (cm ³ /min)	Catalizador Re	Perlas de vidrio Re
28.6	0.8698	1.2606
28.2	0.9211	1.3349
30.0	0.9788	1.4186
32.0	1.0440	1.5135
33.3	1.0875	1.5760
35.3	1.1514	1.6687
40.0	1.3050	1.8914
42.9	1.3983	2.0266

Dimensiones del reactor: 1.9 cm de diámetro interno y una longitud de 1 a 5 veces el diámetro.

Adicionalmente se estimó la caída de presión dentro del sistema con la ecuación de Leva (Perry & Chilton, 1973; Wayne, 1975):

$$\Delta P = \frac{2f_m \cdot G^2 \cdot L \cdot (1-\epsilon)^{2.2}}{dp \cdot \rho \cdot gc \cdot \Phi_s^{2.2} \cdot \epsilon^3} \dots (7)$$

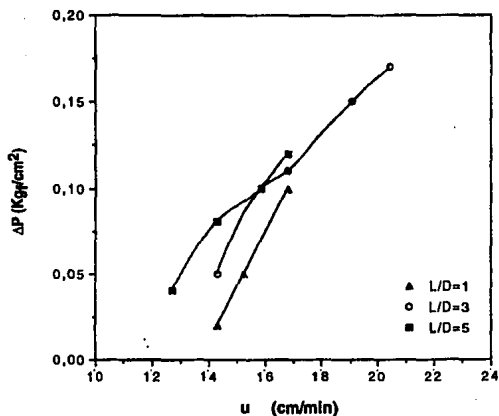


Figura 33. Efecto de la velocidad superficial y de la geometría (L/D) en la caída de presión en un reactor empaquetado con blocatalizador. ($d_p=0.2$ cm, $\epsilon=0.74$, D reactor=1.9cm) (Fluido: $\mu=4.372$ cp, $\rho=1.1723$ g/cc)

Resultados y discusión

que es equivalente a la ecuación propuesta por Buchholz (1979):
$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{150(1-\epsilon)^2 \cdot \mu \cdot u}{\epsilon^3 \cdot dp^2} \dots (8)$$

Para el cálculo, se consideraron las características de una solución de sacarosa al 40%: $\mu=4.372$ cp y $\rho=1.1723$ g/cc. Los valores de ϵ para el catalizador y para las perlas de vidrio son de 0.74 y 0.4 respectivamente.

Se puede observar que los parámetros importantes que controlan la caída de presión dentro del reactor son la velocidad lineal (que se relaciona con el número de Re), la longitud de la columna, el diámetro de partícula y, principalmente, la fracción vacía. También se debe de considerar que el diámetro de partícula debe ser homogéneo, ya que una distribución de tamaño de partícula elevada modifica el valor de ϵ , lo que provoca un aumento del ΔP .

En la figura 34 se presentan los resultados del reactor empacado con perlas de vidrio a diferentes relaciones altura/diámetro. Las líneas continuas representan el resultado del cálculo teórico obtenido mediante la ecuación 7. Se observa que el modelo describe adecuadamente lo que sucede en la realidad. Por el contrario, en el caso del reactor empacado con el catalizador (figura 35), el ΔP calculado está por debajo de lo observado experimentalmente. En la figura 35 se presenta la comparación de los resultados para $L/D=1$ y $L/D=5$; lo mismo ocurre con las geometrías del reactor ($L/D=2$ y $L/D=3$). Esta diferencia se puede explicar por el hecho de que el catalizador es compresible. Como se afirmó anteriormente, es importante determinar esta condición experimentalmente, pues la ecuación no predice el comportamiento en caso de lechos compresibles.

Algunos autores (Buchholz, 1979) consideran que 3 psi (0.21 Kg/cm^2) representa una ΔP límite y recomiendan mantenerse por debajo de este valor. De acuerdo a lo observado en el sistema empacado con catalizador, es recomendable operar por debajo de 0.1 Kg/cm^2 , ya que si se trabaja a mayores presiones, se observa compresión del catalizador, lo que a su vez hace que aumente la presión dentro de la columna. Por lo tanto, para evitar problemas causados por un ΔP alto, se recomienda que para una $L/D=1$ se opere a flujos lineales menores de 17 cm/min , y para una $L/D=3$ a flujos lineales menores de 15 cm/min .

XII. Determinación de la distribución de tiempos de residencia.

En el reactor de lecho empacado, el comportamiento ideal considera que el fluido se mueve a través del reactor como un pistón donde toda la corriente de sustrato fluye a la misma velocidad. Ésto es, la concentración de sustrato en la dirección radial es la misma, sólo se modifica en dirección axial como consecuencia del desplazamiento del flujo; todo el material presente en cualquier sección transversal dada del reactor tiene el mismo tiempo de residencia. Por ésto, la

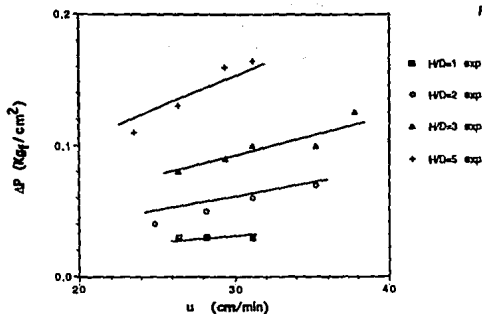


Figura 34. Efecto de la velocidad superficial y de la geometría (L/D) en la caída de presión en un reactor empacado con perlas de vidrio. ($d_p=0.3\text{cm}$, $\epsilon=0.4$, D reactor=1.9cm) (Fluido: $\mu=4.372\text{ cp}$, $\rho=1.1723\text{ g/cc}$) Las líneas representan el modelo de Leva.

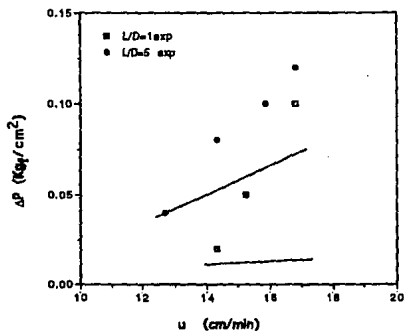


Figura 35. Efecto de la velocidad superficial y de la geometría (L/D) en la caída de presión en un reactor empacado con blocatalizador.

Las líneas representan el modelo de Leva.

posición longitudinal del sustrato dentro del reactor es proporcional al tiempo que lleva dentro del mismo.

En la realidad, no se observa un comportamiento ideal. Al determinar la distribución de tiempos de residencia, se observa una campana de tipo Gaussiano, donde la amplitud de la curva determina la magnitud de la desviación. Las desviaciones del flujo pistón ideal se deben al retromezclado dentro del reactor, así como a efectos de dispersión axial. Tales efectos pueden ser causados por empaqueo irregular, por aplicación irregular de la alimentación o por la formación de acanalamientos.

Para caracterizar la dispersión de los tiempos de residencia se supone que se lleva a cabo un proceso de difusión adicional al flujo pistón. La difusión molecular en dirección perpendicular a la del flujo (x) se basa en la ley de Fick:

$$\delta C / \delta t = D \cdot \delta^2 C / \delta x^2 \quad \dots (9) \quad \text{donde } D \text{ es el coeficiente de dispersión axial}$$

La ecuación diferencial básica que representa este modelo de dispersión es el siguiente:

$$\delta C / \delta \theta = (D / uL) \delta^2 C / \delta z^2 - \delta C / \delta z \quad \dots (10)$$

Donde D / uL es un grupo adimensional llamado número de dispersión y

$$z = \frac{x}{L}, \text{ la distancia adimensional en el reactor.}$$

El número de dispersión caracteriza el grado de dispersión con respecto al tiempo de residencia promedio y equivale a una medida del grado de ensanchamiento de la curva de trazador. Si $(D / uL) < 0.01$ la curva del trazador es estrecha, por lo que existe una desviación pequeña del flujo pistón ideal. En la sección de materiales y métodos se describe con detalle el procedimiento experimental para determinar el valor de D / uL .

En la figura 36 se muestra la distribución de tiempos de residencia en el reactor empacado con perlas de vidrio ($\epsilon = 0.4$) a 4 diferentes gastos de alimentación y en la tabla 13 se resumen los resultados obtenidos.

Se observa que al aumentar el flujo lineal ($Q/A\epsilon = u$) la curva se hace más estrecha, lo que indica que hay una menor dispersión de tiempos de residencia (la varianza disminuye), por lo que el valor del número de dispersión se hace más pequeño. A partir de un flujo lineal de 10.53 cm/min se considera que no existe una desviación importante del flujo pistón ideal.

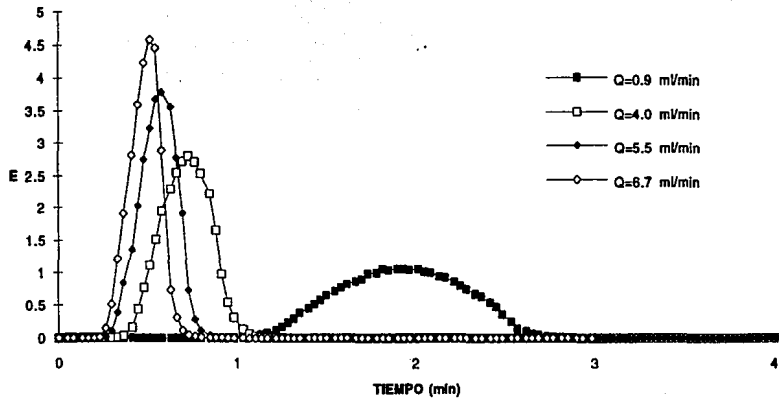


Figura 36. Distribución de tiempos de residencia en un reactor de lecho empacado con perlas de vidrio. (Reactor de 1.1 cm de diámetro por 2.2 cm de altura)

Tabla 13. Distribución de tiempos de residencia en el reactor empacado con perlas de vidrio.

Q (ml/min)	u (cm/min)	\bar{t} (min)	σ^2 (min ²)	D/uL
0.9	2.37	1.9198	0.1193	0.0597
4.0	10.53	0.7188	0.0197	0.0098
5.5	14.47	0.5642	0.0138	0.0069
6.7	17.63	0.4886	0.0087	0.0044

\bar{t} es el tiempo de residencia promedio y σ^2 es la varianza.

Posteriormente se realizó el mismo experimento, pero ahora el reactor se empacó con el biocatalizador. En la figura 37 y en la tabla 14 se muestran los resultados.

Tabla 14. Distribución de tiempos de residencia en el reactor empacado con biocatalizador. $D_p=2.1\text{mm}$.

Q (ml/min)	u (cm/min)	\bar{t} (min)	σ^2 (min ²)	D/uL	θ (min)
0.9	1.28	1.25	0.1268	0.0634	1.64
1.7	2.42	0.805	0.0408	0.0204	0.87
2.6	3.70	0.765	0.0385	0.0193	0.57
3.4	4.83	0.547	0.0207	0.0103	0.44

\bar{t} es el tiempo de residencia promedio, σ^2 es la varianza y θ es el tiempo de residencia calculado.

De la misma manera que el caso anterior, al aumentar la velocidad superficial disminuye el número de dispersión, en el caso del biocatalizador se llega a las condiciones de idealidad con un flujo lineal menor, equivalente a 4.83 cm/min, donde se obtiene un D/uL de 0.01. La diferencia está en la consideración de la fracción vacía. El reactor empacado con catalizador tiene una fracción vacía mayor que el reactor empacado con las perlas de vidrio, situación que repercute de forma importante en el comportamiento del flujo dentro del reactor. En este último

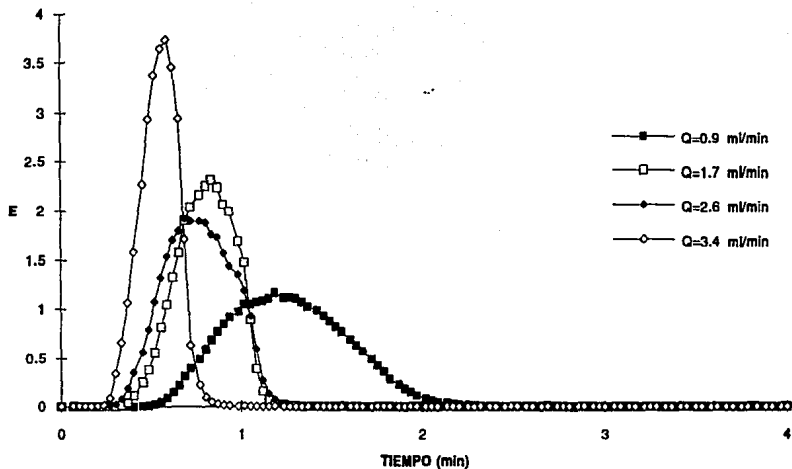


Figura 37. Distribución de tiempos de residencia en un reactor de lecho empacado con catalizador de alginatos. (Reactor de 1.1 cm de diámetro por 2.2 cm de altura)

caso, el fluido tiene que recorrer un camino más tortuoso que favorece un patrón de flujo perpendicular a la sección transversal irregular.

Por otra parte, en el reactor de lecho empacado, el tiempo de residencia promedio está definido por la siguiente ecuación:

$$\theta = \frac{V}{Q} \quad \dots (11) \quad \text{donde } V \text{ es el volumen de reacción y } Q \text{ es el gasto de alimentación}$$

Pero como se tiene la enzima inmovilizada en un soporte que tiene una determinada fracción vacía, se debe tomar en cuenta este factor en la ecuación:

$$\theta = \frac{V \cdot \epsilon}{Q} \quad \dots (12)$$

Al hacer el cálculo teórico del tiempo de residencia (θ) con la ecuación anterior y compararlo con los resultados experimentales ($\bar{\tau}$) (tabla 14), se observa que se encuentran dentro de la zona de $\bar{\tau} - \sigma$ y $\bar{\tau} + \sigma$, especialmente en condiciones de flujo pistón ideal.

Para producir un flujo pistón ideal se requiere encontrarse bajo régimen turbulento; pero alcanzar altos valores de Re es difícil, pues existe un compromiso con el tiempo de residencia necesario para alcanzar una alta conversión (que implica trabajar con gastos de alimentación bajos), dada la baja actividad específica del biocatalizador. Aunado a esto, existe también un límite para evitar una caída de presión elevada.

XIII. Operación del reactor a diferentes conversiones.

Una vez determinados los parámetros que caracterizan al catalizador y al reactor, se diseñó y construyó un reactor empacado de 500 ml con una relación L/D aproximada de 1 operando en continuo. Se varió el gasto de entrada con el fin de obtener diferentes conversiones. El cálculo de las conversiones esperadas a determinado gasto de entrada se basa en la ecuación que describe el comportamiento del reactor de flujo pistón:

$$\theta = S_0 \int_0^X \frac{dX}{-r_f} = - \int_{S_0}^S \frac{dS}{-r_f} \quad \dots (13) \quad \text{donde } X = \frac{S_0 - S}{S_0} \text{ representa la conversión}$$

Al sustituir esta ecuación en el modelo de Michaelis-Menten y al integrarla se obtiene la siguiente ecuación:

$$k_2 E \cdot \theta = S_0 X - K_M \ln(1 - X) \quad \dots (14)$$

Para el caso del reactor, $S_0 = 300$ g/l de sacarosa y $k_2 E$ representa la V_{max} que se puede alcanzar bajo las condiciones de reacción; es la actividad enzimática total presente en el reactor ($V_{max} = 1.624$ g/l·min, determinada previamente).

Para el cálculo de θ requerido para una conversión dada se tomaron las constantes cinéticas globales, es decir, se consideró una K_m de 120.5 mM (41.21 g/l) y una $V_{máx}$ de 1.38 g/l·min.

El valor de $V_{máx}$ global para esta reacción se calculó tomando en cuenta que

$$V_{máx_{cor}} = 1.1 V_{máx_{no,cor}} \dots (15)$$

$$\text{Si } V_{máx_{no,cor}} = 1.624 \text{ g/l·min, entonces } V_{máx_{cor}} = 1.476 \text{ g/l·min}$$

Una vez calculado el tiempo de residencia necesario para alcanzar la conversión deseada, se calculó el flujo de alimentación considerando el volumen disponible para la reacción (tomando en cuenta la corrección por la fracción vacía). En la tabla 15 se resumen las condiciones de operación utilizadas y se presentan los resultados obtenidos (ver además resultados en la figura 38).

Tabla 15. Condiciones de operación y conversión en el reactor de lecho empacado en continuo.

X teórica	θ (min)	Q (ml/min)	u (cm/min)	Sacarosa consumida (g/l)	X observada
0.87	268	1.39	0.0239	144.66	0.482
0.59	164	2.26	0.0388	98.15	0.327
0.44	120	3.07	0.0528	64.99	0.217
0.29	79	4.66	0.0802	40.29	0.134
0.15	39	9.46	0.1627	23.72	0.079

Se puede apreciar que existe una diferencia entre la conversión esperada y lo obtenido experimentalmente. En vista de los flujos lineales tan bajos a los que se operó el reactor, es de suponer, con base en la experimentación inicial, que la diferencia se debe a que se presenta una desviación importante del comportamiento ideal de flujo pistón; pero sobre todo, a que se presenta una limitación difusional externa. La mayor velocidad superficial a la que se trabajó es treinta veces menor que la velocidad superficial en la que no se presenta desviación del flujo pistón, por lo que el número de dispersión será, en todos los casos $\gg 0.01$. Definitivamente, bajo estas condiciones, no se presenta ningún problema asociado a la caída de presión. Con el fin de tener la caracterización del reactor completa, se determinó el efecto difusional externo.

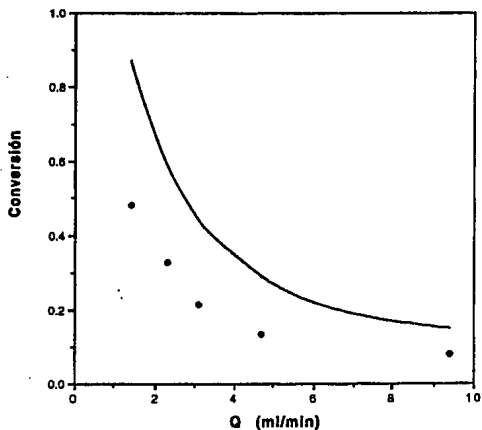


Figura 36. Conversión en un reactor de lecho empacado con biocatalizador operado en continuo, en función del gasto de alimentación.

(pH=5.4, 30°C, V=500 ml, actividad equivalente 3.32 U/ml)

La línea corresponde a la predicción teórica.

XIV. Evaluación de efecto difusional externo.

Uno de los pasos que pueden controlar la velocidad de reacción es la transferencia de masa externa del sustrato que debe transportarse del seno de la solución a la superficie del catalizador. Cuando no existe una buena transferencia de masa externa se observa un perfil de concentración del sustrato, donde la menor concentración se encuentra en la superficie del catalizador.

Para conocer las condiciones hidrodinámicas de operación bajo las cuales no hubiera un efecto difusional externo importante, se diseñó el sistema empacado recirculado descrito anteriormente. Donde se supone que el reactor empacado es lo suficientemente pequeño para que los cambios en la concentración del sustrato que pasa a través, también sean pequeños; de tal manera que la composición del fluido sea casi constante a lo largo del reactor (Park *et al*, 1982). Desde el punto de vista experimental este es uno de los sistemas más comúnmente empleados para medir la actividad de enzimas inmovilizadas.

Dado que la velocidad inicial en el tanque (que es la medida de la velocidad inicial observada en el reactor) debe ser independiente del gasto de recirculación, cualquier dependencia se manifiesta cuando existe una limitación difusional externa: al aumentar el gasto se contribuye a la turbulencia y se observa un incremento en la velocidad de reacción. Esta situación se mantendrá hasta que el sistema deje de estar limitado difusionalmente y la velocidad se vuelva constante e independiente del gasto, es decir, controlada por la cinética. En la tabla 16 y en la figura 39 se presentan los resultados obtenidos; en donde se puede observar claramente este efecto. Se considera que la velocidad observada a partir de una velocidad lineal de 7.11 cm/min ya no está controlada por la difusión externa, debido a que es aproximadamente igual a la velocidad inicial medida en reactor por lote agitado, cuyo valor fue 0.7281 U/ml. Por el contrario, a velocidades lineales menores, se observa que la reacción está controlada por la transferencia de masa externa.

Bajo condiciones de limitación de transferencia de masa externa la velocidad está definida por la concentración de sustrato en la superficie del catalizador (S^*), inferior a la concentración S en el seno de la solución:

$$V_i = V_{max} \frac{S^*}{K_M + S^*} \quad \dots (16)$$

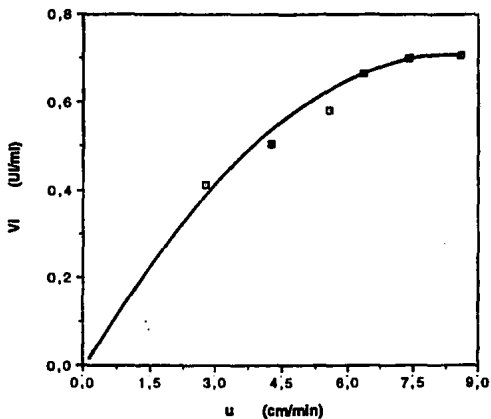


Figura 39. Efecto difusional externo sobre la velocidad inicial observada a diferentes velocidades lineales, para un reactor empacado con biocatalizador. (pH 5,4, 30°C, actividad equivalente 0,73 U/ml)

Tabla 16. Velocidad inicial observada en función del gasto de recirculación para un reactor empacado con catalizador.

Q (ml/min)	u (cm/min)	Re	V_f (UI/ml)
1.87	2.66	0.2377	0.4114
2.88	4.07	0.3835	0.5052
3.75	5.33	0.4766	0.5803
4.29	6.10	0.5453	0.6648
5.0	7.11	0.6355	0.7004
5.8	8.25	0.7372	0.7075

Para calcular Re se consideró $\epsilon=0.74$, $d_p=0.2$ cm, $\rho=1.1723$ g/cm³, $\mu=4.372$ cp.

Como se conocen los valores de las constantes cinéticas y la V_f observada (tabla 16), a partir de esta ecuación se puede calcular el valor de S^* para cada gasto. Se consideró una $K_m=13.67$ g/l y una V_{max} de 0.7281 UI/ml. Por otra parte, la velocidad de transferencia de masa del seno de la solución a la superficie del catalizador está definida por:

$$r = K_{L,a}(S - S^*) \quad \dots (17)$$

Dado que $S=300$ g/l (concentración de sustrato en el seno de la solución) entonces a partir de la ecuación 17 se puede determinar el valor del $K_{L,a}$.

Con el valor del $K_{L,a}$, se puede calcular el factor de transferencia de masa (j_D), el cual posteriormente se puede relacionar con Re, con el fin de determinar el $K_{L,a}$ para cualquier valor de Re.

$$j_D = \frac{K_{L,a}}{u} \left(\frac{\mu}{\rho \beta} \right)^{2/3} \quad \dots (18) \quad \text{donde } \beta \text{ es la difusividad de la sacarosa a la temperatura de trabajo. } \beta=0.4723 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}.$$

En la tabla 17 se reportan los valores de las constantes de transferencia de masa determinadas mediante este procedimiento para las diferentes condiciones experimentales.

Tabla 17. Determinación experimental del $K_{L,a}$ y j_D en un reactor empacado con biocatalizador bajo limitación por transferencia de masa externa.

u (cm/min)	Re	S^* (g/l)	$K_{L,a}$ (min ⁻¹)	j_D
2.66	0.2377	17.758	4.985 E-4	0.07123
4.07	0.3635	30.983	6.423 E-4	0.06001
5.33	0.4766	53.672	8.057 E-4	0.05741
6.10	0.5453	143.567	1.453 E-3	0.09053

Retomando los resultados obtenidos con el reactor de 500 ml en continuo, se considera que por operar a Re muy bajos, la velocidad de reacción (y por lo tanto la conversión) se encuentra determinada por el coeficiente de difusión externa. Por lo tanto, de la ecuación del reactor de flujo pistón:

$$\theta = S_0 \int_0^X \frac{dX}{r} \quad \dots (19),$$

$$\text{ahora, } r = K_{L,a} S (1-X) \quad \dots (20)$$

por lo que al integrar la ecuación, tenemos:

$$\theta K_{L,a} = \ln\left(\frac{1}{1-X}\right) \quad \dots (21)$$

Como se conoce la conversión obtenida a cada tiempo de residencia, se puede calcular el $K_{L,a}$ y compararlo con los resultados obtenidos en el reactor recirculado. En la tabla 18 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 18. Determinación de las constantes de transferencia de masa en un reactor de 500 ml empacado con biocatalizador operado en continuo.

θ (min)	u (cm/min)	X exp	Re	$K_{L,a}$ (min ⁻¹)	j_D
266	0.0239	0.482	0.0022	2.603 E-3	41.3448
164	0.0388	0.327	0.0036	2.550 E-3	24.9975
120	0.0528	0.217	0.0049	2.130 E-3	15.3186
79	0.0802	0.134	0.0075	1.934 E-3	9.1689
39	0.1827	0.079	0.015	2.189 E-3	5.1550

En la figura 40 se observa la relación que existe entre j_D y R_c . Se observa que hay una buena correlación entre los puntos determinados en el reactor recirculado y los datos obtenidos en el reactor de mayor escala en continuo. En esta figura se comprueba que en el último caso se trabajó en una zona donde hay una profunda limitación de transferencia de masa externa.

Al igual que en la distribución de tiempos de residencia, se recomienda trabajar en régimen turbulento. Al cambiar la geometría del reactor, disminuyendo la sección transversal, se podría aumentar el R_c . Sin duda alguna, la mejor opción sería aumentar la actividad del catalizador para requerir menores tiempos de residencia y poder aumentar el gasto de alimentación.

XV. Estabilidad operacional.

Finalmente, se operó el reactor en continuo bajo las condiciones de máxima conversión, para determinar la vida media operacional. En la figura 41 se observa la pérdida de actividad en función del tiempo. La curva se extrapola para calcular el tiempo de vida media, obteniéndose un valor de 411 horas.

Analizando detenidamente los resultados y dado que la velocidad de reacción está determinada por la transferencia de masa externa, resulta extraño observar una disminución en la actividad enzimática, pues el paso limitante de la reacción no es el control cinético. Una explicación es la formación de caminos preferenciales dentro del reactor (acanalamientos) y que la pérdida de actividad observada correspondiera al catalizador activo definido por dichos canales. Esto podría explicar también la baja conversión obtenida, pues no todo el catalizador estuvo en contacto con el sustrato de manera homogénea. La formación de los caminos preferenciales que siguió el sustrato, se pudo deber a que la alimentación no se llevó a cabo de una manera homogénea, debido a las limitaciones del reactor experimental. De cualquier forma, el efecto de acanalamiento no se presentó en los reactores de 5 ml dado el estudio de distribución de tiempos de residencia y tampoco explica la correlación obtenida entre j_D y el número de R_c . Es por lo tanto recomendable efectuar estudios de distribución de tiempos de residencia en reactores de mayor volumen en el escalamiento del proceso.

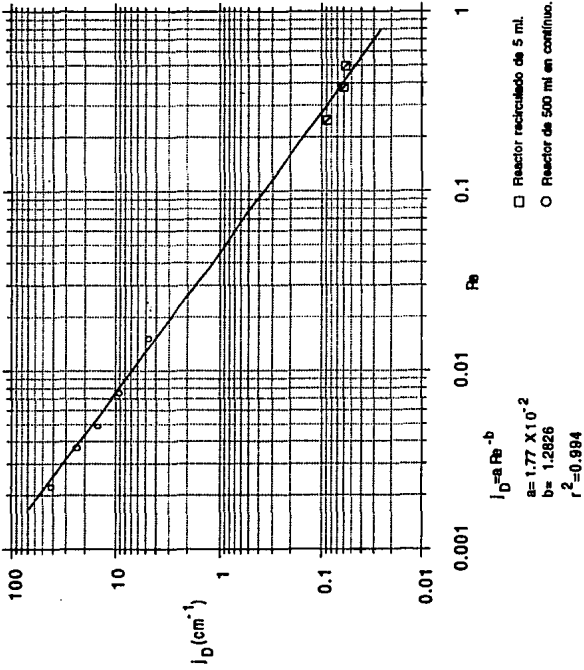


Figura 40. Factor de transferencia de masa J_D en función de Re .

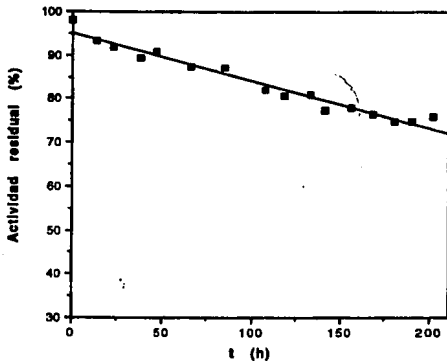


Figura 41. Estabilidad operacional del catalizador de células inmobilizadas con actividad GT en gel de alginatos en un reactor de lecho empaçado. (pH 5.4, 30°C, V=500 ml, actividad equivalente 3.32 UI/ml)

CONCLUSIONES

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 produce dextran sacarasa extracelular y enzima asociada a las células, ambas preparaciones enzimáticas sintetizan el mismo tipo de productos en presencia de maltosa. Sin embargo, la enzima asociada a las células se produce en mayor proporción en comparación con la enzima soluble y además presenta una mayor estabilidad ante variaciones de pH.

El pH en que se presenta una mayor estabilidad es de 5.4, mientras que el pH óptimo de actividad de la enzima es 5.2. Debido a que la perspectiva es utilizar la enzima inmovilizada, se decidió trabajar al pH de mayor estabilidad. Se optó por inmovilizar solamente la enzima asociada a las células tomando en cuenta que se obtiene una mayor estabilidad y que se evita la utilización de polietilenglicol.

En lo que respecta al comportamiento cinético de la enzima, se observa un efecto de inhibición por exceso de sustrato a concentraciones mayores de 200 g/l. Por otra parte, se observa un efecto de activación del aceptor sobre la velocidad de reacción.

Al seguir el consumo de sustrato a lo largo de una reacción de síntesis de oligosacáridos (hasta agotar la sacarosa) se observó que la velocidad de reacción disminuye con el transcurso del tiempo, con respecto a lo esperado de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten. Se propone que esto es debido a que la molécula aceptora va cambiando: inicialmente el aceptor es la maltosa, posteriormente la panosa y finalmente el D.P. 4. De cualquier manera, para los cálculos de diseño del reactor hay que tomar en cuenta que las constantes cinéticas no son las determinadas midiendo velocidades iniciales, ya que la enzima no se comporta de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten.

Si se optara por trabajar con la enzima inmovilizada en un sistema por lote, al agotarse el sustrato, empezarán a llevarse a cabo reacciones de desproporción. Esta enzima, bajo estas condiciones, sólo transfiere en posiciones α -(1 \rightarrow 6) a costa de la disminución de los productos en α -(1 \rightarrow 2), situación que no es deseable. Por esta razón, se recomienda que en el caso de trabajar en reactor por lotes, se implemente un control adecuado de la reacción para

definir el momento en que se agote el sustrato, para evitar que disminuya la concentración de los oligosacáridos de interés. Otra opción, es trabajar con un reactor de lecho empacado.

La glucosiltransferasa insoluble se inmovilizó por atrapamiento en gel de alginatos con un rendimiento del 93%. Se encontró que un diámetro de 2 mm es el adecuado para evitar problemas difusionales internos. Se produjo un catalizador con 90.6% de humedad, una densidad de 0.894 g/ml y una fracción vacía de 0.74. Se encontró un método alternativo para medir el valor de la fracción vacía, por medio de la curva de secado del catalizador.

Una vez superadas las barreras difusionales internas existen otros factores que pueden ser limitantes en la operación del reactor empacado. En primer lugar se deben evitar altas caídas de presión dentro del reactor, ya que el catalizador se puede comprimir llegando al extremo de obstruir la columna. Es deseable trabajar a Re lo suficientemente altos para acercarse al comportamiento de flujo pistón ideal y para eliminar los efectos difusionales externos, pero sin llegar a crear un ΔP elevado. De acuerdo a los resultados experimentales determinados a pequeña escala, un flujo lineal cercano a 6 cm/min estaría dentro de la idealidad.

Al operar un reactor de mayor escala en continuo, se encontró una desviación del flujo ideal probablemente causado por la formación de escalamientos y una limitación difusional externa importante debido a que el tiempo de residencia necesario para alcanzar una alta conversión implicaba trabajar con un gasto de alimentación bajo.

Con este trabajo se contribuye al desarrollo de un proceso para la producción de oligosacáridos de interés comercial, al haber aportado elementos de importancia para el diseño de un reactor a nivel de planta piloto, actualmente en operación en St. Girons, Francia.

NOMENCLATURA

Símbolo Unidades

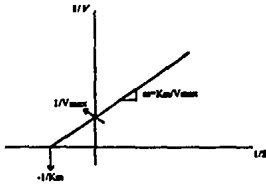
A	cm ²	área transversal del lecho.
C	M	concentración.
D	cm	diámetro.
D		coeficiente de dispersión axial.
D	$\frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$	difusividad.
D.O.	-	densidad óptica.
D.P.		grado de polimerización.
dp	cm	diámetro de partícula.
f _m	-	factor de fricción.
G	$\frac{\text{g}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}$	velocidad másica por unidad de área seccional del lecho.
g _c	$\frac{\text{g} \cdot \text{cm}}{\text{s}^2 \cdot \text{g}}$	constante de la fuerza de gravedad.
j _D	-	factor de transferencia de masa.
k	min ⁻¹	constante de inactivación.
K _L A	min ⁻¹	coeficiente de transferencia de masa.
L	cm	longitud del lecho.
Pe		número de Peclet.
Q	$\frac{\text{cm}^3}{\text{s}}$ ó $\frac{\text{cm}^3}{\text{min}}$	flujo volumétrico.
Re	-	número de Reynolds ($\frac{dp \cdot Q \cdot \rho}{\mu \cdot A}$).
S ₀	g/l	concentración inicial de sustrato.
S	g/l	concentración de sustrato.
S*	g/l	concentración de sustrato en la superficie del catalizador.
t	min	tiempo.
t _{1/2}	min	tiempo de vida media.
t̄	min	tiempo de residencia promedio.
u	$\frac{\text{cm}}{\text{min}}$	velocidad superficial o flujo lineal.
V	ml	volumen de reacción.
V _i		velocidad inicial.

Símbolo	Unidades	
V_{obs}	$\frac{UI}{ml}$	velocidad inicial de reacción en condiciones de limitación difusional.
V^{∞}	$\frac{UI}{ml}$	velocidad inicial de reacción sin resistencias difusionales.
X		conversión.
ΔP	$\frac{Kg}{cm^2}$	caída de presión.
s	-	fracción vacía.
η	-	factor de efectividad.
θ	min	tiempo de residencia.
μ	$\frac{g}{cm \cdot s}$	viscosidad del fluido.
ρ	$\frac{g}{cm^3}$	densidad del fluido.
σ	-	desviación estándar.
σ^2	-	varianza.
Φ_s	-	factor de forma.

ANEXO A

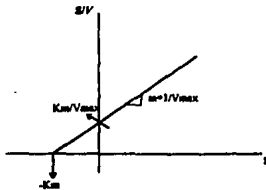
Linearizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten.
(Segel, 1975)

Lineweaver-Burk.



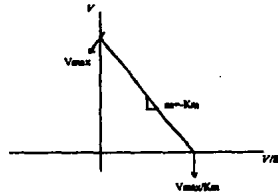
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Hanes-Woolf.



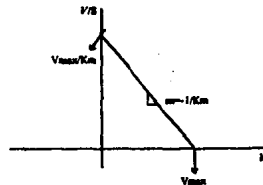
$$\frac{S}{V} = \frac{1}{V_{max}} \cdot S + \frac{K_m}{V_{max}}$$

Woolf-Augustinsson-Hofstee.



$$V = -K_m \cdot \frac{V}{S} + V_{max}$$

Eadie-Scatchard.



$$\frac{V}{S} = -\frac{1}{K_m} \cdot V + \frac{V_{max}}{K_m}$$

BIBLIOGRAFIA

- Alsop, R.M. (1983) Industrial production of dextrans. En: Progress in Industrial microbiology. Vol.18. pp. 1-43. Ed. Buschel, M.E. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam.
- Bailey, R.W. & A.E. Oxford. (1959) The nature of the capsular polysaccharides of the dextran-producing organisms *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum* and *Streptococcus bovis*. J. Gen. Microbiol. 20:258-266.
- Barker, P.E. & N.J. Ajongwen. (1991) The production of the enzyme dextranase using nonaerated fermentation techniques. Biotechnol. Bioeng. 37:703-707.
- Binder, T.P., G.L. Coté & J.F. Robyt. (1983) Disproportionation reactions catalyzed by *Leuconostoc* and *Streptococcus* glucanases. Carbohydr. Res. 124:275-288.
- Boume, E.J., R.L. Sidebotham & H. Weigel. (1972) Studies on dextrans and dextranases. Part X. Types and percentages of secondary linkages in the dextrans elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Carbohydr. Res. 22:13-22.
- Boume, E.J., R.L. Sidebotham & H. Weigel. (1974) Studies on dextrans and dextranases. Part XI. The structure of a dextran elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Carbohydr. Res. 34:279-288.
- Brooker, B.E. (1977) Ultrastructural surface changes associated with dextran synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 131:288-292.
- Buchholz, K. (1979) Characterization of Immobilized Biocatalysts. Vol.84. pp. 73-94 y 127-135. Ed. DECHEMA. Frankfurt, Alemania.
- Castillo, E., Iturbe F., A. López-Munguía, V. Pelenc, F. Paul & P. Monsan. (1992) Dextran and oligosaccharide production with glucosyltransferases from different strains of *Leuconostoc mesenteroides*. En: Enzyme Engineering XI. Annals of the New York Academy of Sciences. 672:425-430.
- Dixon, M. & E.C. Webb. (1979) Enzymes. pp 55-60. Ed. Longman Group Ltd. Londres, Inglaterra.
- Durán P.E. (1990) Producción y caracterización de glucosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de Maestría en Ciencias de Alimentos. México. D.F.

- Ebert, K.H. & G. Schenk. (1968) Mechanism of biopolymer growth. Dextran formation. *Adv. Enzymol.* 30:190-202.
- El-Sayed, A-H M.M., W.M. Mahmoud & R.W. Coughlin. (1990 a) Production of dextranucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized in calcium-alginate beads: I. Batch and fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 36:338-345.
- El-Sayed, A-H M.M., W.M. Mahmoud & R.W. Coughlin. (1990 b) Production of dextranucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized in calcium-alginate beads: II. Semicontinuous fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 36:346-353.
- Fu, D. & J.F. Robyt. (1988) Essential histidine residues in dextranucrase: chemical modification by diethyl pyrocarbonate and dye photo-oxidation. *Carbohydr. Res.* 108:279-283.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriology.* 66:365-378.
- Hassid, W.Z. & E.F. Neufeld. (1962) Glycosidic bond exchange. En: *The enzymes*. Vol. 8. pp. 278-288. Eds. P. Boyer, H. Lardy & K. Myrback. Academic Press. New York, E.U.A.
- Hoover, D.G. (1993) Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Technol.* 47:120-124.
- Jeanes, A., W.C. Haynes, C.A. Wilham, J.C. Rankin, E.H. Melvin, M.J. Austin, J.E. Cliskey, B.E. Fisher, H.M. Tsuchiya & C.E. Rist. (1954) Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Amer. Chem. Soc.* 76:5041-5052.
- Jeanes, A. (1979) The α -D-glucopyranosidic linkages of dextrans: comparison of percentages from structural analysis by periodate oxidation and by methylation. *Carbohydr. Res.* 74:31-40.
- Kobayashi, M., K. Shishido, T. Kikuchi & K. Matsuda. (1973 a) Fractionation of the *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran and preliminary characterization of the fractions. *Agr. Biol. Chem.* 37:357-365.
- Kobayashi, M., K. Shishido, T. Kikuchi & K. Matsuda. (1973 b) Methylation analysis of fractions from the *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran. *Agr. Biol. Chem.* 37:2763-2769.
- Kobayashi, M. & K. Matsuda. (1974) The dextranucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Biochim. Biophys. Acta* 370:661-669.

- Kobayashi, M. & K. Matsuda. (1975 a) Purification and characterization of two activities of the intracellular dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Biochim. Biophys. Acta.* 397:69-79.
- Kobayashi, M. & K. Matsuda. (1975 b) Conversion of the extracellular dextranase isoenzymes from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Agr. Biol. Chem.* 39:2087-2088.
- Kobayashi, M. & K. Matsuda. (1976) Purification and properties of the extracellular dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *J. Biochem.* 79:1301-1306.
- Kobayashi, M. & K. Matsuda. (1977) Structural characteristics of dextrans synthesized by dextranases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Agr. Biol. Chem.* 41:1931-1937.
- Kobayashi, M., Y. Mitsuishi, S. Takagi & K. Matsuda. (1984) Enzymic degradation of water-soluble dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Carbohydr. Res.* 127:305-317.
- Kok, J. (1990) Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:15-42.
- Lawford, G.R., A. Kilgeman & T. Williams. (1979) Dextran biosynthesis and dextranase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol. Bioeng.* 21:1121-1131.
- Levenspiel, O. (1985) *Chemical Reaction Engineering*. pp. 253-282. John Wiley & Sons, Inc., N. York, E.U.A.
- López, A. & P. Monsan. (1980) Dextran synthesis by immobilized dextranase. *Biochimie.* 62:323-329.
- López-Munigua, A., V. Pelenc, M. Rемаud, J. Biton, J.M. Michel, C. Lang, F. Paul & P. Monsan. (1993) Production and purification of alpha-amansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoamans. *Enzyme Microb. Technol.* 15:77-85.
- Martínez-Espíndola, J.P. & C.A. López-Munigua. (1975) On the kinetics of dextranase and dextran synthesis in batch reactors. *Biotechnol. Lett.* 7:483-486.

- Mc Clearly, B.V. & N.K. Matheson. (1986) Dextran. *Adv. carbohydr. Chem. and Biochem.* 44:258-265.
- Mitsuishi, Y., M. Kobayashi & K. Matsuda. (1984) Structures of three α -D-(1 \rightarrow 2)-branched oligosaccharides isolated from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran. *Carbohydr. Res.* 127:331-337.
- Mooser, G., S.A. Hefta, R.J. Paxton, J.E. Shively & T.D. Lee. (1991) Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* α -glucosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 266:8916-8922.
- Monsan, P. & A. López-Munguía. (1981) On the production of dextran by free and immobilized dextranase. *Biotechnol. Bioeng.* 23:2027-2037.
- Monsan, P., F. Paul, D. Auriol & A. López. (1987) Dextran synthesis using immobilized *Leuconostoc mesenteroides* dextranase. *Methods Enzymol.* 136:239-254.
- Monsan, P., F. Paul, M. Remaud & A. López-Munguía. (1989) Novel enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Food Biotechnol.* 3:111-130.
- Monsan, P. (1993) Oligosaccharides ...ou oligosaccharines?. *Biofutur.* No. 125. pp. 29-30.
- Neely, W.B. & J. Nott. (1962) Dextranase, an induced enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochem.* 1:1138-1140.
- Nilsson, K. (1988) Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends Biotechnol.* 6:256-264.
- Nilsson, K. (1981) Use of glycosidases and glycosyltransferases in the synthesis of complex oligosaccharides and their glycosides. En: *Enzymes in Carbohydrate Synthesis.* pp. 51-62. American Chemical Society. Washington D.C., E.U.A.
- Oriol, E., F. Paul & P. Monsan. (1987) Transfer reaction of glycosyl residues to maltose and purified oligosaccharides using highly active *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Enz. Eng.* 501:210-215.
- Park, J.M., C.Y. Choi, B.L. Seong & M.H. Han. (1982) Effect of mass transfer in a recirculation batch reactor system for immobilized penicillin amidase. *Biotechnol. Bioeng.* 24:2215-2226.
- Paul, F., E. Oriol, D. Auriol, R.M. Willemot & P. Monsan. (1984) Effect of maltose in the reaction of highly purified *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase: kinetic study and product characterization. En: *Third European Congress on Biotech.* Vol 1. pp.383-388.

- Paul, F., E. Oriol, D. Aurioi & P. Monsan. (1986) Acceptor reaction of a highly purified dextranucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. *Carbohydr. Res.* 149:433-441.
- Perry, R. & C. Chilton (1973) *Chemical Engineers' Handbook*. 5a.ed. p.5-52. Mc Graw-Hill, Inc.
- Remaud-Simeon, M., A. López-Munguía, V. Pelenc, F. Paul & P. Monsan. (1993) Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1 \rightarrow 2) linkages. *Appl. Biochem. Biotech.* (in press)
- Roby, J.F., B.K. Kimble & T.F. Walseth. (1974) The mechanism of dextranucrase action. *Arch. Biochem. & Biophys.* 165:634-640.
- Roby, J.F. & T.F. Walseth. (1978) The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.* 61:433-445.
- Roby, J.F. (1986) Dextran. En: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Vol. 4. 2a. ed. pp. 752-767. Eds. Mark F., M. Bikales, G. Overberger & G. Menyes. John Wiley & Sons, Inc. N. York. E.U.A.
- Roby, J. F. (1991) Reactions of glucanucrases in the biomass conversion of sucrose. En: *Enzymes in biomass conversion*. No. 460 ACS Symposium Series. pp. 394-406. Eds. G.F. Leatham & M.E. Himel. American Chemical Society, Washington D.C., E.U.A.
- Segel, I.H. (1975) *Enzyme kinetics*. pp. 208-218. John Wiley & Sons, Inc. New York. E.U.A.
- Seymour, F.R., M.E. Slodki, R.D. Plattner & A. Jeanes. (1977) Six unusual dextrans: methylation structural analysis by combined G.L.C.-M.S. of per-O-acetyl-aldonitriles. *Carbohydr. Res.* 53:153-166.
- Seymour, F.R., E.C. Chen & S.H. Bishop. (1979 a) Methylation structural analysis of unusual dextrans by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* 68:113-121.
- Seymour, F.R., R.D. Knapp, E.C. Chen, A. Jeanes & S.H. Bishop. (1979 b) Structural analysis of dextrans containing 2-O- α -D-glycosylated α -D-glucopyranosyl residues at the branch points, by use of ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* 71:231-250.

- Smiley, K.L., M.E. Stodki, J.A. Boundy & R.D. Plattner. (1982) A simplified method for preparing linear isomalto-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 108:279-283.
- Smith, E.E. (1970) Biosynthetic relation between the soluble and insoluble dextrans produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Febs lett.* 12:33-37.
- Stewart, W.W. & H.E. Swaisgood. (1993) Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards. *Enzyme Microb. Technol.* 15:922-927.
- Sumner, J.B. & S.F. Howell. (1935) A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108: 51-54.
- Tanriseven, A. & J.F. Robyt. (1993) Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentrations. *Carbohydr. Res.* 245:97-104.
- Torii, M., E.A. Kabat & H. Weigel. (1968) Immunochemical studies on dextrans. *J. Immunol.* 96:797-805.
- Torii, M., B.P. Alberto & S. Tanaka. (1980) Immunochemical studies on dextrans. *J. Biochem.* 88:1855-1859.
- Tsuchiya, H.M., H.J. Koespell, J. Corman, G. Bryant, M.O. Bogard, V.H. Feger & R.W. Jackson. (1952) The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 64:521-527.
- Valette, P., V. Pelenc, Z. Djouzi, C. Andrieux, F. Paul, P. Monsan & O. Szylił. (1993) Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J. Sci. Food. Agric.* 62:121-127.
- Watanabe T., M. Chiba, Y. Matsuda, F. Sakurai, M. Kobayashi & K. Matsuda. (1980) Acetolysis of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran. Isolation and characterization of oligosaccharides containing secondary linkages from the borate-soluble fraction. *Carbohydr. Res.* 83:119-127.
- Wayne, H.P. (1975) Design and operation of immobilized enzyme reactors. En: *Immobilized enzymes for industrial reactors*. Ed. Ralph A. Messing. Academic Press, N. York, E.U.A.
- Yasawa, K. & Z. Tamura. (1982) Search for sugar sources for selective increase of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 1:39-44.