

00567
2ej. 2

**EFFECTO DE LOS OXIANIONES EN LA SINTESIS
ENZIMATICA DE DEXTRANAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIA DE ALIMENTOS
OPCION: **QUIMICA DE ALIMENTOS**
P R E S E N T A :
MARIA DE LOS ANGELES VALDIVIA LOPEZ

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

I N D I C E

	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCION	3
II. GENERALIDADES	8
II.1 DEXTRANAS	8
ESTRUCTURA	12
SINTESIS ENZIMATICA	13
MECANISMO DE SINTESIS ENZIMATICA	18
RAMIFICACIONES	20
REACCION DE ACEPTOR	21
II.2 PRODUCCION DE DEXTRANAS	27
FERMENTACION CONVENCIONAL	27
METODO INDIRECTO	29
<u>PH DEL MEDIO DE FERMENTACION</u>	31
<u>TEMPERATURA Y AIREACION</u>	34
<u>NUTRIMENTOS</u>	35
II.3 PURIFICACION DE LA ENZIMA POR EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO	35
II.4 BORATOS	40

III. MATERIALES Y METODOS.....	48
III.1 FERMENTACION Y OBTENCION DE LA DEXTRANSACA- RASA.....	48
III.1.1 PURIFICACION.....	51
III.1.2 ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	53
III.1.3 PRUEBAS DE ESTABILIDAD.....	55
III.2 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES.....	55
III.3 EFECTO DE LOS BORATOS SOBRE LA ACTIVIDAD EN- ZIMATICA EN FUNCION DEL PH	56
III.4 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA CINETICA DE LA DEXTRANSACARASA.....	56
III.5 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA REACCION DE ACEP TOR.....	58
III.5.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	58
III.5.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRE- SION.....	59
IV. RESULTADOS.....	61
IV.1 FERMENTACION Y OBTENCION DE LA DEXTRANSACA- RASA	61
IV.1.1 PURIFICACION	65
IV.1.2 PRUEBAS DE ESTABILIDAD.....	67

IV.2 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES	70
IV.3 EFECTO DE LOS BORATOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN FUNCION DEL PH	72
IV.4 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA CINETICA DE LA DEXTRANSACARASA	74
<u>ENZIMA SIN BORATOS</u>	74
<u>ENZIMA CON BORATOS</u>	76
IV.5 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA REACCION DE ACEPTOR.....	87
IV.5.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	87
IV.5.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION.....	90
V. CONCLUSIONES	104
VI. BIBLIOGRAFIA	109
APENDICE	113

INDICE DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1	ESTRUCTURA DE LAS DEXTRANAS.....	14
FIGURA 2	SINTESIS DE DEXTRANA.....	16
FIGURA 3	MECANISMO DE SINTESIS ENZIMATICA DE DEXTRANA....	19
FIGURA 4	MECANISMO DE REACCION PARA LA FORMACION DE RAMI- FICACIONES.....	22
FIGURA 5	MECANISMO DE LA REACCION DE ACEPTOR.....	25
FIGURA 6	FERMENTACION CONVENCIONAL.....	28
FIGURA 7	DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON EL PH.	32
FIGURA 8	PRODUCCIÓN DE ENZIMA VS. A DIFERENTES TEMPERATU- RAS.....	33
FIGURA 9	DIAGRAMA DE FASES.....	38
FIGURA 10	EQUILIBRIO QUIMICO DE LOS COMPLEJOS DE CARBOHI- DRATO-BORATO.....	43
FIGURA 11	FORMACION DE COMPLEJOS CON BORATOS EN FUNCIÓN DE PH.....	45
FIGURA 12	COMPLEJOS BORATO CON COMPUESTOS POLIHIDROXI....	44
FIGURA 13	ETAPAS INVOLUCRADAS EN LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍ- QUIDO.....	52
FIGURA 14	CRECIMIENTO DE <u>L. MESENTEROIDES</u> DURANTE LA FER- MENTACION.....	62
FIGURA 15	MODELO DE CRECIMIENTO DE PRIMER ORDEN.....	64
FIGURA 16	PRUEBAS DE ESTABILIDAD.....	69
FIGURA 17	EFFECTO DE LOS IONES BORATO EN LA DETERMINACION DE FRUCTOSA POR DNS.....	71
FIGURA 18	EFFECTO DE LOS BORATOS SOBRE EL PH OPTIMO DE LA ENZIMA.....	73
FIGURA 19	REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK.....	76
FIGURA 20	REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK.....	78

	PÁGINA
FIGURA 21	MODELOS TIPICOS DE INHIBICION ENZIMATICA..... 80
FIGURA 22	INHIBICION DE TIPO MIXTO. REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK..... 81
FIGURA 23	EFECTO DE LOS BORATOS SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCION..... 84
FIGURA 24	COMPORTAMIENTO TIPICO DE INHIBICION..... 85
FIGURA 25	PORCIENTO DE ACTIVIDAD RESIDUAL EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE BORATOS..... 86
FIGURA 26	REPRESENTACION DE CROMATOPLACA. EVOLUCION DE AZUCARES DURANTE LA SINTESIS TESTIGO Y EN PRESEN CIA DE BORATOS..... 89
FIGURA 27	CROMATOGRAMA SINTESIS TESTIGO FINAL..... 93
FIGURA 28	CROMATOGRAMA SINTESIS BORATO 0.085 M FINAL..... 94
FIGURA 29	CROMATOGRAMA SINTESIS BORATO 0.11 M FINAL..... 95
FIGURA 30	EFECTO DE LA CONCENTRACION DE BORATOS SOBRE LA PRODUCCION DE LEUCROSA..... 96
FIGURA 31	EFECTO DE LA CONCENTRACION DE BORATOS SOBRE LA PRODUCCION DE ISOMALTULOSA..... 97
FIGURA 32	EFECTO DE LOS BORATOS EN LA CONVERSION..... 100
FIGURA 33	APARICION DE LEUCROSA DURANTE LA SINTESIS 100 UDS/ML..... 102
FIGURA 34	APARICION DE ISOMALTULOSA DURANTE LA SINTESIS 100 UDS/ML..... 103

RESUMEN

Se estudió el efecto de los iones borato, en la reacción de síntesis enzimática de dextrana.

La dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F fue obtenida por fermentación retroalimentada, lográndose buenas producciones. La purificación de la enzima, del medio libre de células, se llevó a cabo por un método de extracción líquido-líquido con polietilenglicol (1500), obteniéndose rendimientos de actividad de 90%.

Al efectuar el estudio cinético, se confirmó que la enzima obedece el mecanismo de Michaelis-Menten. En presencia de iones borato, se observó que la enzima presentaba un comportamiento de inhibición mixto, a concentraciones menores de 0.04 M de tetraborato de sodio.

Se estableció que la fructosa liberada durante la reacción enzimática, es acomplejada por los iones borato, evitando el efecto aceptor de este monosacárido con el complejo enzima-glucosil. Se logró un decremento significativo en la producción de los disacáridos leucrosa e isomaltulosa, subproductos formados por la reacción de aceptor, cuando se trabajó a 0.115 M de tetraborato de sodio, bajo las condiciones de síntesis de dextrana de alto peso molecular.

ABSTRACT

The effect of borate ions on the reaction of enzymatic synthesis of dextran was studied.

Dextranase was obtained from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F through a feedback fermentation, obtaining reasonable yields. Enzyme purification from the fermentation medium free of cells, was achieved by a liquid-liquid extraction method using polyethyleneglycol (1500); activity yields were about 90%.

Enzyme studies confirmed that the enzyme follows Michaelis-Menten kinetics. In the presence of borate ions the enzyme showed mixed-type inhibition at concentrations below 0.04 M borate.

It was demonstrated that the fructose liberated during the enzymatic reaction is complexed by borate ions, avoiding the acceptor effect of this monosaccharide with the glucosyl-enzyme complex. A sensible decrease in the production of the disaccharides leucrose and isomaltulose, by-products of the acceptor reaction, was observed with a 0.115 M sodium tetraborate under the conditions for synthesis of high molecular weight dextran.

I. INTRODUCCION

El uso de enzimas se ha extendido gradualmente a una gran variedad de campos, tales como la producción de alimentos, la industria farmacéutica y la industria textil. Adicionalmente, el desarrollo reciente de la bioquímica ha dado como resultado la comprensión de los mecanismos de reacciones enzimáticas y el desarrollo de nuevas fuentes de enzimas, que aunado a los progresos en la microbiología aplicada, ha provocado la extensión de las aplicaciones enzimáticas.

En el área farmacéutica y de alimentos las dextranas han sido de particular interés. Por su naturaleza, las dextranas presentan propiedades funcionales muy interesantes, lo que permite usarlas en una gran variedad de productos. Estas propiedades están estrechamente relacionadas con su peso molecular. De acuerdo al peso molecular las dextranas se clasifican como dextranas nativas y dextranas fraccionadas.

Las dextranas nativas son las que se obtienen directamente del medio de fermentación, sin sufrir ningún procedimiento de hidrólisis o fraccionación. Estas pueden presentar pesos moleculares de 30-50 millones, dependiendo de los microorganismos que las producen.

Las dextranas fraccionadas son obtenidas a partir de las dextranas nativas por hidrólisis ácida o por síntesis directa a través del uso de moléculas que actúan como aceptores.

Las dextranas en la actualidad se usan para un gran número de propósitos industriales. Por sus características de viscosidad, las dextranas se usan en la industria del petróleo como componente básico de los fluidos de perforación de pozos, en la formulación de dentríficos, como floculantes en productos de papel, en la preparación de filamentos especiales, entre otros. En el área de alimentos se usa como agente estabilizador y espesante, en la preservación de alimentos a través de películas protectoras, en la formulación de helados, en la producción de concentrados de jugos cítricos, entre otros.

Por otro lado, las dextranas fraccionadas de peso molecular 40,000-70,000 encuentran usos importantes como sustitutos o expansores del volumen plasmático, promotores del flujo sanguíneo y como agentes antitrombóticos.

La dextrana es un polisacárido de D-glucosa producido a partir de sacarosa por diferentes bacterias. Está compuesta principalmente de enlaces α 1-6 glucosídicos y su estructura es variada dependiendo del organismo o cepa que lo produce. Industrialmente se ha trabajado con varias cepas de *Leuconostoc*

mesenteroides y en particular con la NRRL-8512F, ya que ésta produce dextrana con 95% de enlaces $\alpha 1-6$ y sólo 5% de $\alpha 1-3$.

La dextrana es sintetizada por la enzima dextranasa a partir de unidades de glucosa, que son transferidas de la sacarosa al sitio activo e insertadas entre la enzima y el extremo reductor del polímero de dextrana, liberando así unidades de fructosa.

Cabe señalar sin embargo, que si en la mezcla de reacción se adicionan o se encuentran presentes otros azúcares, estos pueden actuar como aceptores desviando el residuo glucosil de la síntesis de dextrana para formar diversos productos.

La intervención de los aceptores durante la síntesis provoca que la polimerización de la cadena de dextrana sea terminada y por lo tanto, la cantidad y el peso molecular se vean significativamente disminuidos.

Cuando la D-fructosa liberada durante la síntesis de dextrana actúa como aceptor se obtienen los disacáridos leucrosa (O- α -D-glucopiranosil-(1-5)-D-fructofuranosa) e isomaltulosa (O-D-glucopiranosil-(1-6)-D-fructofuranosa) como subproductos.

Los boratos son especies que pueden formar complejos

estables con compuestos polihidroxi. Aprovechando esta propiedad, los boratos se han usado para la modificación favorable de equilibrios enzimáticos. Una de las aplicaciones más interesantes ha sido su empleo en la reacción de isomerización de glucosa a fructosa donde la adición de boratos permitió un incremento significativo en el rendimiento de cetosa (1). Asimismo los boratos presentan mayor afinidad química por la fructosa que por otros monosacáridos.

Con base en estos antecedentes y tratando de contribuir al avance en el conocimiento de las características cinéticas de la enzima, así como en la búsqueda de alternativas para modificar las concentraciones de los productos que se obtienen bajo la acción de la dextranacarasa, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

Los boratos al formar un complejo con la fructosa, impiden que este azúcar actúe como aceptor durante la síntesis de dextrana, evitando el decremento en el rendimiento del polímero y como consecuencia una disminución en la producción de los disacáridos leucrosa e isomaltulosa.

Para comprobar esta hipótesis de trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecer si existe interacción entre los boratos y la enzima dextranacarasa a través de la evaluación de los parámetros cinéticos de la enzima en presencia del oxianión.
2. Establecer el tipo de interacción que ocurre entre la enzima y los boratos.
3. Establecer niveles óptimos de oxianión para lograr la mínima concentración de subproductos sin sacrificar la actividad de la enzima.

II. GENERALIDADES

II.1 DEXTRANAS.

Los polímeros son de gran importancia en el mundo biológico. Las estructuras de algunos biopolímeros son prácticamente ilimitadas. Muchos biopolímeros poseen ciertas estructuras complejas que influyen de manera importante sobre las propiedades funcionales de las moléculas.

Pasteur fue el primero en estudiar a las dextranas en 1861. Su fórmula empírica fue determinada en 1874 por Scheibler ($C_6H_{10}O_5$), quien fue el que las denominó dextranas. La formación de la dextrana se reconoció como resultado de la transformación de soluciones de sacarosa a soluciones viscosas, geles y material floculante precipitable.

Las dextranas son moléculas de D-glucosa. Existen gran variedad de dextranas, difiriendo entre sí por determinadas características físicas y químicas como son: la rotación específica, la viscosidad intrínseca, las propiedades de solubilidad en agua y la proporción de las diversas unidades glucopiranosidas que presentan.

La dextrana es un polisacárido producido a partir de

sacarosa por bacterias. Está compuesta principalmente por enlaces α 1-6 glucosídicos y su estructura varía en función del organismo o cepa que la produce, muchas de las cuales son cariogénicas (2).

Las dextranas han sido consideradas como contaminantes en preparaciones alimenticias que contienen sacarosa. Por ejemplo, puede producirse por bacterias contaminantes en vino, cerveza de raíz, jugo de caña, jugo de fruta y jamones curados con sacarosa. Las dextranas son un problema en la industria azucarera, donde ocasiona oclusiones en filtros, inhibe la cristalización, reduce la producción y distorsionan las mediciones de rotación óptica usadas en la estandarización y determinación de pureza de la sacarosa. En los años 70's se estableció que las dextranas son el principal componente de la placa dental y están involucradas en el desarrollo de las caries dentales.

Sin embargo, las dextranas y sus derivados, han encontrado usos muy cotizados como extensores del plasma sanguíneo, anticoagulantes, aditivos en alimentos, gomas de alta viscosidad y otras aplicaciones.

La principal bacteria sintetizadora de dextrana pertenece, según nomenclatura de Bergey (3), a la familia *Lactobacteriaceae*, tribu *Sicciptrococceae*, género *Leuconostoc*,

especie *L. mesenteroides* y *L. dextranicum*.

Adicionalmente, se ha demostrado que otras especies producen polisacáridos similares a la dextrana. Jeanes et al. (2) fueron de los primeros investigadores que caracterizaron y clasificaron las dextranas producidas por un gran número de microorganismos correspondientes a cinco géneros diferentes. Los polisacáridos fueron caracterizados por oxidación con periodato y por sus propiedades físicas.

Se estableció que los polisacáridos tenían relativamente grandes cantidades de enlaces α 1-6 con cantidades variables de enlaces α 1-2, α 1-3 y α 1-4, dependiendo de la cepa del microorganismo. En la Tabla I se presenta una clasificación de las dextranas en función del microorganismo productor.

Janes et al. (2) demostraron también que dos cepas de *Streptobacterium dextranicum* son capaces de producir dextrana y que todas las especies clasificadas tienen la característica común de utilizar únicamente a la sacarosa como sustrato para la síntesis del polisacárido.

Las glucansacarosas de los *Leuconostocs* son inducibles y las glucansacarosas de los *Streptococci* son constitutivas. Es importante señalar que la estructura química de la dextrana está estrechamente relacionada a la cepa específica que la produce.

TABLA I

CLASIFICACION DE DEXTRANAS
DE ACUERDO AL MICROORGANISMO

DEXTRANA	SOLUBILIDAD	% ENLACES				
		1-6	1-3	1-3Er	1-2Er	1-4Er
L. m B-512F	S	95	5			
L. m B-742	S	50		50		
L. m B-742	L	87				13
L. m B-1299	S	65			35	
L. m B-1299	L	66		1	27	
L. m B-1355	S	54	35	11		
L. m B-1355	L	95		5		
S. m 6715	S	64		36		
S. m 6715	I	4	94	2		

L. m Leuconostoc mesenteroides

S. m Streptococcus mutans

S soluble

L poco soluble

I insoluble

Er enlace ramificado

Fuente: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering (5).

El Northern Regional Research Laboratory (Department of Agriculture's Bureau of Agricultural and Industrial Chemistry U.S.) aisló una cepa de *L. mesenteroides* en 1943 y la clasificó bajo el número NRRL B-512. Los resultados sobre la fermentación, la producción y la caracterización química de la dextrana de la cepa B-512 fueron publicados por Jeanes et al. (4). La dextrana producida por este microorganismo tiene aproximadamente 95% de enlaces α 1-6. Posteriormente, investigaciones realizadas por la Commercial Solvents Corp. sobre varias cepas de *L. mesenteroides* productoras de dextranas concluyeron que la cepa B-512 era la cepa ideal para la producción de dextranas para uso clínico (4).

Las células de *L. mesenteroides* NRRL B-512 F son esféricas lenticulares. Este microorganismo es anaerobio facultativo, gram positivo, no es formador de esporas y no es patógeno. Los nutrientes indispensables para su crecimiento son ácido nicotínico, tiamina, ácido pantoténico, biotina y los aminoácidos valina y ácido glutámico.

ESTRUCTURA

La estructura aproximada de las dextranas fue determinada en 1954 (2). Por análisis de metilación se demostró que la estructura de las dextranas producidas por *Leoprostoc mesenteroides* B-512F contenían 95% de enlaces α 1-6 y 5% de α 1-3.

Las dextranas pueden ser divididas en tres clases con base en sus características estructurales (5). La clase 1 son dextranas que contienen en la cadena principal enlaces consecutivos α 1-6 con ramificaciones en las posiciones 2, 3 ó 4. La clase 2 son dextranas que contienen enlaces no consecutivos α 1-3 y α 1-6 y ramificaciones dadas por enlaces α 1-3. Por último la clase 3 son dextranas que contienen enlaces consecutivos α 1-3 y ramificaciones dadas por α 1-6. En la Figura 1 se esquematiza la estructura de las dextranas.

La dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F es una dextrana clásica de la clase 1 y presenta 95% de enlaces α 1-6 consecutivos y 5% de enlaces α 1-3 que forman ramificaciones. Existe controversia sobre la longitud de las cadenas ramificadas. Algunos estudios químicos indican que la mayor parte de las cadenas laterales son residuos simples de glucosa unidos por enlaces α 1-3 con pocos residuos de glucosas unidos por enlaces α 1-6 (5). Sin embargo, estudios físicos han señalado que las cadenas laterales son relativamente grandes, aproximadamente entre 50 y 100 residuos de glucosa unidos por enlaces α 1-6.

SINTESIS ENZIMÁTICA

La dextrana se sintetiza por la enzima dextranasa. Esta enzima es producida por *L. mesenteroides* por inducción de la

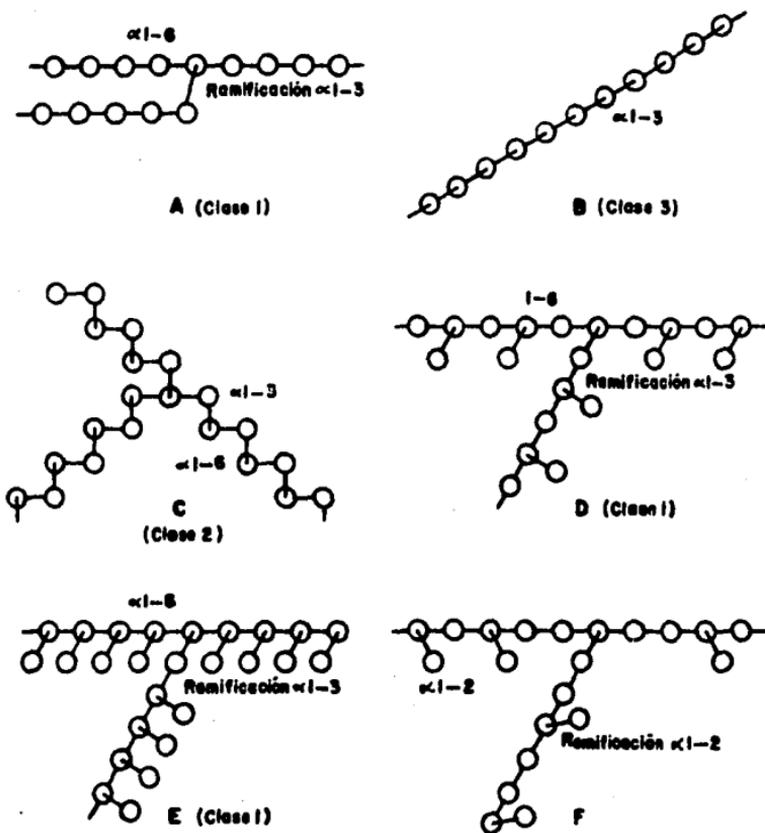


FIGURA 1.- Estructuras de los Dextranos.

A.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-512 F
B.- <u>Streptococcus mutans</u>	
C.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-1355
D.- <u>Streptococcus mutans</u>	
E.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-742
F.- <u>Leuconostoc mesenteroides</u>	B-1299

sacarosa. Aparentemente, la porción fructofuranosa de la molécula es la que provoca que la inducción tenga lugar.

Los primeros trabajos sobre síntesis enzimática de dextranas, se llevaron a cabo por Hehre et al. (6); Hehre y Sugg (7), quienes demostraron en medios libres de células de *L. mesenteroides* la síntesis de dextrana a través de una enzima. La enzima involucrada fue denominada dextransacarasa.

Estos autores demostraron que el microorganismo puede crecer también en varias fuentes de carbono como glucosa, maltosa, azúcar invertido y fructosa. Sin embargo, observaron que con estos azúcares no se induce la formación de la enzima. Por lo tanto se concluyó que la sacarosa es fundamental para la producción de la enzima. La energía relativamente alta (17.7-20.9 KJ/mol= 4-5 Kcal/mol) de la hidrólisis de sacarosa se utiliza por la enzima para sintetizar el enlace α 1 \rightarrow 6 de la cadena principal, como se indica en la Figura 2.

La dextransacarasa de *L. mesenteroides* B-512 es secretada en cantidades relativamente grandes al medio de cultivo con un mínimo de enzimas contaminantes relacionadas y es formadora de dextranas solubles de alto peso molecular.

La acción de esta cepa puede compararse con otras cepas de

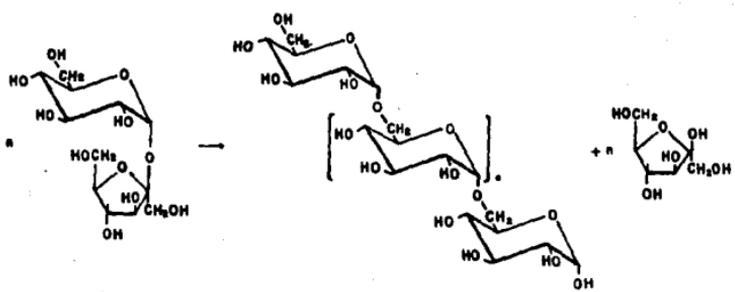


FIGURA 2- Síntese de Dextrano Enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$

L. mesenteroides y de Streptococci formadoras de la placa dental. Estas cepas pueden formar dextranas solubles e insolubles y pueden sintetizar varios tipos de dextranasa, conjuntamente con enzimas contaminantes, como invertasa y levansacarasa. Las enzimas asociadas a la producción de dextranasa B-512F son levansacarasa, invertasa y dextranasa.

La enzima dextranasa (sacarosa α 1,6 α -D-glucan 6 glucosiltransferasa E.C. 2.4.1.5) es responsable de la síntesis de los enlaces glucosídicos α 1-6.

Estudios cualitativos sobre la estructura de la enzima, evidenciaron que se trata de una glucoproteína constituida en la porción de carbohidrato por D-manosa y en la proteína por los aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, serina, prolina, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, lisina e histidina.

Algunas propiedades importantes de la enzima se señalan a continuación: el peso molecular de la enzima en preparaciones purificadas es de 280,000. El pH óptimo para la actividad y estabilidad es de 5.2 y es independiente de la naturaleza de la solución reguladora (8). La dextranasa es una enzima de especificidad absoluta, siendo la sacarosa la única sustancia que puede actuar como sustrato.

Los valores de Km reportados para la sacarosa son de 0.02-0.03 M. La energía de activación de la reacción en el intervalo niveles de temperatura entre 15 y 30 C es de 4-5 Kcal/mol (5).

MECANISMO DE SINTESIS ENZIMATICA

El mecanismo propuesto por Robyt et al. (9) para la biosíntesis de la dextrana, sugiere que la glucosa de la molécula de sacarosa se transfiere al final reductor de la dextrana, donde la glucosa y la dextrana se enlazan covalentemente a la enzima. Por otra parte, la glucosa ligada a la enzima sirve como un residuo donador para la polimerización de la dextrana. Este mecanismo se ilustra en la Figura 3.

Se puede observar que la enzima tiene dos grupos catalíticos equivalentes: X1 y X2. Al inicio de la síntesis, la enzima ataca a la sacarosa para dar complejos glucosídicos. El OH del Carbono 6 de una de estas unidades de glucosa lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el Carbono 1 de la otra unidad de glucosa, formando un enlace α 1-6 glucosídico. La formación de este enlace provoca la liberación de uno de los grupos nucleofílicos que al atacar al Carbono 1 de la unidad de isomaltosil forma un complejo enzima isomaltotrisil. Conforme el proceso se desarrolla, los dos grupos catalíticos antes mencionados, forman alternadamente complejos covalentes con la glucosa y la dextrana.

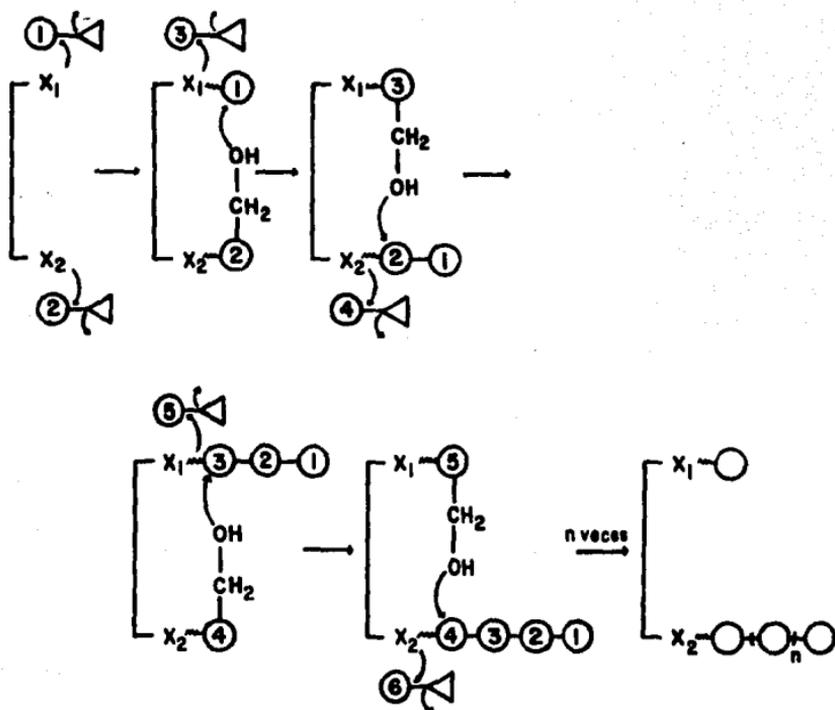


FIGURA 3 Mecanismo de Síntesis Enzimática de Dextrana.

La cadena de dextrana crece entonces por inserción de unidades glucosa que son transferidas de la sacarosa al sitio activo y se localizan entre la enzima y el final reductor del polimero de dextrana. La cadena de dextrana es liberada de la enzima cuando una molécula del aceptor (por ejemplo, fructosa o glucosa) alcanza la concentración suficiente para actuar sobre el sitio activo de la enzima a través de un ataque nucleofílico de los grupos hidroxilo sobre la dextrana. Asimismo, las cadenas de dextrana exógenas puede actuar para producir un enlace ramificado.

En la biosíntesis de la dextrana hay dos aspectos relevantes que la hacen diferente de otros mecanismos de producción de biopolímeros. Primero, la biosíntesis no requiere de ningún intermediario fosforilado de alta energía (nucleótido) y segundo, la energía necesaria para llevar a cabo la biosíntesis es proporcionada por la hidrólisis de la sacarosa.

RAMIFICACIONES

En 1976 Robyt y Taniguchi (10) demostraron que la síntesis de los enlaces $\alpha 1+3$ de la dextrana por la enzima de *L. mesenteroides* NRRL 8512 F ocurre cuando el OH del Carbono 3 de las moléculas de dextrana libres atacan nucleofílicamente al Carbono 1 del grupo glucosil y al Carbono 1 del grupo

dextranosil desplazándolos del complejo. El mecanismo de reacción para la formación de ramificaciones se ilustra en la Figura 4.

REACCION DE ACEPTOR

Cuando otros carbohidratos además de la sacarosa son adicionados a la mezcla dextransacarasa-sacarosa el grupo glucosil de la sacarosa es desviado de la síntesis de dextrana y se incorpora al carbohidrato receptor, llamado aceptor. Algunos carbohidratos de bajo peso molecular, tales como monosacáridos, disacáridos o trisacáridos y el residuo de glucosa son aceptores y una serie de productos aceptores homólogos pueden presentarse durante la síntesis (11). Los productos así obtenidos son también de bajo peso molecular, que, por otra parte puede solamente incrementarse por el peso molecular del grupo D-glucosil incorporado. Cabe señalar que algunos de los productos generados en la reacción de aceptor también pueden actuar como aceptores. En estos casos, una serie de productos aceptor homólogos resultan de la reacción de aceptor de la dextransacarasa. Es decir, la formación de los productos aceptor ocurre a expensas de la síntesis de dextrana.

Sin embargo, con algunos carbohidratos, los productos obtenidos no actúan como aceptores o bien presentan propiedades

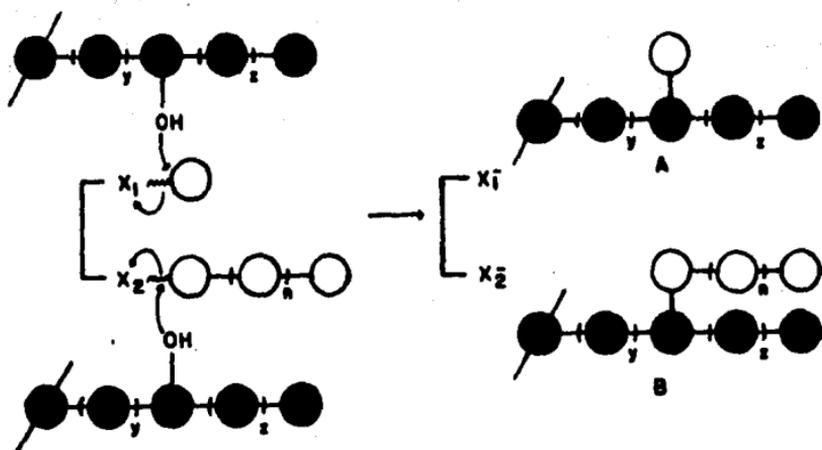


FIGURA 4. Mecanismo de Reacción para la Formación de Ramificaciones

de aceptores pobres, como consecuencia no se obtiene ningún producto resultante de la reacción. Este es el caso de la fructosa que cuando actúa como aceptor forma el disacárido leucrosa (d-glucopiranosil 1-5 D-fructosa), el cual ya no actúa como aceptor.

Una gran variedad de carbohidratos pueden actuar como aceptores como se señala en la Tabla II. Ebert y Schenk (12) clasificaron algunos de los aceptores como fuertes, intermedios y débiles. Estudios sobre el mecanismo demuestran que el aceptor interactúa con la enzima glucosil o el intermediario enzima dextranosil para liberar la glucosa o cadena de dextrana del sitio activo de la enzima, con la formación de un enlace covalente entre la glucosa o la dextrana y el aceptor. Cuando el aceptor desplaza la dextrana del sitio activo, la polimerización de la cadena de dextrana se termina y, por lo tanto, decrece la cantidad y el peso molecular de la goma. En la Figura 5 se ilustra el mecanismo de la reacción de aceptor.

Como se mencionó con anterioridad, cuando una cadena de dextrana de alto peso molecular es el aceptor, un grupo OH del Carbono 3 de la cadena de aceptor de dextrana, ataca el Carbono 1 de la unidad glucosil o dextranosil del complejo enzima para liberar glucosa o dextrana y formar un enlace ramificado entre la dextrana aceptor y la glucosa o dextrana de la enzima. Este

TABLA II

**ACEPTORES Y PRODUCTOS GENERADOS BAJO LA ACCION
DE DEXTRANSACARASA DE L. mesenteroides.**

Aceptor	Productos Generados
D-glucosa	series de isomaltodextrinas
D-fructosa	leucrosa e isomaltulosa
D-maltosa	panosa y homólogos de isomaltodextrinas
isomaltulosa	series de isomaltodextrinas
D-galactosa	D-glucopiranosil D-galactofuranosido
B-512F dextrana	1,3-dextranosil-dextrana β
	1,3-glucopiranosil dextrana

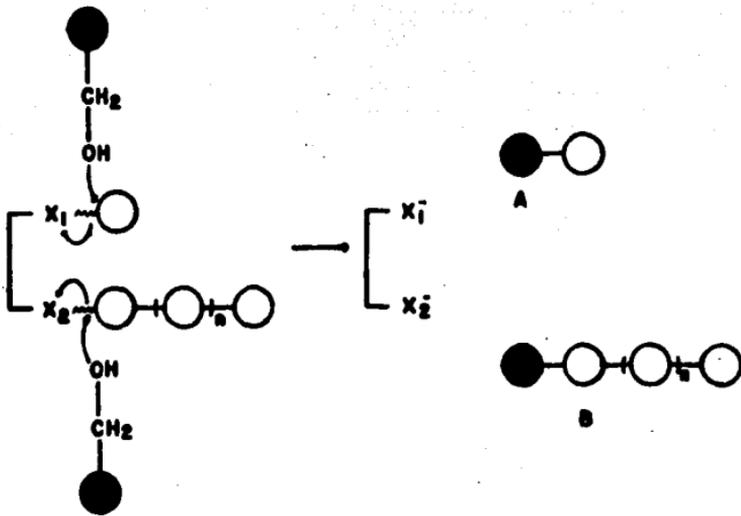


FIGURA 5. Mecanismo de la Reacción de Aceptor.

A. Leucoses (D - glucopiranosil
1→5 D-fructosa)

B. Dextrana

mecanismo se ilustra en la Figura 4. Esta reacción del aceptor provoca la terminación de la elongación y en el caso en el que la dextrana es el aceptor provee un mecanismo para la síntesis de eniaces ramificados.

En la síntesis de dextrana, a partir de sacarosa por dextransacarasa B-512, los disacáridos leucrosa e isomaltulosa son formados siempre como subproductos. Estos resultan de las reacciones de aceptor de la D-fructosa liberada de la sacarosa en la reacción de polimerización. Adicionalmente, se produce D-glucosa libre por la acción de aceptor del agua que libera la unidad D-glucosil del sitio activo.

De la gran variedad de azúcares de bajo peso molecular o derivados de azúcares que puedan actuar como aceptores la maltosa es uno de los más eficientes. Este azúcar desvía el 75% de los grupos D-glucosil de la sacarosa a la formación de una serie de homólogos de la panosa (O- α -D-glup-(1-6)-O- α -D-Glp-(1-4)-D-Glup). Asimismo, se ha establecido que conforme el nivel de maltosa se incrementa, el tamaño de los oligosacáridos formados decrece. Cabe señalar, que la cantidad de D-glucosa desviada de la dextrana a productos de aceptor depende de la relación aceptor-sacarosa (13).

II.2 PRODUCCION DE DEXTRANAS

Las dextranas se pueden producir por un procedimiento de fermentación convencional o por métodos indirectos que implican la obtención de dextransacarasa en condiciones óptimas para su elaboración, seguida de síntesis enzimática.

FERMENTACION CONVENCIONAL.

La producción de dextrana por este método se acompaña por el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*. La dextrana se obtiene directamente del medio de fermentación por precipitación con etanol. En este proceso tres fases toman lugar: fase de crecimiento del microorganismo, fase de producción de la enzima y fase de reacción enzima-sacarosa. Sin embargo, este proceso convencional presenta las desventajas de que la propagación de células, la producción de enzima y la síntesis de dextrana tienen lugar bajo un mismo conjunto de condiciones que cambian durante el curso de la fermentación, como se ilustra en la Figura 6. Por otra parte, la propagación de células y la producción presentan un rendimiento óptimo a niveles diferentes de pH: 6.9 y 6.7, respectivamente. Por lo tanto, en el método convencional los rendimientos óptimos no se alcanzan.

Con base en este análisis, se reconoció que la producción de

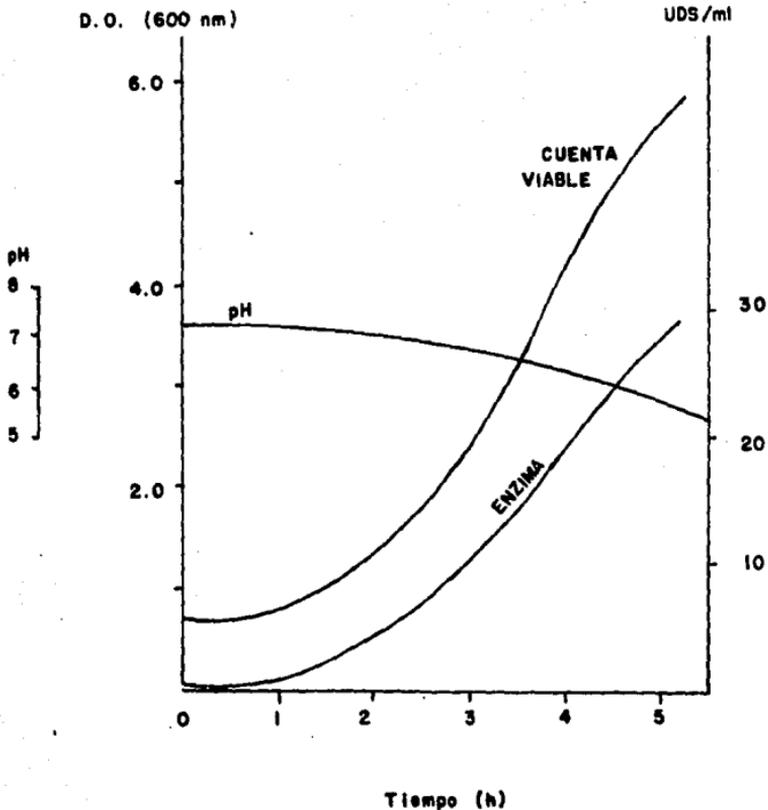


FIGURA 6. FERMENTACION CONVENCIONAL EN VOLUMEN DE

3L Y TEMPERATURA: 27-28°C

UDS/ml: UNIDADES DEXTRANSACARASA /ml

Fuente: Aisop, R. M. (17)

una solución enzimática libre de células permitiría la síntesis de dextrana bajo condiciones controladas, obteniendo el polímero puro.

METODO INDIRECTO

Dado que la mayoría de las especies productoras de dextranas presentan una enzima extracelular, es factible aislarla y llevar a cabo la síntesis de la dextrana en ausencia del microorganismo.

Los procedimientos para la síntesis enzimática de dextranas incluyen las siguientes fases:

1. Producción de la enzima.
2. Eliminación de las células bacterianas del medio de producción.
3. Síntesis de dextrana en una mezcla de reacción conteniendo la enzima y el sustrato en condiciones cuidadosamente reguladas.
4. Fraccionamiento y purificación de la dextrana.

Los estudios básicos sobre la dextransacarasa llevados a cabo por Hehre (6) y Hehre y Sugg (7), constituyen la base de extensas investigaciones sobre la síntesis enzimática. Koepsell y Tsuchiya (14) publicaron un procedimiento para la producción rápida de dextransacarasa con elevados rendimientos.

Tsuchiya (15), describió los efectos de diversas condiciones de cultivo sobre la producción de dextranasa por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 F. El medio de cultivo empleado para la producción de enzima incluía 2% de sacarosa, 2% de líquido de remojo de maíz, 0.1% de fosfato monopotásico y 0.3% de mezcla de sales (sulfato de magnesio 4%, cloruro de sodio 0.2%, sulfato de manganeso 0.2% y sulfato ferroso 0.2%).

Al estudiar el efecto del pH sobre la producción de enzima Tsuchiya (15) encontró que la máxima producción era obtenida a pH de 6.7 aunque a este pH la enzima era rápidamente inactivada a temperatura de 25 C. El pH óptimo de actividad fue 5.2 y a este valor la enzima era estable en presencia de iones calcio. Tsuchiya (15) encontró que los iones amonio ejercían un efecto adverso sobre la producción de enzima por lo que era preferible el uso de NaOH para el control del pH. Una concentración de sacarosa del 2% fue la óptima para evitar la síntesis extensiva de dextrana que se observa con concentraciones superiores y que resulta en un aumento de la viscosidad, con lo que se dificulta la eliminación de las células bacterianas.

Con este medio, las concentraciones de enzima obtenidas fueron de 40 UDS/ml - 70 UDS/ml; UDS= Unidades Dextranasa. Una unidad de dextranasa (UDS) se define como la cantidad de enzima que transforma un mg de sacarosa en dextrana en una hora, liberando 0.52 mg de fructosa.

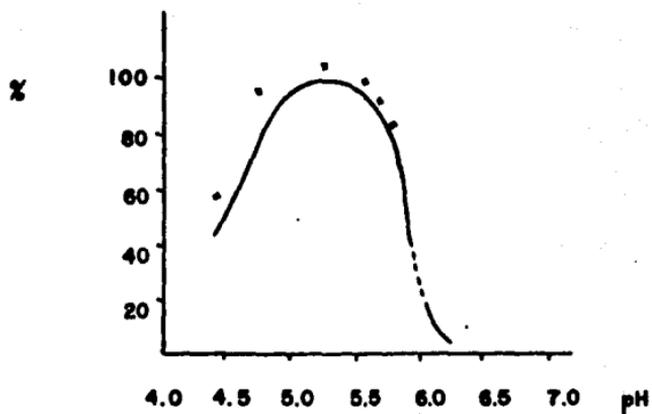
Cabe señalar, que trabajos realizados por López y Monsan (16) dieron como resultado producciones más altas de enzima. Para una adición continua de sacarosa, 20 g/l/h, estos autores obtuvieron 180 USD/ml en el sobrenadante de fermentación.

Adicionalmente en trabajos llevados a cabo por Schneider (17) en fermentaciones a gran escala se obtuvieron producciones hasta de 300 USD/ml.

Estas producciones tan elevadas de enzima se lograron, fundamentalmente, por el control en la adición de la sacarosa durante la fase activa de crecimiento cuando la producción de enzima es inducida. Asimismo, factores durante la fermentación que merecen especial cuidado para optimizar el proceso son, el pH, la temperatura y aireación y los nutrimentos esenciales para *Leuconostoc mesenteroides*. En las Figuras 7 y 8 se ilustra el efecto del pH y el de temperatura.

pH del medio de fermentación

El crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* depende de la fuente de carbono disponible. Esta se fermenta por la vía de hexosa monofosfato produciendo ácido láctico, CO₂ y etanol. Por otra parte el metabolismo aeróbico oxidativo genera dióxido de carbono, ácido láctico y ácido acético.



**FIGURA 7. DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
CON EL. pH. Fuente: Alsop, R. M. (17)**

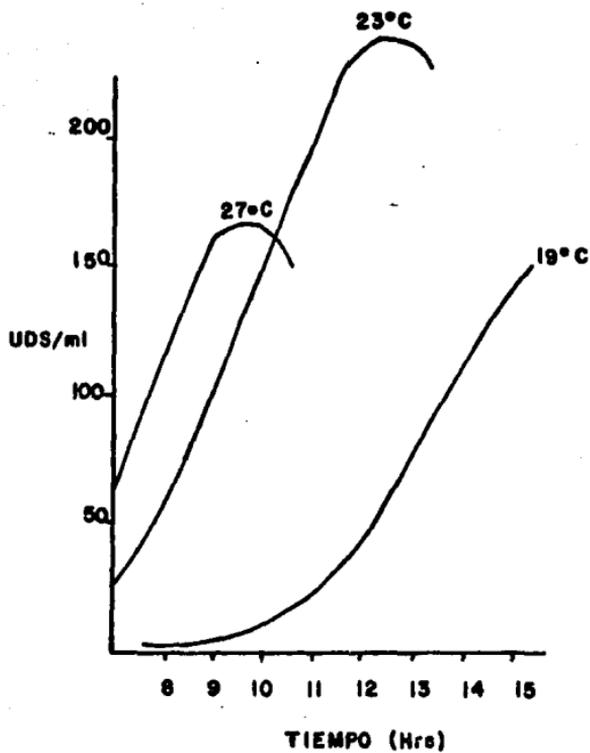


FIGURA B. PRODUCCION DE ENZIMA vs TIEMPO A DIVERSAS TEMPERATURAS. pH 6.7

Fuente: Alsop, R. M. (17)

El control del pH a través de la adición de Alkali durante el proceso es de suma importancia. El valor óptimo para la producción de enzima reportado por Koepsell es 6.5-7.0, ajustando posteriormente a pH 5.2 para procurar la estabilidad de la enzima y permitir la medición de la actividad.

Para evitar una pérdida significativa de la actividad se recomienda que en la etapa final de la fermentación se lleve a cabo el ajuste del pH a 5.2. El cambio de pH estimula la conversión de la sacarosa residual a la goma y ofrece las condiciones óptimas de estabilidad de la enzima. En la Figura 7 se ilustra la dependencia de la actividad de la dextranasa en relación al pH.

Temperatura y aireación

En un proceso de fermentación la temperatura es uno de los parámetros que exige un mayor control. Alsop (17) reporta buenas producciones de enzima a intervalos de temperatura entre 19 y 27 C, y establece como temperatura óptima: la de 23 C, como se muestra en la Figura 8. Asimismo, Alsop reporta que mediante la aireación se incrementa el crecimiento del microorganismo y por tanto la producción de enzima.

Nutrientes

El medio de crecimiento para *Leuconostoc mesenteroides* y para la producción de dextransacarasa deberá contener sacarosa como fuente de carbono, una fuente de nitrógeno orgánico, generalmente líquido de remojo de maíz o extracto de levadura, que adicionalmente proveen factores de crecimiento necesarios para el microorganismo, una fuente de fosfato, normalmente KH_2PO_4 , que adicionalmente tiene capacidad de amortiguar el pH del medio de cultivo. Por otra parte, es importante adicionar elementos traza para asegurar el buen desarrollo de la bacteria. En los medios de fermentación reportados en la literatura existe una suplementación de ciertos elementos que no son proporcionados de manera adecuada por los materiales utilizados como fuente de nitrógeno. Koepsell (14) reportó la utilización de una mezcla de minerales conocida como "sales R", que incluyen sales de magnesio, manganeso, hierro y sodio. Posteriormente se introdujo el empleo de sales de calcio para obtener una mayor estabilidad de la enzima.

II.3 PURIFICACION DE LA ENZIMA POR EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO

Las técnicas que habitualmente se utilizan para la purificación de enzimas se basan en propiedades fisicoquímicas de las partículas. Tal es el caso de la carga eléctrica utilizada,

en la técnica de electroforesis, el peso molecular en la técnica de cromatografía de exclusión en gel, las separaciones efectuadas por una acción precipitante de los solventes orgánicos que al modificar la constante dieléctrica del solvente incrementan las fuerzas de atracción entre las moléculas. Los objetivos en estas operaciones es retener en lo posible, la enzima activa y desechar otras macromoléculas. La eficiencia en cada etapa está dada por el porcentaje de la actividad total de enzima originalmente presente, que es retenida (rendimiento o producción) y la purificación o factor de purificación (el factor por el cual la actividad específica de la preparación se ve incrementada). El objetivo en la purificación es optimizar ambos factores.

En los años 60's, el equipo de Albertsson (18) desarrolló una técnica nueva de fraccionación de células, organelos y macromoléculas, con base en la extracción líquido-líquido, que permite preservar la integridad del material biológico. En contraste, en esta técnica los solventes orgánicos, que generalmente se utilizan para esta operación en la química clásica, son reemplazados por polímeros solubles en agua.

El principio de la extracción líquido-líquido se basa esencialmente en que las moléculas en solución no son inertes sino que interaccionan entre ellas, lo que determina directamente el comportamiento del sistema.

Las moléculas de tamaño importante y solubles en un mismo solvente conducen frecuentemente a la aparición de fases líquidas inmiscibles. Este fenómeno es llamado separación de fases.

Albertsson (18) cita pares de polímeros que conducen a la aparición sistemas bifásicos:

- Dextrana-PEG (polietilenglicol)
- Dextrana-Metilcelulosa
- Dextrana sulfato-PEG

La separación de fases dextrana-PEG en agua es la consecuencia de la desestabilización del sistema por la introducción de dos especies moleculares, una de las cuales presenta un carácter hidrofóbico netamente superior al otro. El polímero hidrofóbico (en este caso el PEG) impone una disminución de la entropía del agua alrededor de los grupos CH₂-CH₂, quedando el sistema soluble gracias a las funciones éter y alcohol.

La separación de fases comienza una vez que el nivel energético de moléculas de agua ligadas a la dextrana es superior al nivel energético de moléculas libres asociadas entre ellas. De esta manera, el comportamiento de los polímeros en solución puede caracterizarse por un diagrama de fases como el que se muestra en la Figura 9. Cabe señalar que en el caso específico

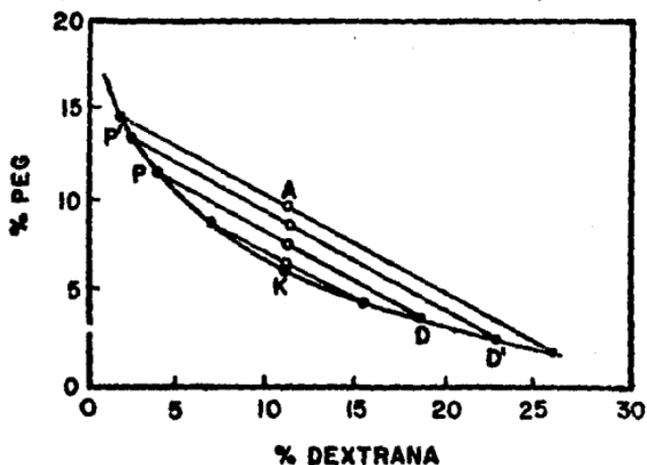


FIGURA 9. DIAGRAMA DE FASES.

Las líneas PD o P'D' representan la composición de las dos fases en equilibrio.

Los puntos D y D' representan la composición de la fase rica en PEG.

El punto A, representa la composición total del sistema. K es el punto crítico.

Fuente: *Prat. D.* (33)

de la dextranosa, esta es obtenida en la fase rica en dextrana ya que se encuentra ligada a las cadenas del polímero.

Una vez que las macromoléculas, los orgánulos y las células están presentes en el sistema, estas se separan conforme a su afinidad por una u otra de las fases del sistema, lo que se puede caracterizar por el coeficiente de partición

$$K = \frac{\text{concentración en la fase superior}}{\text{concentración en la fase inferior}}$$

El valor de K depende de un gran número de factores ligados al sistema utilizado (presencia de sales, temperatura, etc.), pero sobre todo a la naturaleza de las partículas (peso molecular, carga eléctrica, grupos funcionales, etc.).

Así, Gerson (19) y Gerson y Akit (20) pusieron en evidencia que el coeficiente de partición depende de la naturaleza de las partículas, del número de cargas y de los grupos hidrofóbicos presentes sobre la superficie de las partículas.

La fraccionación por separación de fases es una técnica que recurre a una propiedad nueva referente a la superficie de las partículas.

La fraccionación por separación de fases se caracteriza también por la posibilidad de tratar grandes volúmenes ya que el coeficiente de partición permanece constante para un amplio intervalo de volúmenes (21). Así, contrariamente a las técnicas largas y costosas tales como la electroforesis, la cromatografía, la centrifugación su utilización es factible tanto en el laboratorio como a escala industrial (22).

II. 4 BORATOS

Los oxianiones son un conjunto de compuestos que se derivan de una amplia gama de elementos entre los más usuales se pueden citar a los boratos, germanatos, arseniatos, molibdatos, wolframatos y estanatos. Se conoce que los oxianiones tienen la propiedad de formar complejos con varios compuestos a pH y temperaturas específicas.

Una de las aplicaciones más importantes de los oxianiones es su utilización en el desplazamiento de equilibrios enzimáticos, cuando alguno de los productos se pueden acomplejar con los oxianiones.

Los oxianiones pueden así, atrapar al producto y provocar que la posición del equilibrio sea modificado favorablemente. En la mayoría de los casos la formación del complejo es reversible,

de tal suerte que, tanto el producto como el oxianión, pueden ser recuperados después de efectuar un cambio en el pH.

De los oxianiones, los que han sido utilizados más ampliamente son los boratos, por la habilidad que presentan algunas de estas especies para acomplejarse adecuadamente con un gran número de compuestos naturales, a intervalos de pH fisiológicos (23). Entre estos se pueden citar a los alcoholes polihídricos, aldosas, cetosas, nucleosidos, nucleótidos, incluyendo algunas coenzimas como la NAD⁺ (dinucleótido de adenina), formas enol de ciertos ácidos (por ejemplo ácido fenilpiróvico), hidroxiaácidos (por ejemplo salicílico), catecolaminas (por ejemplo adrenalina) y compuestos con estructuras más complejas entre los cuales se puede mencionar a la aldosterona.

Böeseken en 1949 (24) realizó las primeras investigaciones sobre la interacción de carbohidratos y ácido bórico a través del estudio de su conductividad en agua. El incremento en la conductividad se usó para estimar el grado de formación de complejos cíclicos que involucran pares de grupos adyacentes. Este autor encontró que había una mayor formación de complejos con las formas cetosas que con las aldosas, debido, aparentemente, a que hay mayor acumulación de grupos hidroxilo en la vecindad del átomo de carbón reductor.

Asimismo, las configuraciones de anillos de cinco miembros (furanosas) con dos grupos hidroxilos adyacentes en posición cis son favorables para la formación del complejo con los boratos.

Bösesken (24), reportó que el ácido bórico no forma complejos con los disacáridos lactosa y maltosa a pesar de que ambos contienen glucosa en su molécula. Esta falta de capacidad se explicó por el enlace involucrado con el carbono cuatro.

La sacarosa no interacciona de manera importante con el ácido bórico ya que ni su configuración, ni las distancias involucradas entre los hidroxilos son favorables para la complejación.

El 1957, Foster (25) reportó que la reacción de compuestos polihídricos con iones borato sigue el equilibrio esquematizado en la Figura 10:

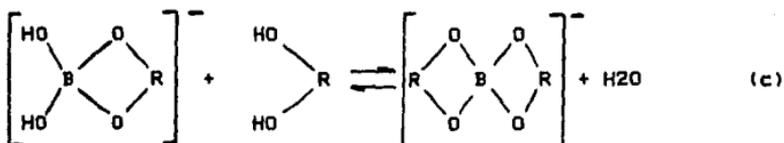
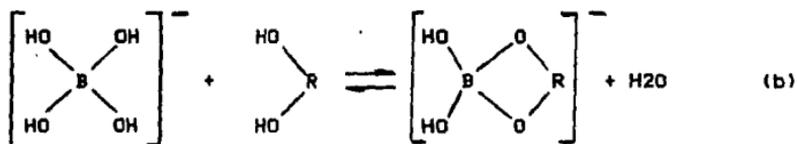
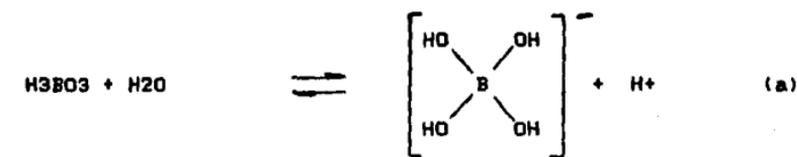


Figura 10. Equilibrio Químico de los Complejos de Carbohidrato-Borato.

Foster (25) estableció que el equilibrio de las reacciones (a), (b) y (c), era dinámico y que todas las moléculas del carbohidrato $\text{R}(\text{OH})_2$ podían asociarse con una carga negativa. La magnitud de esta carga era determinada por la posición del equilibrio de las reacciones (a), (b) y (c) el cual era influenciado por la disposición estereoquímica de los grupos hidroxilo en $\text{R}(\text{OH})_2$.

A través del estudio electroforético Foster (25) definió que

las máximas movilidades de los complejos borato-carbohidratos se encontraban en la región de pH de 9-10 generalmente, y que las movilidades relativas de ciertos carbohidratos dependían críticamente del pH. Así, la D-glucosa a pH 9-10 presentaba mayor movilidad que la D-fructosa, mientras que a pH 7-8 la relación se invertía, como se ilustra en la Figura 11.

En 1963 Weigel (26), hizo referencia a las especies iónicas que presentan los boratos con compuestos polihidroxi, como se muestra en la Figura 12.

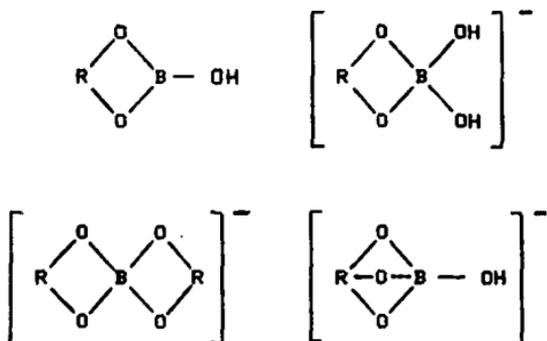
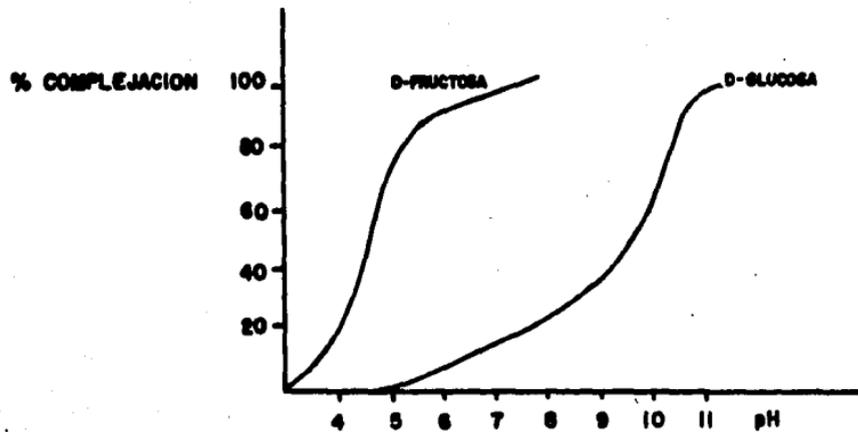


Figura 12. Complejos Borato con Compuestos Polihidroxi.

Weigel (26), propuso que los iones borato formaban complejos con los compuestos polihidroxi cuando los grupos hidroxilo eran separados por una distancia aproximada de 2.4 Å. Esta distancia



**FIGURA II. FORMACION DE COMPLEJOS CON BORATOS EN
FUNCION DEL pH.**

Fuente: Barker, et. al. (23)

complejos fuertes y estables con compuestos polihidroxilos lineales. Un requisito para que los boratos formaran complejos fuertes era que los grupos cis-hidroxilos fuesen coplanares. Davis et al. encontraron que las formas planares de D-glucofuranosa y de la aldehído D-glucosa eran capaces de formar complejos fuertes.

A través de estudios de rayos X sobre minerales de boro, se ha demostrado que el ión borato tiene una simetría tetrahédrica. Esto significa que el ácido bórico no actúa como donador de protones sino como un ácido de Lewis, aceptando el par de electrones de la base (por ejemplo OH-) para formar el anión tetrahédrico $B(OH)_4^-$.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1 FERMENTACION Y OBTENCION DE LA DEXTRANSACARASA

Para la obtención de la dextransacarasa, se llevó a cabo una fermentación utilizando una cepa productora de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B 512 F. Con base en los trabajos de López y Monsan (16), se seleccionó el medio de cultivo optimizado, utilizando materias primas totalmente disponibles en el país. Las condiciones de fermentación fueron seleccionadas considerando los trabajos previos de Martínez (28), donde se establecieron las condiciones óptimas para el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-512 F. Asimismo, se consideraron las modificaciones sugeridas por Prat (29) para la alimentación continua de una mezcla sacarosa-NaOH, que regula de manera simultánea el suministro del azúcar y el pH, que como se señaló con anterioridad, desciende conforme se consume la sacarosa.

En la Tabla III se presenta la composición del medio de cultivo utilizado tanto en la preparación de inóculos como en las fermentaciones.

Propagación

La propagación se llevó a cabo en volúmenes correspondientes

TABLA III

COMPOSICION DEL MEDIO DE FERMENTACION

Sacarosa	10.0 g/l
Extracto de Levadura	20.0 g/l
Sales:	
Sulfato de Magnesio	0.2 g/l
Sulfato de Manganeso	0.01 g/l
Cloruro de Calcio	0.02 g/l
Sulfato Ferroso	0.01 g/l
Fosfato Dibásico de Potasio	20.0 g/l

Para los inóculos la sacarosa fue de 20.0 g/l.

El cloruro de sodio normalmente se incluye en la formulación a una concentración de 0.01 g/l. Sin embargo, no se adicionó debido a que el extracto de levadura usado lo contiene en cantidades apreciables.

al 10% del volumen total de fermentación. El medio se mantuvo a 27 C con agitación en un incubador New Brunswick Sci. (Edison, N.J., U.S.A.), por 12 hs antes de iniciar la fermentación. La cepa liofilizada se suspendió en la solución del medio estéril.

Ermentación

Se realizaron fermentaciones de 5 l en un fermentador de Lh Fermentation 2000, Series I. Para ello, se utilizó un inóculo de 300 ml para un volumen total de 3 l de medio de cultivo. La fermentación fue retroalimentada, es decir, se mantuvo durante el periodo de fermentación una concentración constante de sacarosa a través de la alimentación de una mezcla sacarosa-NaOH (400 g/l sacarosa en solución de NaOH a 40 g/l) para ajustar el pH.

El crecimiento bacteriano se midió por turbimetría en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Hitachi 200, Wellesley, M.A. a 650 nm. Para este propósito, se utilizaron muestras diluidas: 1/10 del medio de fermentación.

Las fermentaciones se consideraron terminadas al repetirse dos lecturas de densidad óptica a 650 nm. Posteriormente, se ajustó el pH a 5.2. con la finalidad de convertir la sacarosa remanente en dextrana. Como se mencionó con anterioridad, la presencia de este polisacárido es necesaria para realizar la

purificación de la enzima.

Centrifugación

El medio de cultivo obtenido en las fermentaciones fue centrifugado a 6000 rpm durante 30 min a temperatura de refrigeración en una Centrifuga Refrigerada Modelo DPR 6000. Al sobrenadante obtenido se le midió el volumen y la actividad de la dextranasa, como se menciona en el inciso III.1.2.

III.1.1 PURIFICACION

El sobrenadante obtenido después de la operación de centrifugación, se purificó a través de una extracción líquido-líquido, utilizando PEG 1500 (polietilenglicol). En la Figura 13 se ilustran las etapas involucradas en esta fase.

La purificación de la enzima del sobrenadante se realizó por adición de una solución al 50% de PEG 1500. La dosificación se efectuó lentamente con agitación constante, hasta alcanzar una concentración final aproximada de 200 g/l de PEG en el volumen total con lo cual se logró la separación de fases. La fase rica en dextrana (asociada a la enzima) se disolvió en una solución amortiguadora de acetato de sodio (pH 5.2, 20 mM) con 0.05 g/l de

MEDIO OBTENIDO DE LA FERMENTACION



CENTRIFUGACION

(3500 rpm, 30 min, 4 C)



SOBRENADANTE

**ADICION DE SOLUCION
DE PEG, 50 % (w/v).**

**AGITACION
CONSTANTE**



SEPARACION DE FASES

**La enzima se obtiene de la fase inferior,
rica en dextrana.**

**FIGURA 13. ETAPAS INVOLUCRADAS EN LA EXTRACCION
LIQUIDO - LIQUIDO.**

CaCl₂ para mantener la estabilidad de la enzima. Con el objeto de obtener una preparación enzimática de mayor pureza esta fue reprecipitada en las mismas condiciones. La preparación de dextranasa obtenida se mantuvo a temperatura de congelación hasta su utilización.

III.1.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La determinación de actividad de la dextranasa se realizó a través de la cuantificación de la fructosa liberada cuando la enzima hidroliza a la sacarosa para sintetizar a la dextrana. La velocidad inicial es proporcional a la cantidad de fructosa liberada. El poder reductor de la fructosa puede detectarse con el método del DNS (3,5 ácido dinitrosalicílico) (30).

La determinación se efectuó en una celda de vidrio de doble pared de 25 ml de capacidad. La temperatura se mantuvo constante a 29 C. El volumen final de reacción fue siempre de 12 ml. La mezcla de reacción se detalla a continuación:

- n ml de enzima
- 0.24 ml de solución reguladora de acetato de sodio pH 5.2, 1 M.
- 2 ml de sacarosa al 60% (para una concentración final del 10%).
- c.b.p. 12 ml de agua desionizada.

Al efectuar la determinación de actividad en presencia de iones boratos se adicionó la cantidad adecuada de la solución de tetraborato de sodio 0.23 M a pH 5.2. Las concentraciones de tetraborato de sodio empleadas durante la experimentación fueron: 0.017, 0.034, 0.0567, 0.085, 0.115 M (29).

Las muestras de 1 ml de la mezcla de reacción se tomaron a intervalos de tiempos específicos y la reacción enzimática se detuvo poniendo en contacto la muestra con 1 ml del reactivo DNS. Las muestras se homogeneizaban y se sometían a temperatura de ebullición exactamente por 5 min. Posteriormente, la reacción con DNS se detenía por inmersión en un baño de hielo. Finalmente, las muestras se diluían con 10 ml de agua y después de un periodo de reposo no mayor de 15 min se efectuaba la lectura a 540 nm. Para realizar la medición se construyó una curva estándar con fructosa (0-2 g/l).

La actividad enzimática se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{USD/ml} = \frac{M (1.9) (60) (12)}{n}$$

donde: M = pendiente (g/fructosa/tiempo)

1.9 = factor estequiométrico de conversión

= PM sacarosa/PM fructosa

60 = conversión de minutos a hora

n = ml de solución enzimática

III.1.3 PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Con el objeto de establecer la vida media de las preparaciones enzimáticas concentradas se monitoreó la actividad a tres diferentes temperaturas: ambiente, de refrigeración 5 ± 1 C y de congelación.

La preparación enzimática de experimentación fue obtenida después de la operación de purificación con PEG. La preparación fue suspendida en una solución reguladora de acetato de sodio 20 mM, pH 5.2 y en presencia de iones calcio (0.05 g/l de CaCl_2). La determinación de actividad se realizó conforme se describe en el inciso III.1.2.

III.2 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

Para determinar si existía alguna interacción de los iones borato con las técnicas analíticas empleadas se evaluó el efecto de los boratos en la determinación de azúcares reductores por el método de DNS (30).

Para este fin se evaluaron soluciones de fructosa de 1 g/l en presencia de concentraciones crecientes de iones borato (0.017, 0.034, 0.0567, 0.085 y 0.115 M de tetraborato de sodio).

III.3 EFECTO DE LOS BORATOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DEL pH

Con la finalidad de conocer el efecto de los iones borato sobre la actividad de la enzima en función del pH, se determinó la curva de actividad contra pH. Para realizar esta determinación se trabajó con una preparación enzimática que contenía 35 USD/ml, y una concentración de boratos de 0.056 M Na₂B₄O₇. En estas condiciones se determinó la actividad de la dextranasa a diferentes valores de pH que caían en el intervalo de 2 a 9. Paralelamente se evaluó la actividad en ausencia del oxianión.

III.4 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA CINÉTICA DE LA DEXTRANSACARASA

Para obtener los parámetros cinéticos de la enzima dextranasa en ausencia de iones boratos se determinaron las velocidades iniciales de reacción a diferentes concentraciones de sustrato. Las concentraciones de sacarosa experimentales seleccionadas fueron (5, 10, 50 y 100 g/l), con base en el trabajo de Martínez (28). Asimismo se trabajó con tres diferentes concentraciones de enzima: 15, 50, 100 UDS/ml. Las determinaciones se llevaron a cabo por cuadruplicado.

Para tratar de establecer el efecto de los boratos sobre la actividad de la enzima, se trabajó con las siguientes concentraciones de boratos: 0.017, 0.034, 0.0567, 0.085 y 0.115 M Na₂B₄O₇. Estas concentraciones fueron seleccionadas con base en los estudios efectuados por Prat (29). Las concentraciones de sustrato, así como las de enzima, fueron las mismas que las del estudio cinético libre de boratos.

Para efectuar el estudio cinético de la enzima se puso en contacto la cantidad adecuada de enzima con el sustrato, controlando la temperatura a 29 C (a través de un sensor de temperatura Lh Fermentations Serie 2000) y manteniendo homogénea la mezcla de reacción con una plancha de agitación Mag-Mix, Precision Scientific. Cuando la síntesis se realizó en presencia de iones boratos se controló el pH con NaOH 3N (control automático de pH Lh Fermentation Serie 2000), ya que en este caso conforme transcurre la síntesis se generan protones, como se mencionó anteriormente. Para mantener la homogeneidad durante la síntesis, se aumentó gradualmente la velocidad de agitación.

La conversión de sacarosa a dextrana se cuantificó en el transcurso de la reacción a través de la determinación de fructosa, como se detalla en la metodología para calcular la actividad enzimática.

Para analizar los resultados obtenidos se elaboró un programa de computación para estimar los parámetros de los modelos clásicos de cinética enzimática. En este programa se considera, mediante la ponderación de los resultados experimentales dada por un factor de ponderación V_i^4 / σ_i^2 (31), que el error en la medición de la velocidad se incrementa al reducir la concentración de sustrato. Para efectuar la ponderación se recomienda un mínimo de 4 determinaciones por punto. El listado del programa de computación se presenta en el Apéndice.

III.5 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA REACCION DE ACEPTOR

III.5.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Con el fin de evaluar el efecto de los boratos en la reacción de aceptor de la fructosa y analizar si la producción de leucrosa se vea efectivamente disminuida, se efectuaron determinaciones de cromatografía en capa fina.

Las muestras fueron tomadas durante la síntesis a intervalos de tiempo de 1 hr. 1 ml de muestra fue tratada con 1 ml de alcohol al 96% (reactivo analítico J.T. Baker, Baker Chemical Co.) con el objeto de precipitar tanto a la enzima como las dextranas presentes. 10 ul del sobrenadante, se aplicaron a la

cromatoplaça de sílica gel 60 (E. Merck Darmstadt, Germany) previamente activada 110 C durante 30 min. El sistema eluyente empleado fue una mezcla de butanol/acetona/agua (4:5:1), reactivos J.T. Baker (Baker Chemical Co.). Una vez desarrollada, la cromatoplaça se secaba y asperjaba con una solución de H₂SO₄ al 30% para, finalmente someterla a calentamiento en una estufa (MAPSA, Mod. HAP-645) por 15 min a una temperatura de 70 C con el objeto de revelarla.

III.5.2 CROMATOGRAFIA EN LIQUIDO DE ALTA PRESION

Con el fin de cuantificar los azúcares involucrados durante la síntesis enzimática sacarosa, fructosa, leucrosa e isomaltulosa mediante un método más preciso y rápido se aplicó una técnica de cromatografía líquida de alta presión en fase inversa. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de líquidos Beckman (Mod. 332, Gradient Liquid Chromatograph Beckman Instruments Inc.). Para esta determinación se consideraron los informes de Oriol (32) para la identificación de azúcares a través de un análisis en fase inversa. Se utilizó una columna ultrasphere-ODS (10 mm x 25 cm) con agua como sistema eluyente y un detector de índice de refracción con una celda de 8 ul (Altex Mod. 153, Beckman Instruments Inc.). El flujo, el volumen de inyección, la sensibilidad en el detector, la atenuación del registrador y la velocidad del papel se detallan en los

cromatogramas del capítulo de resultados.

Las muestras se trataron con alcohol etílico 96 % (reactivo analítico, J.T. Baker, Baker Chemical Co.), con la finalidad de precipitar la dextranas. El sobrenadante se filtró en filtros miltex-HV, 045 u ml (Millipore Co., Bedford, MA) para asegurar la purificación de la muestra antes de la inyección.

IV. RESULTADOS

IV.1 FERMENTACION Y OBTENCION DE LA DEXTRANSACARASA

En este trabajo se realizaron fermentaciones con un volumen final de 3.3 litros. Se utilizaron inóculos de 300 ml crecidos 12 horas antes de la fermentación.

Las fermentaciones se caracterizaron a partir del crecimiento de la bacteria y de la actividad enzimática final, alcanzada en el sobrenadante de la fermentación. En la Figura 14 se ejemplifica el crecimiento de células en función del tiempo para uno de los procesos efectuados.

El crecimiento microbiológico obedece un modelo de primer orden con respecto a la concentración de células:

$$dx/dt = u x$$

donde u es la velocidad específica de crecimiento.

Cabe señalar que esta velocidad es función de la concentración de la fuente de carbono, que es el sustrato limitante de acuerdo al modelo de Monod:

$$u = u_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

CRECIMIENTO DE LEUCONOSTOC MESENEROIDES DURANTE LA FERMENTACION

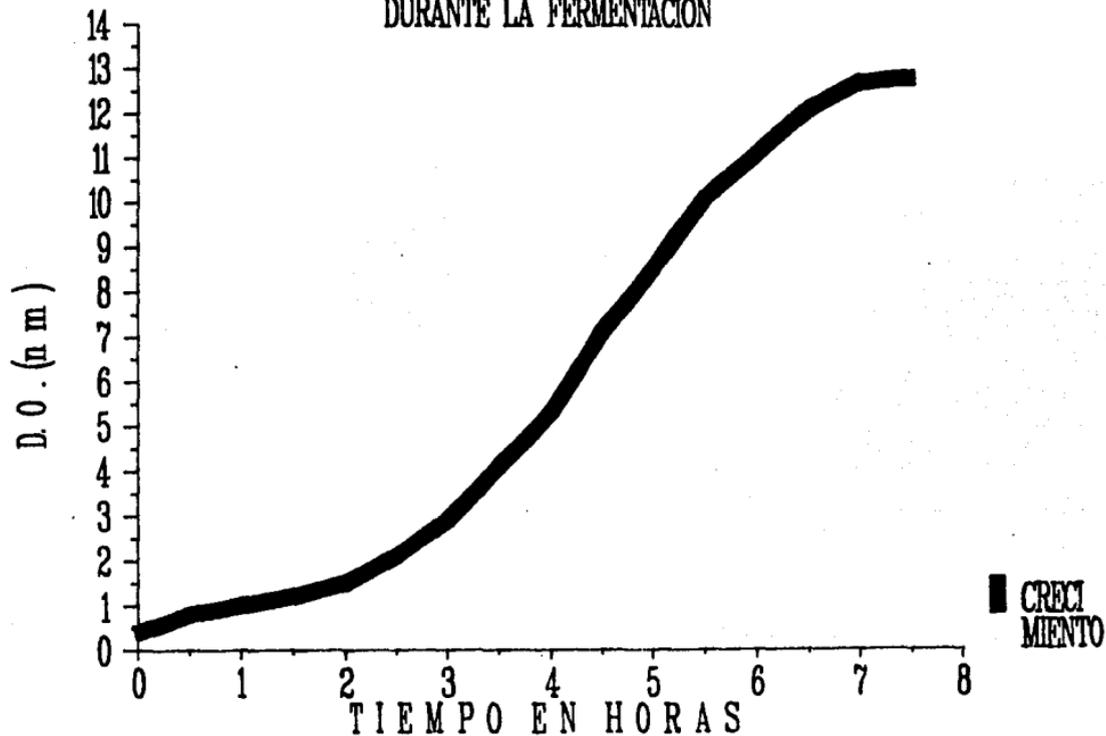


FIGURA 14

En la Figura 15 se representa el modelo de crecimiento de primer orden para los datos experimentales. De dicha gráfica se desprende un valor de velocidad específica de crecimiento de 0.48 hr⁻¹. Cabe señalar que cuando se efectúa un proceso de fermentación intermitente, el valor reportado para este parámetro es de 0.8 hr⁻¹, lo que permite concluir que en la fermentación retroalimentada el crecimiento resulta más lento.

Esta situación es fácil de explicar si se considera el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento con respecto a la concentración de sustrato limitante. En efecto, al ser este comportamiento de tipo Michaeliano, en la fermentación intermitente, caracterizada por una alta concentración inicial de sustrato la velocidad es máxima desde el inicio y se mantiene así hasta el final del proceso, donde la concentración cae hasta llegar a cero. Por otra parte, en la fermentación retroalimentada, la concentración de sustrato se mantiene artificialmente baja para evitar el fenómeno de represión catabólica y sobreproducir la enzima, ocasionando una baja velocidad específica de crecimiento.

Una vez concluido el proceso de fermentación se centrifugó el medio de cultivo para obtener un sobrenadante libre de células. Con este sobrenadante se efectuó la determinación de actividad de la enzima, obteniéndose 130 USD/ml para la primera

CRECIMIENTO Ln X CONTRA TIEMPO

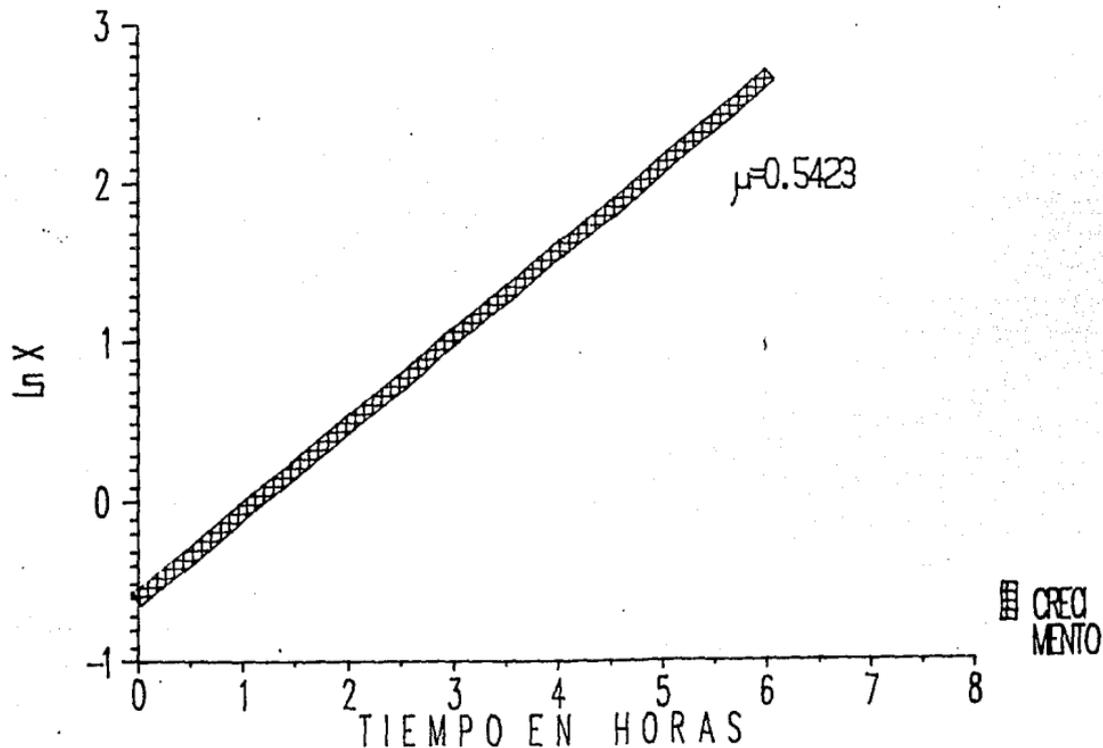


FIGURA 15

fermentación con un volumen total de sobrenadante de 3.3 l y 74 UDS/ml para la segunda con un volumen total de 3.4 litros.

IV.1.1 PURIFICACION

Para efectuar la purificación con PEG (polietilenglicol 1500) se ajustó la concentración de dextranas en el sobrenadante, medida como azúcares totales, a 20 g/l. Es importante subrayar que este contenido óptimo se seleccionó con base en las pruebas de extracción con polietilenglicol (PEG) efectuadas por Prat (33). Por otra parte, 20 g/l de dextranas resultan en un sobrenadante poco viscoso y fácil de manipular para efectuar la operación de purificación a través de la extracción líquido-líquido con PEG. Ambos polímeros intervienen para alcanzar la separación de fases. En este proceso la enzima se separa por estar asociada a cadenas de dextrana.

En estos experimentos, para lograr que el contenido de dextranas fuera el adecuado, se ajustó el pH a un valor de 5.2 durante los últimos 30 min de la fermentación, para que la enzima actuara sobre la sacarosa residual del medio. Este efecto prácticamente no se observa durante la fermentación por estar regulado el pH a 6.8, valor óptimo para el crecimiento de la bacteria.

Cabe señalar, que para ambas fermentaciones fue necesario adicionar sacarosa al medio centrifugado, ya que la cantidad de dextranas obtenidas estuvo por debajo del recomendado.

Para establecer las cantidades necesarias de PEG y de dextranas y lograr una separación con una fase rica en dextrana es necesario construir un diagrama de fases. En este diagrama se representa la concentración de un polímero en función de la concentración de otro, incluyendo tanto la zona de miscibilidad como la zona de formación de dos fases. En la Figura 9 mediante líneas de equilibrio, se muestra la composición de las dos fases obtenidas y las composiciones de cada polímero en cada una de las fases.

En este trabajo se adicionó a los sobrenadantes, que contenían 20 g/l de dextranas aproximadamente, una cantidad de PEG 1500, de tal forma que se alcanzará una concentración final de 20% (w/v). Las separaciones obtenidas tuvieron rendimientos de purificación de 90% aproximadamente.

Los resultados de esta etapa, para las 2 fermentaciones realizadas, se muestran en la Tabla IV.

TABLA IV.

	Sobrena- dante de fermenta- ción (Litros)	Activi- dad so- brena- dante (USD/ml)	Activi- vidad total (USD)	Fase pu- rifica- da (ml)	Activi- dad fa- se puri- ficada (USD/ml)	% Rendi- miento de puri- ficación
1a. Fer- mentación	3.3	130	429000	250	1530	89.2
2da. Fer- mentación	3.4	75	255000	4300	530	90.0

A partir de estos resultados se puede afirmar que el método de extracción líquido-líquido con PEG es adecuado debido a los buenos rendimientos de purificación obtenidos. Además, el PEG es un polímero inerte, ya que la separación se efectúa a través del desplazamiento de moléculas de agua que rodean al polisacárido por moléculas de PEG, logrando que las moléculas de dextrana se agrupen y separen del seno del líquido. Por otra parte, es importante señalar que el PEG es un material barato y disponible en México.

IV.1.2 PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Con base en los informes previos de Prat (33), donde se

reporta que preparaciones enzimáticas concentradas presentaban buena estabilidad a temperaturas superiores a las de refrigeración, en este trabajo se efectuaron pruebas de estabilidad de la solución enzimática concentrada (1530 USD/ml) a tres diferentes temperaturas de almacenamiento, 5 C en refrigeración, temperatura ambiente 20 C aproximadamente y temperatura de congelación. Cabe señalar que las preparaciones enzimáticas probadas en este trabajo fueron cinco veces más concentradas que las reportadas por Prat.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16 donde se puede observar que el 95% de la actividad enzimática de la enzima almacenada a temperatura ambiente se perdió en un periodo de 14 días. Por otro lado, la preparación almacenada en refrigeración, durante el mismo periodo de tiempo, mantuvo el 85% de actividad inicial. Asimismo, la enzima mantenida a temperatura de congelación, mantuvo el 100% de la actividad.

Con estos resultados se puede establecer que en preparaciones enzimáticas con alta actividad no se presenta un efecto protector importante dado por la dextrana como aparentemente ocurre en soluciones de menor actividad, donde se postula que la disminución en la disponibilidad de moléculas de agua ayuda a mantener una conformación proteínica estable (34), a temperaturas cercanas a la de refrigeración. Probablemente esto

ESTABILIDAD ENZIMA PURIFICADA

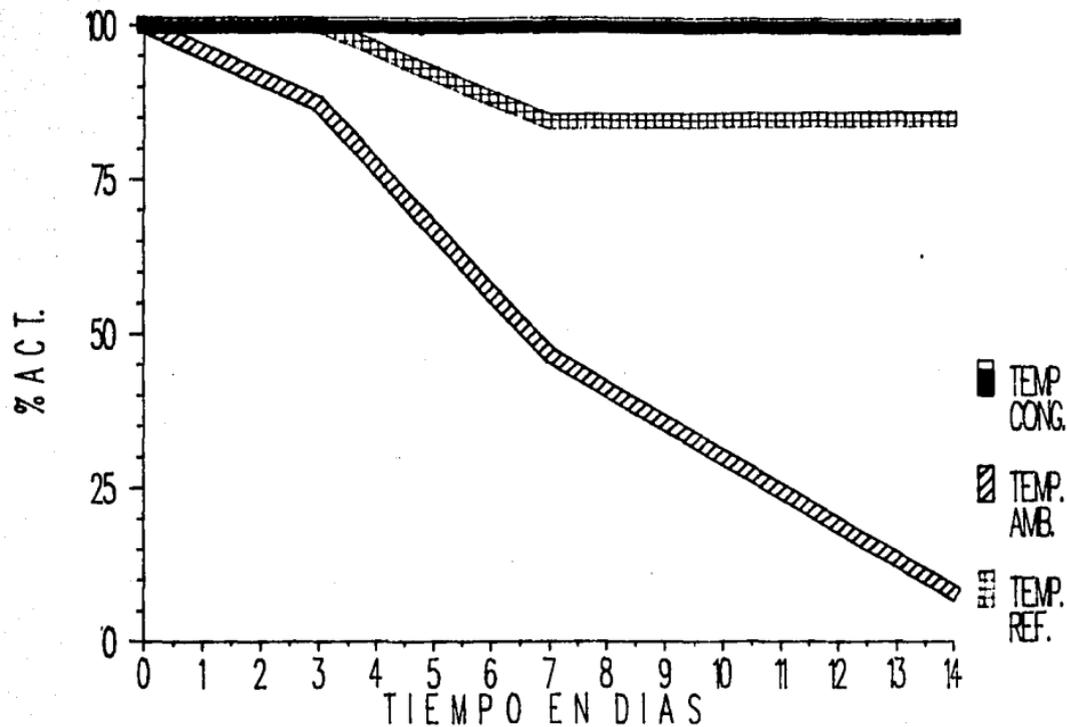


FIGURA 16

se debió a que la cantidad de dextrana en la preparación no fue suficiente.

IV.2 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

El primer aspecto a considerar en el empleo de los iones borato, utilizados para evitar la reacción de aceptor de la fructosa durante la síntesis de dextranas, fue establecer si las técnicas analíticas empleadas, reductores por DNS, son afectadas por estos iones.

Para este fin, se prepararon estándares de fructosa de 1 g/l en presencia de concentraciones crecientes de boratos. Los resultados se muestran en la Figura 17. De estos resultados se concluye que la medición de fructosa no se ve afectada cuando se emplean concentraciones abajo de 0.0057 M de boratos. Adicionalmente, el método probó ser válido a concentraciones inferiores de 1 g/l fructosa para una concentración de 0.0057 M de boratos.

Estos experimentos demostraron que la determinación analítica no se ve afectada a bajas concentraciones del monosacárido. Por lo tanto, se concluyó que, para la medición de reductores durante la síntesis, las muestras deben ser diluidas

EFFECTO DE LOS IONES BORATOS EN LA DETERMINACION DE FRUCTOSA POR DNS.

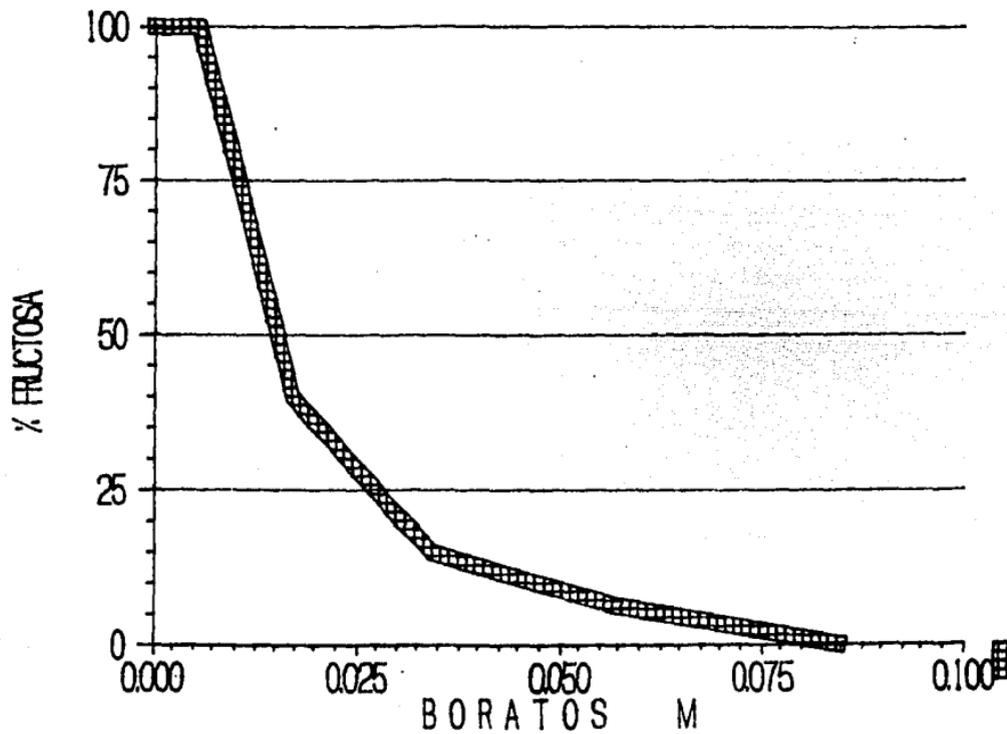


FIGURA 17

de forma tal que la concentración de boratos descienda por debajo de 0.0057 M.

IV.3 EFECTO DE LOS BORATOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN FUNCION DEL pH

Una vez evaluada la influencia de los boratos en la determinación de fructosa por DNS se procedió a efectuar un estudio de actividad de la dextranasa en función del pH y en presencia de los iones borato. La finalidad de este experimento fue corroborar si la curva de actividad contra pH no se vería modificada, presentando un máximo diferente al reportado para la enzima.

Los resultados se muestran en la Figura 18, donde se puede apreciar el comportamiento de la enzima en presencia de boratos comparada con la enzima control. Estas determinaciones fueron llevadas a cabo con 35 USD/ml.

Este estudio permitió confirmar que el pH óptimo de la actividad de la enzima no se modifica por la presencia de iones boratos pero permitió igualmente observar que en presencia de boratos, se presenta un decremento de la actividad. Sin embargo, hay que recordar que a este valor de pH 5.2, el 80% de la fructosa es acomplejada por los boratos por lo que resulta

EFFECTO DE LOS BORATOS SOBRE EL pH OPTIMO DE LA ENZIMA

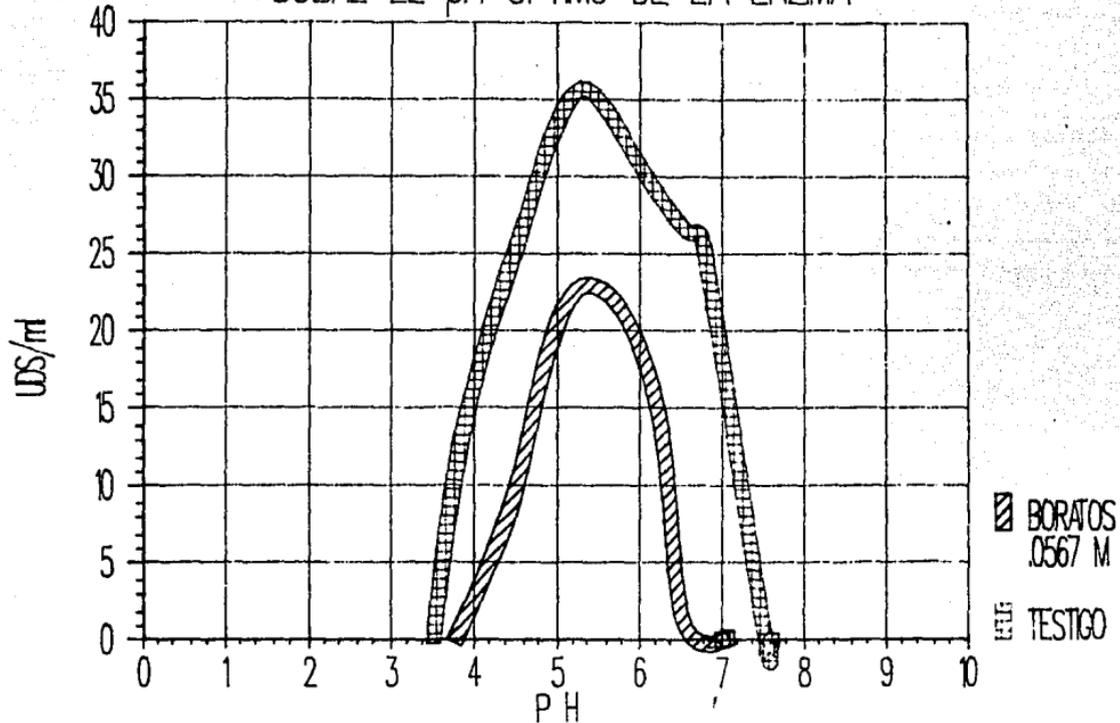


FIGURA 18

adecuado el uso de estos oxianiones en el estudio de la reacción del aceptor de la fructosa.

IV.4 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA CINÉTICA DE LA DEXTRANSACARASA

Enzimas sin Boratos

Una vez obtenida una preparación enzimática de alta actividad, se efectuaron determinaciones para la obtención de los parámetros cinéticos de la enzima sin inhibidor.

Las determinaciones se realizaron a tres diferentes concentraciones de enzima. Cabe señalar, que se trabajó con cuatro diferentes concentraciones de sustrato: 5, 10, 50 y 100 g/l de sacarosa. Estas concentraciones se seleccionaron con base en los resultados obtenidos por Martínez (28), donde se estableció que la dextranasa presenta inhibición por exceso de sustrato a concentraciones mayores a 100 g/l de sacarosa.

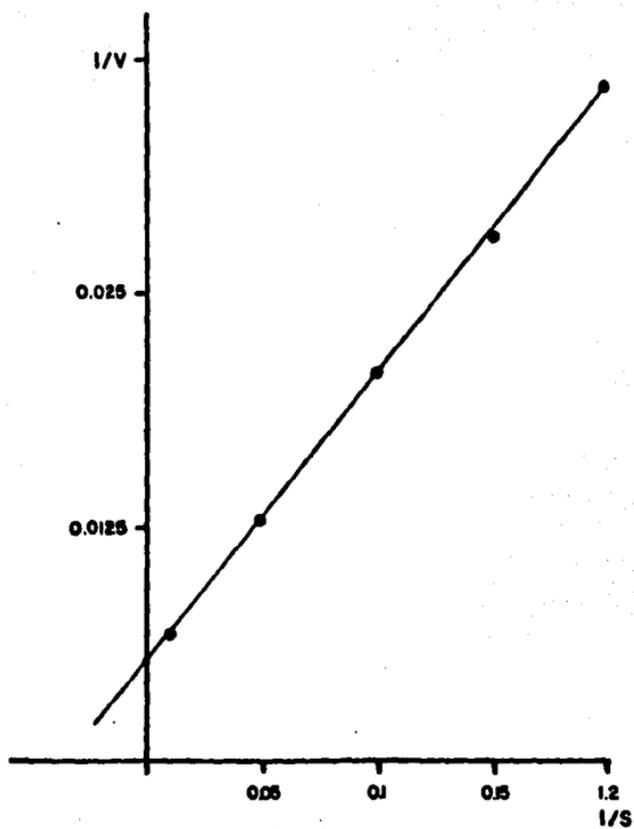
Es importante mencionar que para analizar los datos obtenidos se elaboró un programa de computación para estimar los parámetros de los modelos clásicos de cinética enzimática. En este programa se toma en cuenta a través de una ponderación de los resultados experimentales dada por un factor de ponderación V_i^4 / σ_i^2 (32), que el error en la medición de la velocidad se ve

incrementado al reducir la concentración de sustrato. Para llevar a cabo la ponderación, se recomienda un mínimo de cuatro determinaciones por punto.

El programa de computación desarrollado permite comparar los resultados con los obtenidos por la regresión lineal no ponderada.

Mediante el uso de esta herramienta, se estableció que la enzima obedece un modelo cinético de Michaelis-Menten, como se ilustra en la Figura 19. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martínez (28) y Prat (29), a las concentraciones de sustrato experimentales.

Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos presentan una dispersión considerable. Esto se debe a la relativa heterogeneidad de la preparación concentrada, a pesar de que se procuró tomar muestras bien mezcladas. Adicionalmente, es importante señalar, que en las preparaciones enzimáticas de dextranacarasa, esta se encuentra básicamente asociada a moléculas de dextrana. Esta asociación puede provocar que en soluciones de alta concentración, la enzima pueda agruparse por interacciones intramoleculares formando núcleos o matrices proteínicas, que muestren mayor actividad con respecto al seno de la solución.



$K_m = 30 \text{ g/l}$

$V_{max} = 196 \text{ UDS/ml}$

(Promedio de 6 determinaciones por punto)

FIGURA 19. Representación de Lineweaver-Burk

Para evitar este problema se tendría que trabajar con soluciones enzimáticas de menor actividad, como las probadas en los trabajos realizados por Prat (39). Sin embargo, en este trabajo se decidió trabajar con las soluciones de alta actividad, para evaluar si el comportamiento era similar.

Cuando se aplicaron las regresiones ponderada y no ponderada a estos resultados, los valores obtenidos para el K_m resultaron ser sensiblemente superiores a los reportados con anterioridad, como se puede observar en la Figura 20. Cabe señalar, que estos resultados se refieren a la solución de enzima de alta actividad (concentrado obtenido por extracción líquido-líquido).

Dado que ha sido plenamente demostrado que la reacción enzimática catalizada por la dextranasa (16, 28, 33) obedece un modelo de Michaelis-Menten en la etapa inicial de reacción, la única explicación a la dispersión en los datos experimentales es la señalada con anterioridad, ya que dichos experimentos fueron efectuados con más de ocho repeticiones.

Enzima con Boratos

Dado que los experimentos previos permitieron apreciar un efecto significativo de los iones borato en la eliminación de la reacción de aceptor de la fructosa durante la síntesis, se

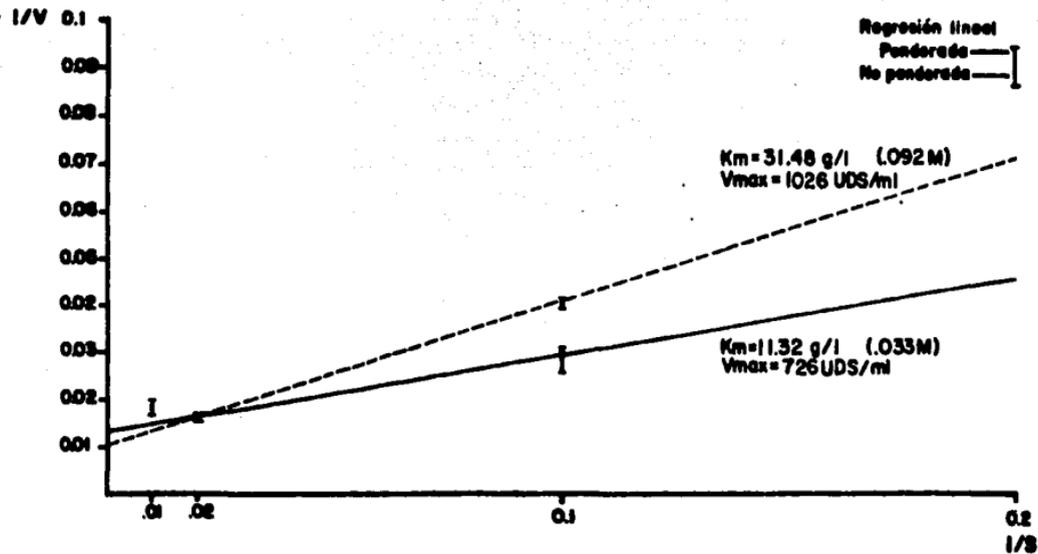


FIGURA 20. Representación de Lineweaver-Burk

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

analizó si la presencia de estos iones podía interferir o modificar la cinética de síntesis.

Tradicionalmente, el efecto de una sustancia inhibitoria sobre la actividad de una enzima se analiza observando el comportamiento a una concentración específica de inhibidor, de los inversos de velocidad a diferentes concentraciones de sustrato. Este comportamiento se compara con el que presenta la enzima sin inhibidor. De esta forma, se puede establecer si el comportamiento del inhibidor es de tipo competitivo, no competitivo, acompetitivo o mixto como se ilustra en la Figura 21.

Cuando se trabajó con concentraciones de borato de 0.017 M y 0.035 M se observó, al graficar a partir de la representación de Lineweaver-Burk, que la enzima presentaba una inhibición de tipo mixto como se muestra en la Figura 22. Este tipo de inhibición puede ser, representado por el mecanismo que se muestra en el esquema siguiente:

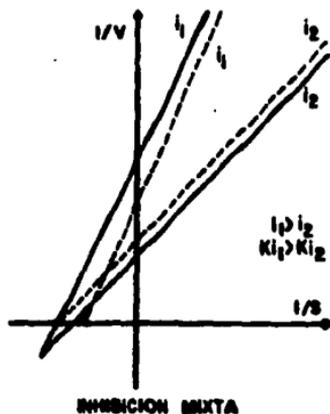
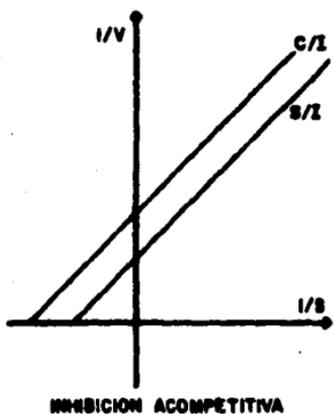
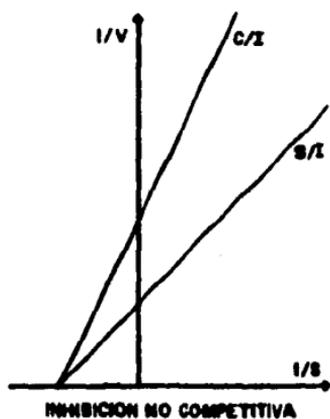
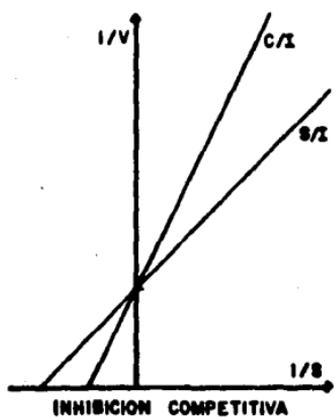


FIGURA 21. Modelos Típicos de Inhibición Enzimática

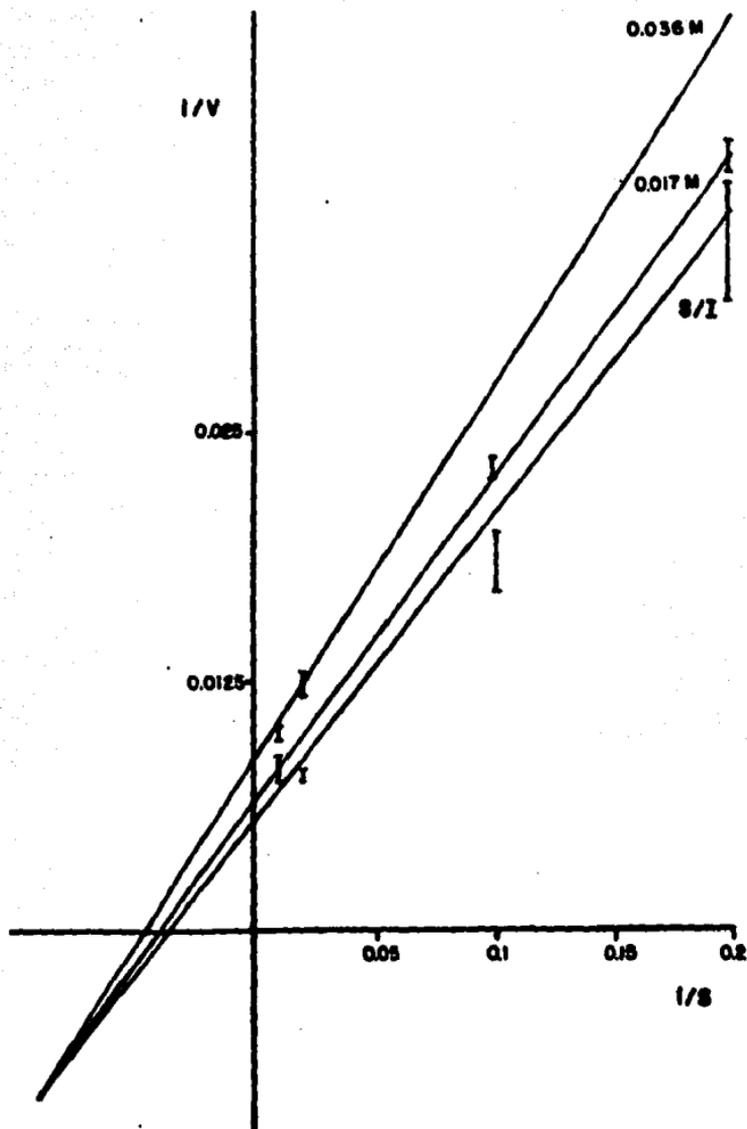
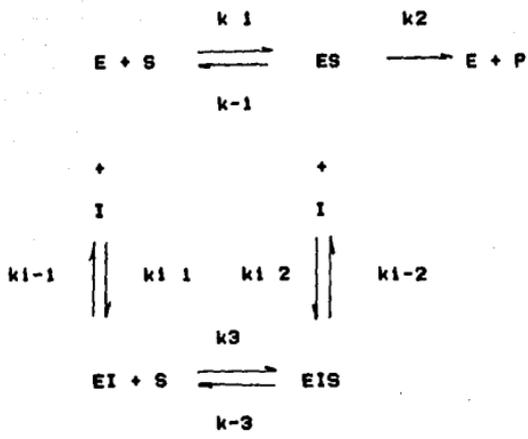


FIGURA 22. Inhibición de Tipo Mixta.
 Representación de Lineweaver - Burk.



El mecanismo propuesto da lugar a la siguiente expresión matemática:

$$v = \frac{V_{max} S}{K_m \left(1 + \frac{I}{k_{i1}}\right) + \left(1 + \frac{I}{k_{i2}}\right) S}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{I}{k_{i1}}\right) \frac{1}{S} + \left(1 + \frac{I}{k_{i2}}\right) \frac{1}{V_{max}}$$

Al aplicar este modelo se obtuvieron los siguientes valores para las constantes de inhibición:

$K_{i1} = 1.17 \text{ M}$

$K_{i2} = 0.055 \text{ M}$

tomando como base los valores de K_m de 30 g/l y $V_{max} = 195.15$ USD/ml que se obtuvieron de los experimentos realizados con la enzima sin inhibidor.

Cabe señalar, sin embargo, que al aumentar la concentración del inhibidor, el comportamiento se modifica y el tipo de inhibición que toma lugar resulta poco claro. Esta situación puede apreciarse en las representaciones gráficas de la velocidad contra la concentración del inhibidor, Figura 23, donde para una misma concentración de sustrato se observa una caída lineal de la actividad, a concentraciones crecientes de iones borato. Este comportamiento no es usual y difiere significativamente, de los que se obtienen con los modelos típicos de inhibición, que se pueden observar en la Figura 24. En dicha gráfica se ilustran los comportamientos de la inhibición competitiva, acompetitiva y mixta para una misma concentración de sustrato.

Los resultados aquí obtenidos concuerdan con los obtenidos por Prat (29), quien reporta que para bajas concentraciones de inhibidor, la enzima presenta una inhibición de tipo mixto. Sin embargo, se difiere con respecto a los valores reportados para las constantes. Como se observa en la Figura 25, Prat (29) también reporta una caída lineal de la velocidad en función de la

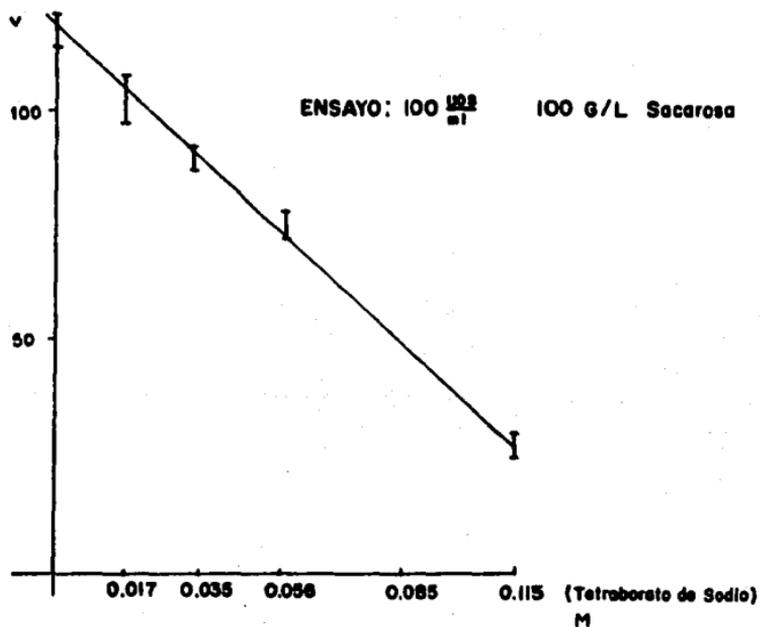


FIGURA 23. Efecto de los Boratos sobre la velocidad Inicial de reacción

COMPORTAMIENTO TIPICO DE INHIBICION

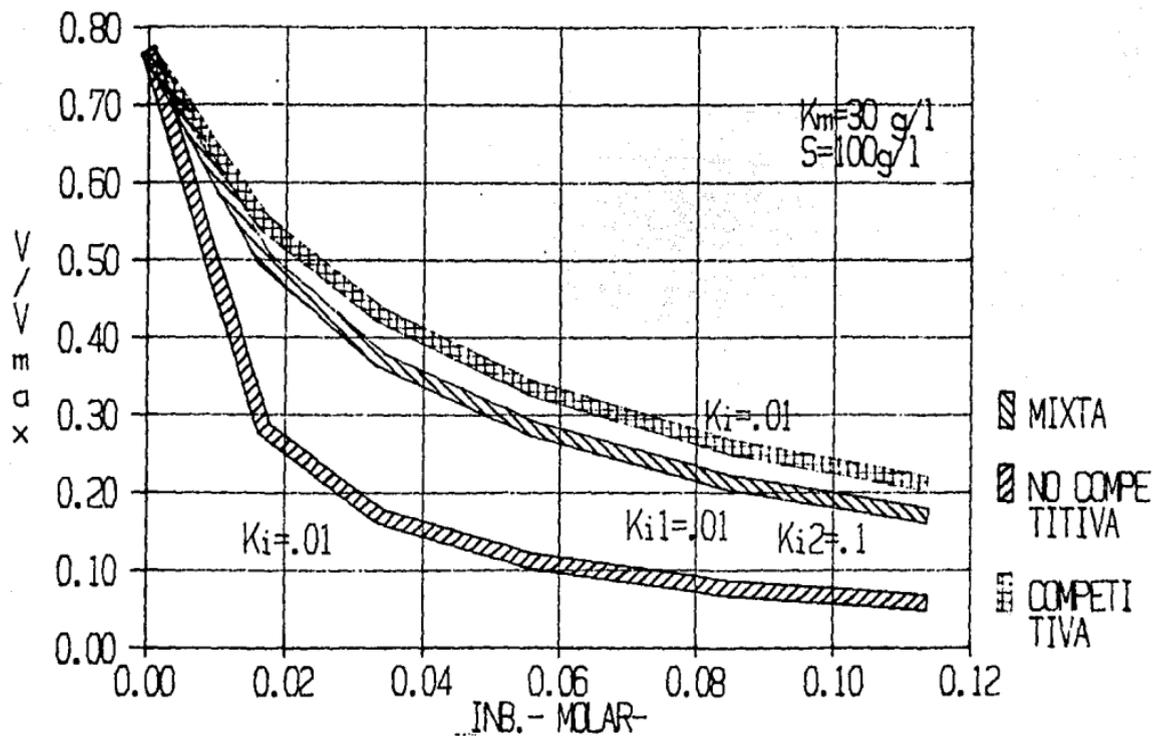


FIGURA 24

% ACTIVIDAD RESIDUAL EN FUNCION
DE LA CONCENTRACION DE BORATOS

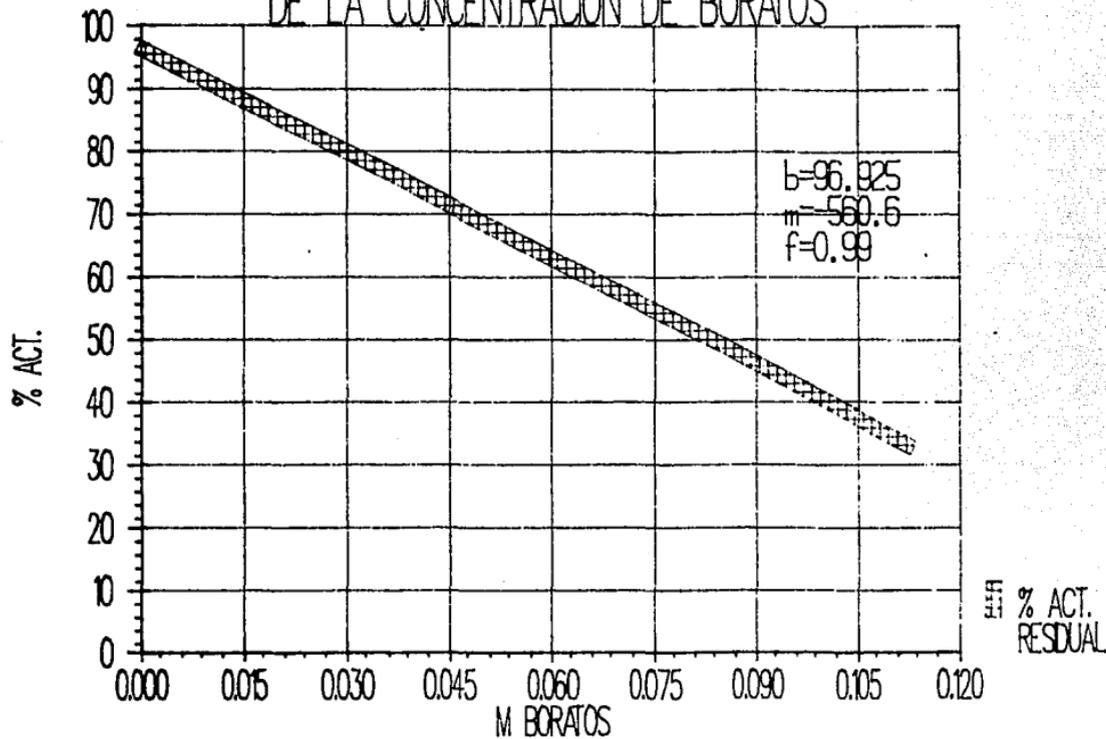


FIGURA 25

concentración de inhibidor.

Con los resultados obtenidos bajo el diseño experimental planteado, se presentó la dificultad de concluir con precisión sobre el comportamiento cinético de la enzima en presencia del inhibidor. Por otra parte, la dificultad adicional de obtener muestras homogéneas condujo a resultados con desviaciones significativas.

IV.5 EFECTO DE LOS BORATOS EN LA REACCION DE ACEPTOR

IV.5.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Con el objeto de evaluar el efecto de los boratos en la reacción de aceptor de la fructosa y analizar si la producción de leucrosa era efectivamente disminuida, se efectuaron determinaciones en cromatografía en capa fina. Para este propósito, se empleó el sistema de eluyentes reportado por Tsuchiya (34) para la identificación cualitativa de carbohidratos involucrados en la síntesis de dextranas, entre los que se incluye a la leucrosa.

Se efectuaron un total de cinco cromatografías en donde se aplicaron muestras tomadas a diferentes tiempos durante las síntesis control y síntesis con 0.085 y 0.11 M de boratos (15%

de sacarosa y 100 USD/ml). Cabe señalar que durante la síntesis, se tuvo un control constante del pH al valor óptimo para la enzima. Esta regulación fue importante, ya que, al actuar los boratos con la fructosa, se liberan protones lo que ocasiona una disminución del pH.

Las muestras fueron tratadas con alcohol al 96% para precipitar las dextranas previamente al análisis cromatográfico.

Al comparar las síntesis control con las efectuadas en presencia de los iones borato, los resultados pusieron de manifiesto un decremento considerable en las intensidades de las manchas correspondientes al disacárido leucrosa. Este decremento se acentuó conforme la concentración de boratos se incrementaba en las pruebas. En la Figura 26 se muestra una representación esquemática de una de las cromatoplaques corridas. Los valores de R_f reportados en la literatura para la leucrosa para este sistema de eluyentes fue consistente con los obtenidos en los experimentos realizados.

Asimismo, se estableció que la aparición de leucrosa es significativa entre la 2-3 hr de síntesis y que entre la 7 y 8 hr las síntesis terminan para ambas concentraciones de boratos. Esta evidencia se confirmó mediante los resultados obtenidos en la determinación de fructosa por DNS al realizar el seguimiento de la síntesis.

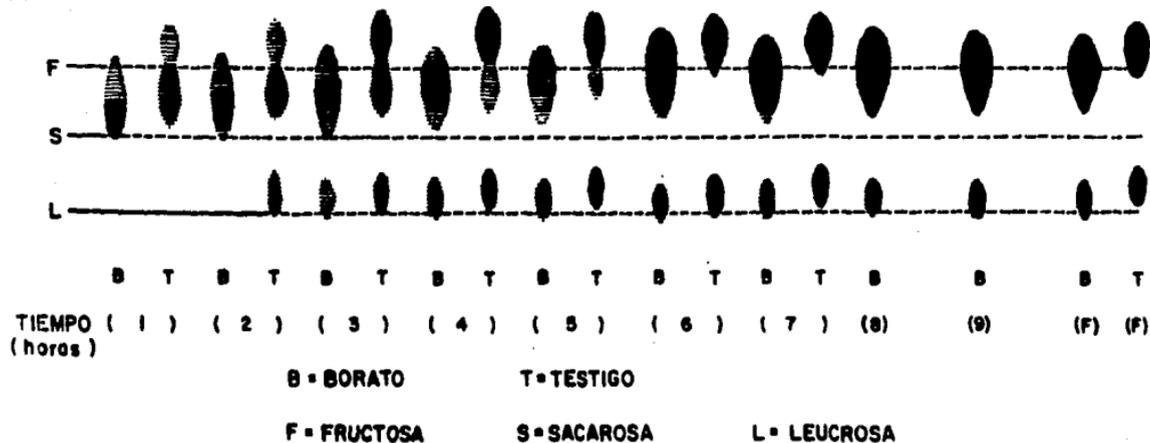


FIGURA 26. Representación de Cromatoplatea.

Evolución de Azúcares durante la Síntesis.

Testigo y en presencia de Boratos.

La información, por demás importante, que se obtuvo de los análisis efectuados por esta técnica, fue que aún a la máxima concentración de boratos trabajada se produjo leucrosa y que, por lo tanto, resultó imposible eliminar en su totalidad la reacción de aceptor que tiene lugar bajo las condiciones de síntesis probada. Cabe señalar, sin embargo, que estos resultados pusieron en evidencia que la reacción de aceptor se veía apreciablemente disminuida.

IV.5.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)

Una vez evaluado el efecto de los boratos en la reacción de aceptor por cromatografía en capa fina, se evaluaron cuantitativamente los azúcares de la síntesis por un método más preciso y rápido como el de HPLC.

Para esto se hizo una evaluación de las posibles metodologías y sistemas que se podían emplear para la separación e identificación de estos azúcares. Se consideraron los informes de Oriol (32) para la identificación de azúcares a través de un análisis en fase inversa (C18). Este sistema resultó el óptimo para el equipo utilizado, dando buenas separaciones y resultados reproducibles cuando fue probado con estándares.

Se consideró importante, antes de emplear la técnica de

HPLC, tener la seguridad de poder identificar precisa y completamente a los azúcares involucrados. El primer problema por resolver fue el no contar con los disacáridos leucrosa e isomaltulosa para utilizarlos como estándares. Por esta razón se empleó la técnica de capa fina en un sistema de eluyentes reportados por Tsuchiya (34) donde bajo el sistema de elución empleado se identifican los disacáridos mencionados. De esta manera, para obtener la identificación precisa de este azúcar por la técnica de HPLC, se corrieron cromatografías en capa fina aplicando muestras tomadas al finalizar la síntesis control. Después de identificar a la leucrosa se procedió al desprendimiento del soporte de sílica gel suspendiéndolo en 100 ul de agua. De esta disolución se inyectaron 20 ul al cromatógrafo. Los resultados mostraron dos picos con tiempos de retención de 14.5 y 15.3 min. De esto se pudo concluir que el pico con mayor área es el correspondiente a la leucrosa y el otro corresponde a la isomaltulosa. Estas afirmaciones tienen como base los informes de Robyt y Eklund (13), donde se pone de manifiesto que en la reacción de aceptor de la fructosa, los disacáridos leucrosa e isomaltulosa son siempre observados como subproductos. De estos, la leucrosa siempre se produce en mayor proporción.

Con esta evidencia se realizó en HPLC el seguimiento de las síntesis control, y síntesis con concentraciones de borato de

0.085 M y 0.115 M. Además, se efectuó caracterización de azúcares presentes con 0.017, 0.035 y 0.056 M de boratos al tiempo final de la reacción.

Las condiciones de síntesis fueron las que prevalecieron para la evaluación por capa fina: 15% de sacarosa, 100 UDS/ml, 29 C y pH 5.2. Las muestras para el análisis fueron tratadas con alcohol al 96% (dil. 1:1), para precipitar las dextranas y filtrarlas inmediatamente antes de la inyección al cromatógrafo.

Los resultados cromatográficos se pueden observar en las Figuras 27, 28 y 29, donde se ilustran los cromatogramas correspondientes a los tiempos finales de reacción.

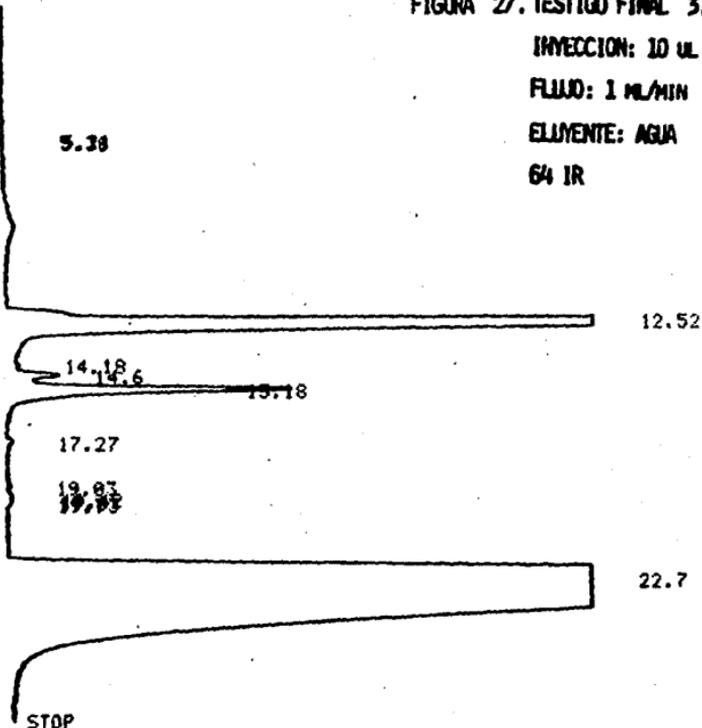
De estos resultados se puede afirmar que, efectivamente, los boratos ejercen un efecto sobre la fructosa, para evitar la reacción de aceptor. Se puede apreciar claramente que conforme se incrementa la concentración de boratos en la síntesis, la formación tanto de leucrosa como de isomaltulosa decrecen de manera significativa al final de la reacción.

En la Figura 30 se ilustra la caída del porcentaje de leucrosa y en la Figura 31 la caída del porcentaje de isomaltulosa. En estas figuras se puede observar que hay un descenso del contenido de leucrosa, en la síntesis con borato

LEVEL 118.6
 3.5HR
 LEVEL -61.6
 LEVEL 151.8
 LEVEL 123.4
 LEVEL 22.2
 START 06.30.17.51.

FIGURA 27. TESTIGO FINAL 3.5 HR

INYECCION: 10 UL
 FLUJO: 1 ML/MIN
 ELUYENTE: AGUA
 64 IR



C-RIB
 SMPL # 00
 FILE # 2
 REPT # 41
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		5.21	0.0091		26
0	FRUCTOSA	12.52	21.547		62207
0		14.18	0.0116		33
0	ISOMALTULOSA	4.6	0.4224	V	1219
0	OLEUCROSA	15.18	3.1434	V	9075
0		17.27	0.039		112
0		19.03	0.0091		26
0		19.42	0.0336	V	97
0		19.6	0.0179	V	51
0		19.73	0.0112	V	32
0		22.7	74.7551		215823
	TOTAL		99.9999		288707

LEVEL 79.8
 8HR
 START 06.26.21.03.

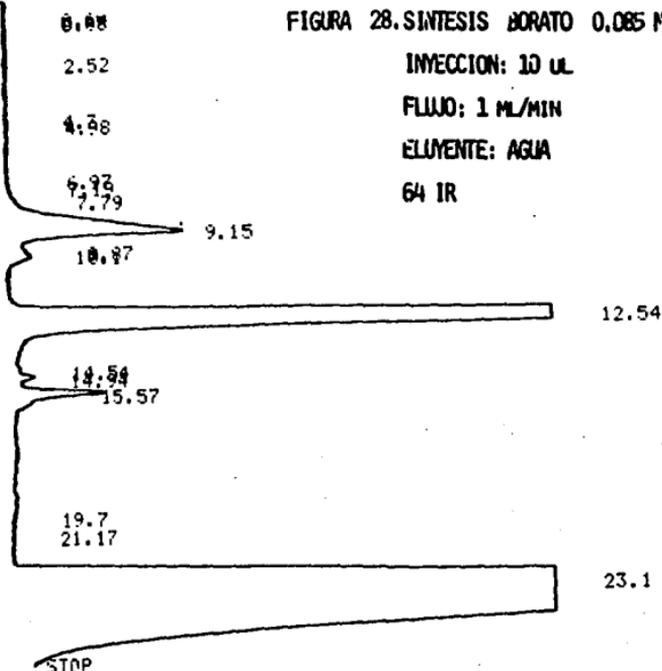
FIGURA 28. SINTESIS BORATO 0.085 M

INYECCION: 10 UL

FLUJO: 1 ML/MIN

ELUYENTE: AGUA

64 IR



C-R18
 SMPL # 00
 FILE # 2
 REPT # 24
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		0.69	0.0053		16
0		0.88	0.0048		14
0		4.7	0.0069		21
0		6.97	0.006		18
0		7.19	0.0082	V	25
0		7.79	0.0307		94
0	BORATOS	9.15	4.0839	V	12479
0		9.87	0.148	V	452
0		10.1	0.2531	V	773
0	FRUCTOSA	12.54	24.2842		74207
0		14.54	0.0135	T	41
0	SOMALTULOSA	14.94	0.1603	TV	489
0	LEUCROSA	15.57	1.0347	TV	3162
0		19.7	0.1105		337
0		21.17	0.0206	V	63
0		23.1	69.8283		213379
	TOTAL		99.9999		305577

9HR
 LEVEL 60.6
 LEVEL 63.6
 LEVEL 8.8
 START 07.01.20.17.

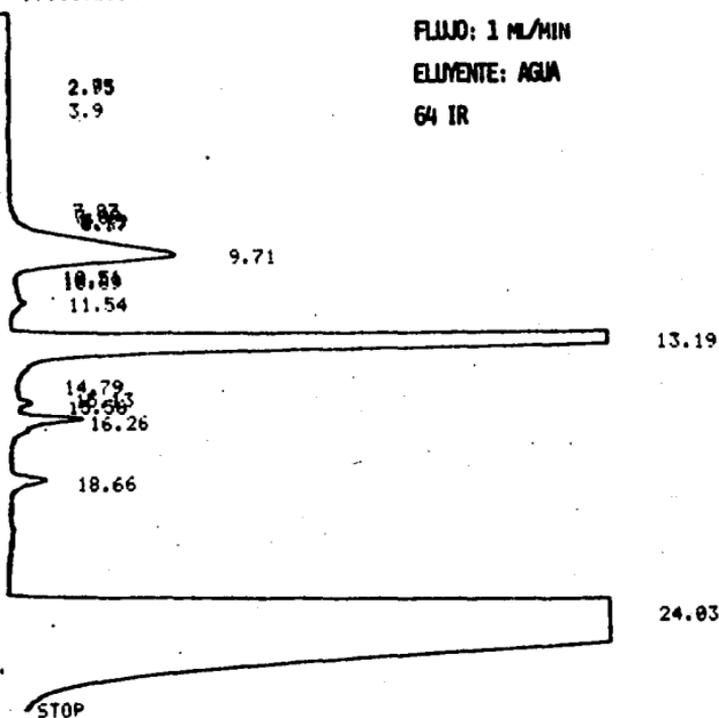
FIGURA 29. SINTESIS BORATO 0.11 M

INYECCION: 10 uL

FLUJO: 1 ML/MIN

ELUYENTE: AGUA

64 IR



C-RIB
 SMPL # 00
 FILE # 2
 REPT # 56
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		2.75	0.0086		28
0		2.95	0.0031		18
0		7.89	0.0179	V	59
0		8.15	0.0301	V	99
0		8.37	0.0221	V	73
0	BORATOS	9.71	4.7962	V	15801
0		11.54	0.0598		197
0	FRUCTOSA	13.19	23.9792		79001
0		14.79	0.0067	T	22
0	ISOMALTUOSA	15.13	0.025	T	82
0	LEUCROSA	15.56	0.1436	TV	473
0		16.26	0.8512	TV	2884
0		18.66	0.3927		1294
0		24.03	69.663		229509
	TOTAL		100		329456

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE BORATOS SOBRE LA PRODUCCION DE LEUCROSA

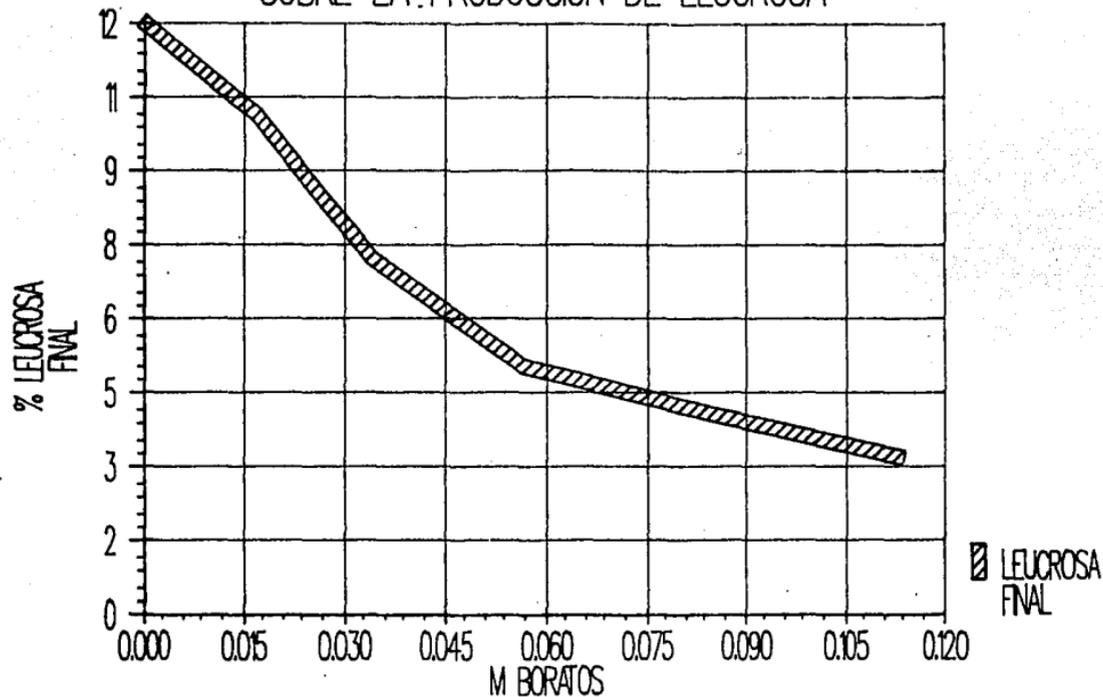
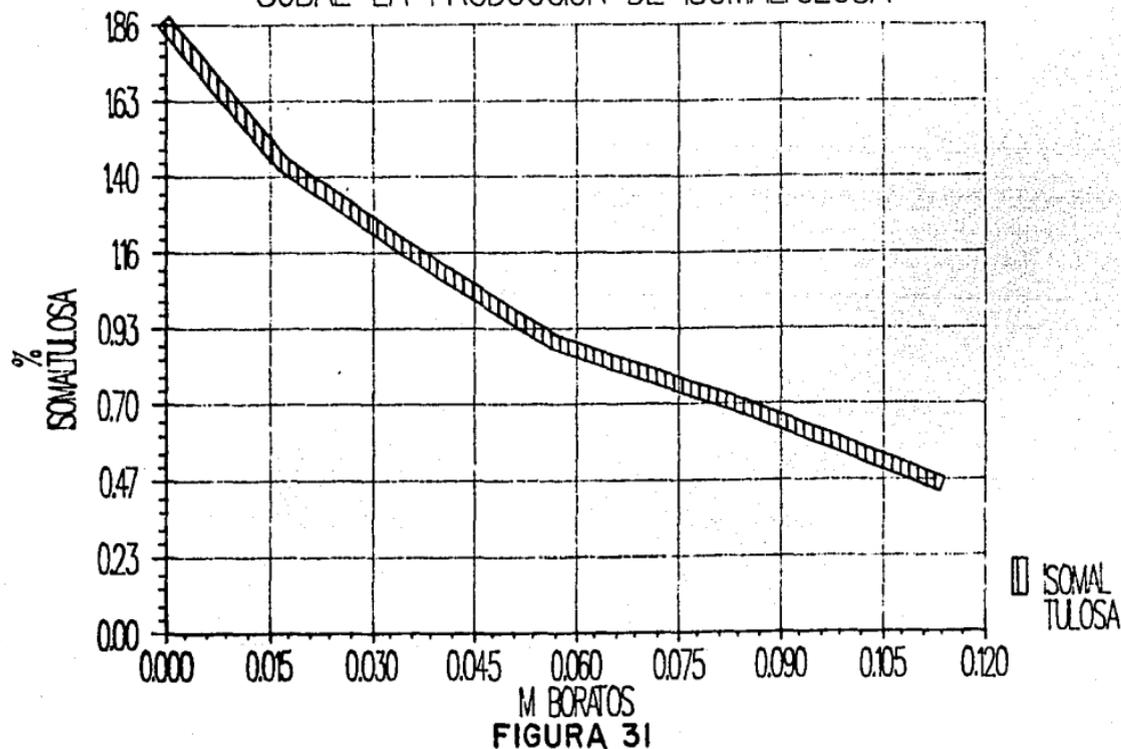


FIGURA 30

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE BORATOS SOBRE LA PRODUCCION DE ISOMALTULOSA



0.115 M, de aproximadamente 4 veces cuando se compara con el control. Un comportamiento similar se observa para la isomaltulosa.

Este resultado es de suma importancia pues, hasta la fecha, los sistemas industriales de producción de dextranas han operado con rendimientos definidos fundamentalmente por la transformación de sustrato. Estos rendimientos no concuerdan con los obtenidos experimentalmente, al cuantificar la dextrana, debido a la transformación de glucosa en leucrosa e isomaltulosa via la reacción de aceptor.

Para determinar el incremento que tendría el empleo de boratos en la síntesis sobre el rendimiento es necesario cuantificar a la leucrosa. La técnica empleada solo permite hacerlo en forma relativa a la fructosa.

De acuerdo con Robyt (13), entre la leucrosa e isomaltulosa, en ausencia de aceptores activos, hasta un 10% de la glucosa se desvía de la producción de dextranas. El empleo de boratos permitiría, entonces, disminuir dicho porcentaje aproximadamente a 2.5%. Probablemente, este decremento en la concentración de subproductos no se justifique para la síntesis de dextranas de alto peso molecular, pues por el efecto inhibitor de los boratos, el tiempo de reacción, para lograr este decremento, pasaría de 3

a 8 horas, con un apreciable decremento en la productividad. Sin embargo, por un lado, ha sido demostrado en las investigaciones tendientes a la síntesis de dextranas de peso molecular controlado (v.g. uso clínico) que la reacción de aceptor se puede incrementar considerablemente (32). Por otro lado, si se considera que las dextranas son un producto de alto valor agregado, el incremento en los costos de producción (fundamentalmente energía), sin duda serían inferiores a la utilidad obtenida por un incremento de 10% en el rendimiento.

En la Figura 32 se representa el seguimiento de la síntesis testigo con 0.085 M y 0.115 M de borato. De dichos resultados se puede observar que las reacciones de síntesis en presencia del oxianión se ven apreciablemente retardadas. Este fenómeno se debe al efecto de estos iones en la cinética de reacción, discutido con anterioridad. Mientras que la síntesis control se completa en aproximadamente 3 hs, la síntesis con borato se prolonga hasta 8 hs para el caso de mayor concentración. Sin embargo, hay que señalar que aproximadamente el 80% de conversión se alcanzó entre la segunda y tercera hora para ambos casos, situación que debe ser considerada si se plantease un análisis económico para definir el tiempo óptimo de reacción y la factibilidad de emplear iones borato para incrementar el rendimiento.

EFFECTO DE LOS BORATOS EN LA CONVERSION

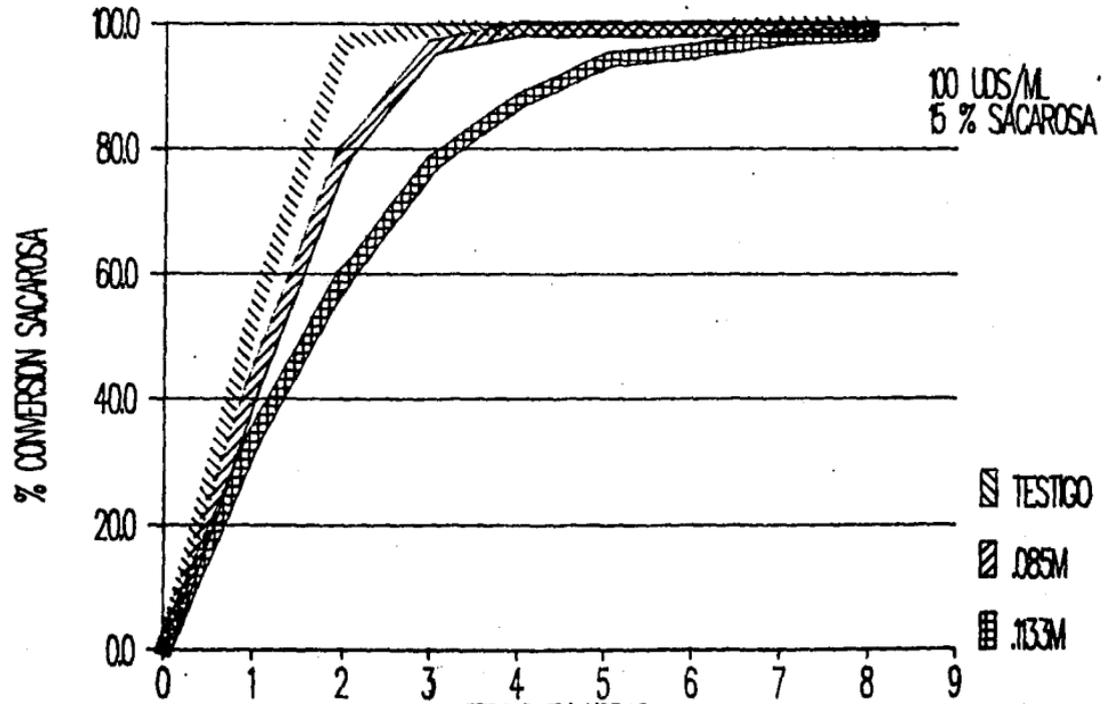


FIGURA 32

En las Figuras 33 y 34 se puede observar la evolución en la producción de los disacáridos leucrosa e isomaltulosa a lo largo de la reacción enzimática, para las dos concentraciones de borato analizadas. Del análisis de estos resultados se confirma lo observado previamente en capa fina, donde se apreciaba un incremento significativo en la concentración de subproductos durante la segunda y tercera hora de síntesis, independientemente de la concentración de boratos empleada.

Es interesante observar que a partir de la tercera hora, en los casos de síntesis con boratos, la concentración de subproductos no se modifica considerablemente, esto sucede cuando la conversión en el caso de 0.11 M de boratos es del 80%.

APARICIÓN DE LEUCROSA DURANTE
LA SINTESIS 100 UDS/m'

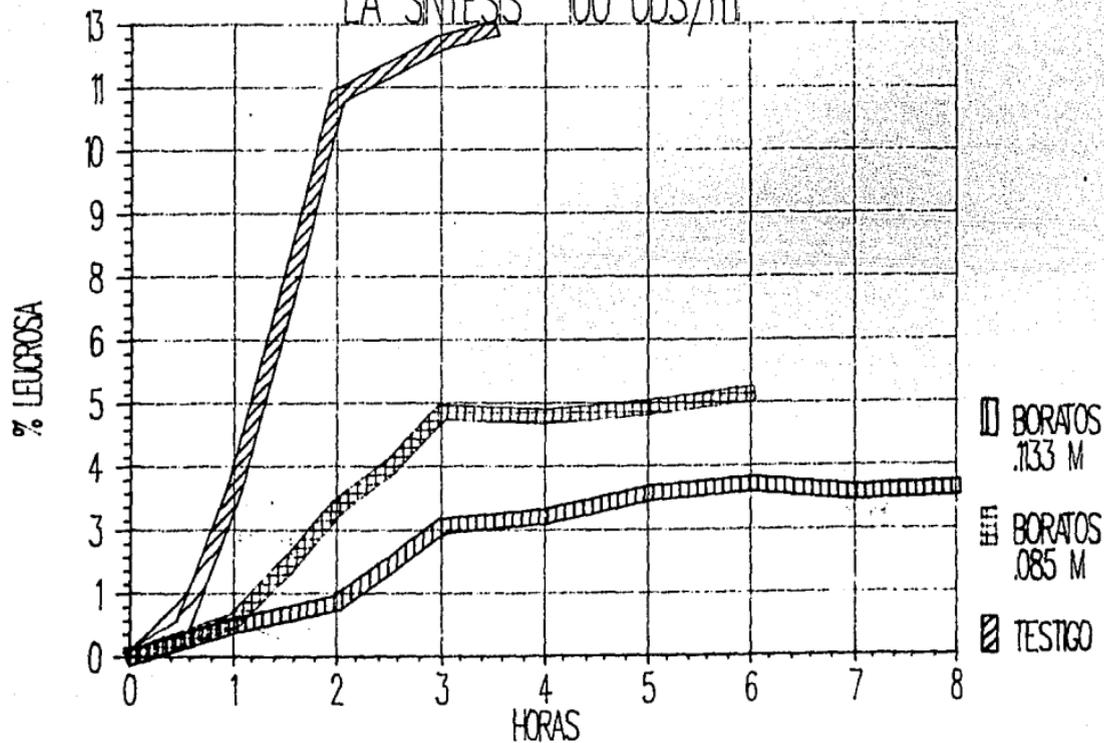


FIGURA 33

APARICION DE ISOMALTULOSA
DURANTE LA SINTESIS 100 UDS/ml

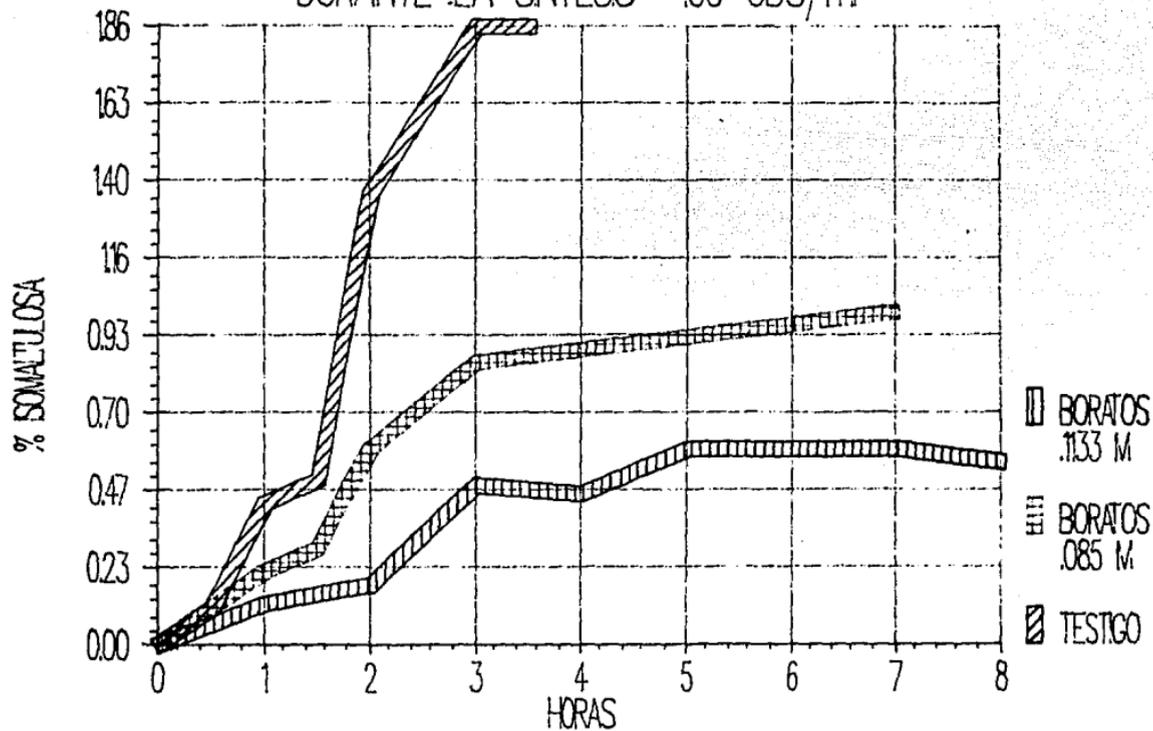


FIGURA 34

V. CONCLUSIONES

El presente trabajo se desarrolló en relación con el mecanismo de la reacción de síntesis de dextranas por acción de la dextranasa sobre sacarosa.

Para realizar este estudio fue necesario llevar la fermentación de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F a nivel de fermentador de 5 litros y caracterizar el proceso de síntesis.

Se obtuvieron buenos resultados en los sistemas de fermentación modificados al retroalimentar la sacarosa, inductor y al mismo tiempo represor catabólico. Mediante la adición continua de sacarosa en una solución de sosa se logró dicho objetivo, al mismo tiempo que se reguló el pH alrededor del óptimo reportado para la producción de la enzima. Las velocidades específicas de crecimiento encontradas resultaron inferiores a las obtenidas en proceso intermitente, lo cual resulta lógico al considerar la dependencia entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato limitante disponible. Sin embargo, a pesar de la disminución en velocidad, la producción de la enzima llegó a incrementarse hasta en un 300%.

Las preparaciones de dextranasa así obtenidas libres de

células a través de un proceso de centrifugación, fueron concentradas y purificadas mediante extracción líquido-líquido empleando polietilén glicol. Esta técnica se basa por un lado en el hecho de que mezclas de PEG y dextranas presentan una zona de inmiscibilidad para ciertos rangos de concentración. Las proteínas en el medio tienden a migrar hacia la fase del PEG. Sin embargo, en el caso de la dextranasa, la enzima migra hacia la fase del polisacárido por el hecho de encontrarse ligada en un complejo dextranosil-enzima. Aunque este proceso se efectuó en forma semiempírica, es recomendable efectuar todo un estudio de composiciones en el equilibrio para la construcción del diagrama de fases que permita el diseño óptimo de la operación. En nuestro caso, partiendo de soluciones de dextrana al 2%, se adicionó PEG hasta lograr la separación máxima. Los rendimientos de actividad fueron de 90% aproximadamente, lográndose una concentración de más de 10 veces en la actividad.

Las soluciones obtenidas fueron empleadas para los estudios posteriores. El hecho de tener una fase rica tanto en el polímero como en la enzima dificultó la experimentación sensiblemente, pues la relativa heterogeneidad del medio provocaba dispersiones en los resultados. Aún así, es posible concluir que el comportamiento cinético de la enzima sigue obedeciendo el mecanismo de Michaelis-Menten.

El uso de iones borato en la reacción de síntesis constituye el mayor aporte del presente trabajo al estudio de la reacción y la influencia de diversos factores tanto en las reacciones laterales como en las características de las dextranas sintetizadas.

En efecto, dada la posibilidad de que los boratos interactúen formando complejos con los monosacáridos, los iones borato pueden ser empleados en la síntesis de dextranas, para evitar que la fructosa liberada durante la reacción actúe como aceptor. Al quedar acomplejada con los boratos, el impedimento estérico que probablemente se presenta, disminuye considerablemente la producción de leucrosa e isomaltulosa, disacáridos resultantes de la reacción de aceptor entre la fructosa y el complejo glucosil-enzima.

Este hecho se evidenció inicialmente, en forma cualitativa mediante cromatografía en placa donde se apreciaba la disminución en la intensidad de las manchas correspondientes a los disacáridos mencionados. Ante esta situación se definieron las condiciones para caracterizar el sistema en HPLC. Ante la falta de estándares, la identificación de los disacáridos se efectuó aislandolas de la cromatoplaça.

De esta forma fue posible caracterizar la reacción de

diversas concentraciones de iones borato, encontrando resultados altamente satisfactorios a concentración de 0.11M para 100 USD/ml de actividad. En estas condiciones se redujo 4 veces la producción de los disacáridos. Este hecho permite afirmar que los rendimientos en la síntesis pueden ser incrementados mediante el empleo de boratos, aún más si se considera que en la actualidad existen investigaciones tendientes al uso de aceptores activos, como el caso de maltosa, en presencia de los cuales la formación de disacáridos se ve favorecida.

Sin embargo, los iones borato presentan igualmente cierta inhibición sobre la dextranacarasa. En efecto, desde el inicio de los experimentos se constató un decremento en la velocidad de reacción proporcional a la concentración de boratos. Desde el punto de vista cinético, este comportamiento fue similar al que presenta un inhibidor de tipo mixto, aunque dicho comportamiento cinético sólo se observó a bajas concentraciones de iones borato, a diferencia de lo que ocurre normalmente con un inhibidor mixto. De hecho, al observar una inhibición proporcional a la concentración de inhibidor, se concluyó de antemano que las características de dicho inhibidor serían difícilmente descritas por los modelos de inhibición tradicionales.

Las perspectivas que se presentan ante los resultados de este trabajo son varias:

En primer lugar, se deben efectuar las reacciones de aceptor, empleando maltosa, en presencia de boratos con el fin de incrementar rendimientos y observar el comportamiento sobre las características de los productos.

Dentro de la misma síntesis de dextranas nativas, el hecho de disminuir las reacciones laterales redundará, sin duda, en un incremento en el peso molecular, por lo que un estudio de viscosidad de las soluciones sería fundamental.

Asimismo, dado que la formación de un complejo borato-fructosa se ve favorecida a medida que se incrementa el pH, es importante contemplar un estudio en el que se observe el efecto combinado del probable incremento en la eliminación de disacáridos y el decremento en la velocidad de reacción, por alejarse del pH óptimo de actividad de la enzima. Finalmente, la caracterización cinética del inhibidor queda aún por ser establecida,

Es evidente que, dada la inhibición, es necesario establecer un compromiso basado en productividad, que considere que se trata de un producto de alto valor agregado, para definir si es conveniente incrementar los tiempos de reacción para mejorar los rendimientos o si, por el contrario, no es económicamente atractivo prolongar la reacción para incrementar en aproximadamente de 8 a 10% su rendimiento.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Takasaki, Y. 1971. Agric. Biol. Chem. 35(9):1371.
2. Jeanes, A., Haynes, W.C., Wilham, C.A., Rankin, J.C., Melvin, E.H., Austin, M.J., Cluskey, J.E., Fisher, B.E., Tsuchiya, H.M. and Rist, C.E. 1954. J. Am. Chem. Soc. 76:5041
3. Brud, R.S., Murray, E.G.D. and Hitchens, A.P., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology., Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., 6th Edition. 1948.
4. Jeanes, A., Wilham, C.A. and Miers, J.C. 1948. Biol. Chem. 174:603.
5. Dextran in: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. 2nd edition. (Editors) F.H. Mark; M.N. Bikales; Ch.G. Overberger and G. Menyes. Vol. 4 p. 752. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1986.
6. Hehre, E.J. 1941. Science. 23:237.
7. Hehre, E.J. and Sugg J.Y. 1942. J. Exptl. Med. 25:339.
8. Hestrin, S. 1944. Nature 154:581.
9. Robyt, J.F., Kimble, B.K. and Walseth, T.F. 1974. Arch. Biochem. Biophys. 165:634.

10. Robyt, J.F. and Taniguchi, H. 1976. Arch. Biochem. Biophys. 174:129.
11. Robyt, J.F. and Walseth, T.F. 1978. Carbohydr. Res. 61:433.
12. Ebert, K.H. and Schenk, G. 1968. Adv. Enzymol. 30:179.
13. Robyt, J.E. and Eklund, S.H. 1983. Carbohydr. Res. 121:279.
14. Koepsell, H.J. and Tsuchiya, H.M. 1952. J. Biol. Chem. 200:293.
15. Tsuchiya, H.M. 1952. J. Bacteriol. 64:521.
16. López Munguía, C.A. and Monsan, P. 1980. Biochimie. 62:323.
17. Aisop, R.M. Progress in Industrial Microbiology, Vol. 18; (Editor) M.E. Bushell; Elsevier Scientific Publishing Co. 1983.
18. Albertsson, A., Andersson, B., Larsson, C. and Akerlund, H.E. 1983. Methods Biochem. Analysis 28:115.
19. Gerson, D.F. 1980. Biochem. Biophys. Acta 602:269.
20. Gerson, D.F. and Akit, J. 1980. Biochem. Biophys. Acta 602: 281.
21. Kula, M.R. 1979. Appl. Biochem. Bioeng. 2:71.

22. Kroner, K.H., Hustedt, H. and Kula, M.R. 1982. *Biotechnol. Bioeng.* XXIV:1015.
23. Barker, S.A. and Somers, P.J. *Uses of Oxianiones in Enzyme Equilibrium Displacement.* In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology.* (Editor) Alan Wiseman. John Wiley & Sons. Inc. New York. 1979.
24. Boeseken, N. 1949. *Adv. Carbohydr. Chem.* 4:189.
25. Foster, A.B. 1957. *Adv. Carbohydr. Chem.* 12:81.
26. Weigel, H. 1963. *Adv. Carbohydr. Chem.* 18:61.
27. Davis, H.B. and Mott, Ch. J.B. 1980. *J.C.S. Faraday I* 26:1991.
28. Martínez, E. J.P. 1985. *Desarrollo de un Proceso para la Producción Industrial de Dextranas.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México.
29. Prat, D. 1985. *Effect des ions borates sur la cinétique et les réactions D'accepteur de L'enzyme dextrane saccharase.* Reporte de Avance. Institut National des Sciences Appliquées. Dept. de Génie Biochimique et Alimentaire. Toulouse, France.
30. Summer, J.B. 1921. *J. Biol. Chem.* 42:5.

31. Roberts, D.V. Enzyme Kinetics. Cambridge University Press, New York. 1977.
32. Oriol, E., Aurioi, D. and Monsan, P. 1986. Carbohydr. Res. 149:433.
33. Prat, D. 1984. Production continue et purification par demixtion de phases de la dextrane saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F. These de Maitrise. Institut Nationale des Sciences Appliquees, Toulouse, France (1984).
34. Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Koepsell, H.J., Corman, J., Stringer, C.S., Rogovin, S.P., Bogards, M.C., Bryant, G., Feger, V.H., Hoffman, C.A., Senti, F.R. and Jackson, R.W. 1954. J. Am. Chem. Soc. 76:2412.

APENDICE

1PRINT CHR \$(9)!"SON!"

1LIST

```
1 REM Este programa permite obtener parámetros de los modelos clásicos de
  cinética enzimática.
2 REM Se incluyen los casos de Michaelis Menten, inhibición competitiva, no co
  mpetitiva, acompetitiva y mixta.
3 REM Los puntos se encuentran ponderados, considerando que el error en la me
  dida de la velocidad se incrementa al reducir la concentración de sustrato.
4 REM El factor de ponderación está dado para cada punto por la velocidad
  promedio a la cuarta entre el cuadrado de la desviación estándar, por lo que
  se recomienda un mínimo de 4 mediciones por punto.
5 REM El programa permite comparar los resultados, con los obtenidos mediante
  la regresión lineal no ponderada.
6 REM El programa permite igualmente, efectuar la corrección eliminando el
  peor punto experimental.
8 INPUT " TITULO DEL EXPERIMENTO?"!T$
10 DIM S(20),V(20,10),VP(20),SV(20)
20 DIM RV(20),RS(20),W(20)
21 DIM YCAL(20),DY(20)
22 PRN 1
23 PRINT "EXPERIMENTO: "!T$
24 PRINT
25 CLEAR
26 M$ = "N"
27 PRINT
28 PRINT
29 PRN 0
30 INPUT "NUMERO DE PUNTOS EXPERIMENTALES ?"!NO
40 INPUT "NUMERO DE REPETICIONES POR PUNTO?"!NR
45 FOR I = 1 TO NO STEP 1
46 INPUT "CONCN. DE SUSTRATO?"!S(I)
50 FOR J = 1 TO NR STEP 1
60 INPUT "VALOR DE VELOCIDAD?"!V(I,J)
70 NEXT J
80 NEXT I
84 PRINT
85 INPUT "ALIMENTASTE CORRECTAMENTE LOS DATOS? ENTRA -Y-1!"!Z$
86 IF Z$ < > "Y" THEN GOTO 25
90 FOR I = 1 TO NO STEP 1
100 FOR J = 1 TO NR STEP 1
110 VP(I) = VP(I) + V(I,J)
120 NEXT J
130 VP(I) = VP(I) / NR
140 NEXT I
150 FOR I = 1 TO NO STEP 1
160 FOR J = 1 TO NR STEP 1
170 SV(I) = SV(I) + ((V(I,J) - VP(I)) * (V(I,J) - VP(I)))
180 NEXT J
190 SV(I) = SSR (SV(I) / (NO - 1))
200 NEXT I
201 MOME
202 IF M$ < > "Y" THEN GOTO 210
203 PRN 1
204 PRINT "CALCULO DE LOS PARAMETROS ELIMINANDO EL PEOR PUNTO EXPERIMENTAL"
205 PRINT
206 PRINT
207 PRINT
208 PRN 0
```

```

210 PRN I
211 PRINT "S"; TAB( 15);"VI av.;" TAB( 30);"D.S."
212 PRINT "-----"
220 FOR I = 1 TO NO STEP 1
230 PRINT S(I); TAB( 13);VP(I); TAB( 28);SV(I)
240 NEXT I
241 PRINT "-----"
242 PRINT "Para"INR;" repeticiones"
243 PRN O
244 INPUT "-C-Para continuar ...";X#
245 IF X# < > "C" THEN GOTO 1300
246 IF M# = "Y" THEN GOTO 2#2
247 PRN I
248 PRINT
249 PRINT
250 FOR I = 1 TO NO STEP 1
260 RV(I) = 1.0 / VP(I)
270 RS(I) = 1.0 / S(I)
280 W(I) = VP(I) ^ 4 / SV(I) ^ 2
281 NEXT I
282 SW = 0;SXW = 0;ZX = 0;SYW = 0;ZY = 0;S2WX = 0
283 ZZX = 0;SCWY = 0;ZCY = 0;SDXY = 0;ZDXY = 0
284 SS = 0
285 FOR I = 1 TO NO STEP 1
290 SW = SW + W(I)
300 SXW = SXW + W(I) * RS(I)
301 ZX = ZX + RS(I)
310 SYW = SYW + W(I) * RV(I)
311 ZY = ZY + RV(I)
320 S2WX = S2WX + W(I) * RS(I) * RS(I)
321 ZZX = ZZX + RS(I) * RS(I)
330 SCWY = SCWY + W(I) * RV(I) * RV(I)
331 ZCY = ZCY + RV(I) * RV(I)
340 SDXY = SDXY + W(I) * RS(I) * RV(I)
341 ZDXY = ZDXY + RS(I) * RV(I)
350 NEXT I
351 MX = ZX / NO
352 FOR I = 1 TO NO STEP 1
353 SS = SS + ((RS(I) - MX) * (RS(I) - MX))
354 NEXT I
356 R1 = NO * ZDXY - ZX * ZY
357 R2 = NO * ZZX - ZX * ZX
358 R3 = NO * ZCY - ZY * ZY
359 RR = R1 / ( SQR (R2 * R3))
360 NUM = (SW * SDXY) - (SXW * SYW)
370 DEN = (SW * S2WX) - (SXW * SXW)
380 PEN = NUM / DEN
390 B = (SYW - PEN * SXW) / SW
400 DS = (SCWY - SYW * SYW / SW - PEN * NUM / SW) / (NO - 2)
410 DI = SQR (DS)
420 DPEN = DI * SQR (SW / DEN)
430 DB = DI * SQR (S2WX / DEN)
431 ZEDEN = NO * ZZX - ZX * ZX
432 ZNUM = NO * ZDXY - ZX * ZY
433 CPEN = ZNUM / ZEDEN
434 CB = ZY / NO - CPEN * ZX / NO
435 ES = SQR ((ZCY - CB * ZY - CPEN * ZDXY) / (NO - 2))
436 SI = ES / ( SQR (SS))
437 S2 = ES * ( SQR (ZZX / (NO * SS)))
438 PRINT
439 PRINT "REGRESION PONDERADA"
440 PRINT
441 PRINT "pendiente=";PEN
442 PRINT "d.e.    =";DPEN
443 PRINT "ordenada =";B
444 PRINT " d.e.    =";DB

```

```

447 PRINT
448 PRINT " REGRESION NO PONDERADA"
449 PRINT
450 PRINT "pendiente n.p."=ICPEN
451 PRINT "d.s."="IS1
453 PRINT "ordenada n.p."="ICB
454 PRINT "d.s."="IS2
456 PRINT
457 PRINT "coeficiente de correlacion"=IRR
458 PRINT "-----"
459 PR# 0
460 INPUT "ENTRA-Y-SI DESEAS KM Y VMAX:"=IAS
461 PRINT
462 PRINT
470 IF AS < > "Y" THEN GOTO 570
480 KM = PEN / B
490 VMAX = 1.0 / B
500 NVMAX = 1.0 / CB
510 NKM = NVMAX * CPEN
518 PR# 1
519 PRINT
520 PRINT "KM"="IKM
530 PRINT "KM(n.p.)"=INKM
532 PRINT
540 PRINT "V max"="IVMAX
550 PRINT "V max (n.p.)"=INVMAX
551 PRINT
552 PRINT
553 PRINT
554 PRINT
555 PRINT
556 PR# 0
560 GOTO 750
570 INPUT "ENTRA -Y-SI LA PENDIENTE ESTA MODIFICADA POR(1+I/KI):"=IB#
571 PRINT
572 PRINT
580 IF B# < > "Y" THEN GOTO 660
588 PRINT
589 PRINT
590 INPUT "CONCENTRACION DE INHIBIDOR?"=INH
610 INPUT "VALOR DEL KM?"=IAKM
620 INPUT "VALOR DE LA Vmax?"=IAVMAX
630 KI = INH / ((PEN * AVMAX) / AKM - 1)
631 IIK = INH / ((CPEN * AVMAX) / AKM - 1)
632 PR# 1
633 PRINT
634 PRINT "PARA LA PENDIENTE:"
635 PRINT "-----"
636 PRINT
640 PRINT "Ki"="IKI
645 PRINT "Ki(n.p.)"=IIKI
647 PRINT "para (INH)"=INH
648 PRINT
650 PRINT "Con unidades iguales a las de la concentracion de inhibidor"
651 PR# 0
652 PRINT
660 INPUT "ENTRA-Y- SI LA ORDENADA AL ORIGEN ESTA MODIFICADA POR(1+I/KI):"=IC#
661 PRINT
662 PRINT
670 IF C# < > "Y" THEN GOTO 750
680 INPUT "VALOR DE LA Vmax?"=IAVMAX
690 INPUT "CONCN. DE INHIBIDOR?"=IINH
710 K2 = INH / ((B * AVMAX) - 1)
711 I2K = INH / ((CB * AVMAX) - 1)
712 PR# 1
713 PRINT

```

```

714 PRINT "PARA LA ORDENADA:."
715 PRINT "-----"
720 PRINT "K1      =:IK2
725 PRINT "Ki(n,p.)=:I2K
726 PRINT "para(INH)=:INH
727 PRINT
730 PRINT "Con unidades iguales a las de la concentracion de inhibidor"
732 PRINT
733 PRINT
734 PRN 0
750 INPUT "ENTRA-Y-SI TERMINASTE;";D#
760 IF D# < > "Y" THEN GOTO 460
1005 IF M# = "Y" THEN GOTO 1300
1015 PRINT
1016 PRINT
1020 INPUT " DESEAS EFECTUAR DE NUEVO LA CORRELACION, ELIMINANDO EL PEOR PUNTO
EXPERIMENTAL? ENTRA-Y-";M#
1030 IF M# < > "Y" THEN GOTO 1300
1035 REM Se determina la diferencia entre Y calculado y Y experimental con
ocriterio para eliminacion del peor punto
1040 FOR I = 1 TO NO STEP 1
1050 YCAL(I) = B + PEN * RS(I)
1060 DY(I) = ABS (RV(I) - YCAL(I))
1080 NEXT I
1085 REM Determinar el peor punto xw,yw
1090 M = 1
1100 TEST = DY(1)
1110 MM = 2
1111 IF DY(MM) < TEST THEN GOTO 1114
1112 TEST = DY(MM)
1113 M = MM
1114 MM = MM + 1
1115 IF NO > = MM THEN GOTO 1111
1116 XW = RS(M)
1117 YW = RV(M)
1118 WW = W(M)
1120 PDY = DY(M)
1135 REM Se elimina el peor punto y se corren los demas,excepto cuando el peor
es el ultimo.
1140 IF M = NO GOTO 1200
1150 FOR J = M TO NO STEP 1
1155 S(J) = S(J + 1)
1156 VP(J) = VP(J + 1)
1160 RS(J) = RS(J + 1)
1170 RV(J) = RV(J + 1)
1180 SV(J) = SV(J + 1)
1185 W(J) = W(J + 1)
1190 NEXT J
1200 NO = NO - 1
1210 GOTO 201
1250 PRINT
1260 PRINT
1300 PRINT
1310 PRINT
1320 PRN 1
1321 PRINT
1322 PRINT "fin de la correlacion"
1323 PRINT
1324 PRN 0
1400 END

```