

Biorreactor de dextranucrasa inmovilizada para la obtención de dextranas de bajo peso molecular

Liuba Domínguez Chabalina², Georgina Michelena Álvarez¹,
Emilia Carrera Bocourt¹

¹Departamento de Bioingeniería. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, P O Box 4026, Ciudad de la Habana, Cuba. Telf.: 55-70-15; Fax: 33-82-36; E-mail: miche@icidca.edu.cu

²Centro de Ingeniería de Procesos. Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría" (ISPJAE). Calle 127 s/n. Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba. Tel: 260-77-50; Fax: 267-29-64; E-mail: chabalina@iitransp.transnet.cu

RESUMEN

En este trabajo se estudia la obtención y funcionamiento de un biorreactor con enzima inmovilizada por enlaces covalente multipuntual que brinde un soporte estable para la producción de dextranas de bajo peso molecular para la síntesis de derivados. En este trabajo se inmovilizó con altas retenciones la enzima dextranucrasa en sepharosa para la obtención de dextranas de bajo peso molecular. Se estudió la cinética de reacción de la dextranucrasa-sepharosa de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten, obteniéndose que la K_m de la enzima inmovilizada es 4.3 veces mayor que la de la enzima libre. Se montó un biorreactor continuo con el derivado sepharosa-dextranucrasa, y se determinó la influencia de la velocidad de dilución en la formación del producto y la estabilidad del derivado enzimático. La constante de velocidad de inactivación operacional del biorreactor fue de 7.77×10^{-5} minutos, lo que indica una alta factibilidad del sistema. Para una dilución de 0.033 h^{-1} se obtuvieron rendimientos cercanos al 100% y se corroboró la existencia de dextrana de bajo peso molecular mediante permeación por gel, mostrando una distribución de 18.5% de producto en el rango clínico y 31% de dextranas de bajo peso molecular.

Palabras claves: biorreactor, dextranucrasa, enlace covalente multipuntual, dextrana.

Biotecnología Aplicada 2004;21:25-30

ABSTRACT

Immobilized dextranucrase bioreactor to obtain low molecular weight dextrans. This paper deals with the development and operation of a bioreactor which contains immobilized enzyme by covalent multipunctual bonds that offers a stable support for dextrans of low molecular weight production to synthesize some of its derivatives. Because the dextranucrase enzyme is very difficult to immobilize, and also there is a very high interest in the clinic derivatives production, it is necessary to obtain it in adequate and economic way. This work shows that dextranucrase enzyme was immobilized in sepharose with high retentions to obtain dextrans of low molecular weight. Kinetic reaction of sepharose-dextranucrase by Michaelis-Menten modeling was studied, for free and immobilized enzyme, resulting K_m 4.3 times bigger for the latter. A continuous bioreactor was used and the influence of a dilution rate on the product formation and the enzymatic derivate stability were determined. The operational inactivation constant rate was 7.77×10^{-5} minutes, indicating a big stability in the system. For 0.033 h^{-1} of dilution yields near to 100% were obtained and the existence of dextran was corroborated by gel permeation, which shows a product distribution of 18.5% in a clinic range and 31% of low molecular weight dextrans.

Key words: bioreactor, dextranucrase, multipunctual covalent bounding, dextran.

Introducción

La inmovilización de enzimas está siendo desarrollada con gran fuerza en los últimos tiempos por las condiciones moderadas de síntesis, compatibles con el medio ambiente. El montaje de un biorreactor inmovilizado pudiera brindar mayores productividades en la obtención de productos a partir de enzimas específicas [1, 2].

La dextranucrasa ha sido una enzima de difícil inmovilización obteniéndose bajas retenciones al intentar unirla por enlace covalente a biogel P2, dentro de geles de poli(acrilamida), en alúmina activada, atrapada en membrana de acetato de celulosa y fibras huecas de polisulfonatos y soportes de sílica porosa activados con glutaraldehído.

La inmovilización por enlace covalente multipuntual es un método que favorece la formación del primer

enlace enzima-soporte por la disminución de impedimentos estéricos en el sistema [3]. Con este método se activan una gran cantidad de grupos funcionales convenientes para la reacción con los de la enzima, existiendo una mayor cantidad de enlaces entre la enzima y el soporte, y por tanto, aumentando la estabilidad del sistema [4, 5].

Uno de los productos que podría obtenerse a partir de la inmovilización de enzimas es la dextrana (glucopolisacárido sintetizado a través de cierto tipo de glucosiltransferasas como son las dextranucrasas). Estas enzimas catalizan la transferencia de glucosa proveniente de la sacarosa a moléculas aceptoras, principalmente azúcares, para la síntesis de glucopolisacáridos. En ausencia de aceptores el principal producto de la reacción es la dextrana, un

1. Robyt JF, Taniguchi H. The mechanism of dextranucrase action. Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. *Biochem. and Biophys.* 1976; 174:129-35.

2. Robyt JF, Klimbe BK, Walseth TF. The mechanism of dextranucrase action. Direction of dextran biosynthesis. *Biochem. and Biophys.* 1974;165:534-640.

3. Shuler ML, Kargi F. *Bioprocess engineering: Basic concepts.* New York; 1992.

4. Blanco RM, Guisán JM. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohidride reduction of trypsin agarose derivatives. *Enzyme Microb. Technol.* 1989;11:360-6.

polímero compuesto por enlaces α (1-6) en la cadena principal y con ramificaciones en α (1-2), α (1-3) y α (1-4).

La dextrana encuentra su interés mayor en la producción de derivados clínicos. El sulfato de dextrana está siendo estudiado por su posible función como inhibidor del HIV-1 y sus propiedades anticoagulantes [7, 8]. La hierro-dextrana es de los derivados de uso más extendido por su utilización como antianémico.

Con este trabajo, se estudia la obtención y funcionamiento de un biorreactor con enzima inmovilizada por enlaces covalente multipuntual que brinde un soporte estable para la producción de dextranas de bajo peso molecular para la síntesis de derivados.

Materiales y métodos

1. Producción y purificación de la dextransucrasa

La dextransucrasa fue producida a partir del cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* B/110-1-1 en 4 L de medio, contenido en fermentadores Marubishi (RFA) de 5 L de volumen total. La composición del medio de cultivo fue la siguiente (g/L): sacarosa (20), extracto de levadura (6), Na_2HPO_4 (5), MgSO_4 (66.7×10^{-3}), KCl (3.3×10^{-3}), FeSO_4 (3.3×10^{-3}), MnSO_4 (3.3×10^{-3}).

El crecimiento celular fue medido por turbidez a 540 nm en un espectrofotómetro UV-visible Spectronic 601 (OPTON, PM2A, RFA) equipado con cubetas de 2 mL. Las muestras fueron leídas contra un blanco constituido por el caldo de la fermentación inicial. La separación de las células del caldo enzimático se efectuó por centrifugación en una centrífuga Sharples (Alfa-Laval, Suecia) a 12 000 g.

Se preparó polietilenglicol (PEG) 4000 al 15% y se añadieron iguales volúmenes de PEG que de dextransucrasa cruda a 25 °C. Se agitó y se dejó enfriar a 4 °C durante 4 horas. Se decantó y se repitió la operación. La muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 12 000 rpm. El sobrenadante se separó y la enzima se arrastró con tampón de acetato de sodio.

2. Inmovilización de la enzima dextransucrasa en diferentes soportes. Selección del soporte

Se ensayó la inmovilización con 4 soportes: agarosa, sílica, sepharosa y biogel [9, 10]. La concentración de la enzima es 118.7 DSU/mL, la relación entre enzima y soporte fue de 1 (mL/mL) y se trabajó a una temperatura de 30 °C.

Con la agarosa y la sílica se procedió primeramente al entrecruzamiento, al estar éstas en forma sólida (polvo) y tenerlo que pasar a forma de gel. Se tomaron 10 g de cada uno de estos y se le añadieron 100 mL de tampón de acetato de sodio (0.05 M) pH=5.4. Posteriormente se añadieron 10 mL de epícloridrina y se agitó la solución durante 30 minutos, dejándose reposar 1 hora. Se lavaron los geles 5 veces con abundante agua destilada.

A partir de aquí se procedió con los 4 geles de la siguiente manera: en cada caso se añadieron 400 mL de etilendiamina (2M) pH=10 para aminorar los geles y se mantuvieron en agitación durante 2 horas [10]. Se la-

varon los geles 5 veces con agua destilada. Se añadieron 7 mL de glutaraldehído al 6% y se dejó agitando durante 18 horas. Pasado este tiempo se lavaron los geles con agua destilada y se dejaron decantar las soluciones. Se separaron los sobrenadantes de los geles y se le añadió a estos últimos, la misma cantidad de enzima y de tampón de acetato de sodio (0.05 M) pH=5.4. En los 4 casos se determinó la cinética de reacción durante 5 horas.

3. Determinación de la cinética enzimática de la enzima libre e inmovilizada

Se estudió el efecto de la concentración de sustrato inicial a 10, 15 y 20% de sacarosa con una misma concentración de enzima inmovilizada y libre. Cada 10 minutos y durante 40 minutos se tomó muestra (1 mL) y se le determinó la concentración de azúcares reductores.

4. Obtención de la dextrana de bajo peso molecular. Influencia de la velocidad de dilución

Se montó una columna de vidrio enchaquetada de 0.5 L de capacidad, con el derivado enzimático, y se hizo pasar solución buffer de acetato de sodio (0.05M) pH 5.4, con una bomba de microflujo, para su total asentamiento y buena distribución dentro de la columna. Posteriormente se alimentó una solución de sacarosa al 15% y maltosa al 5%, variando el régimen de dilución (0.033, 0.1, 0.2 h⁻¹). A las muestras colectadas se le realizaron los análisis de concentración de azúcares reductores totales, concentración de carbohidratos, % de sólidos y viscosidad relativa. La distribución del peso molecular de las dextranas fue obtenido por cromatografía en Sephadex G-150 en una columna K26/100 a temperatura de 25 °C y flujo de 13 mL/h. La columna fue calibrada con patrones de peso molecular conocido Dextran T10, T40 y T70 (Pharmacia LKB Biotechnology, Upsala, Suecia). A la muestra de dextrana se le determinó la concentración de carbohidratos totales.

5. Técnicas analíticas

5.1. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la dextransucrasa en el sobrenadante se estimó midiendo el poder reductor de la fructosa liberada durante la reacción enzimática en presencia de 10% (w/v) de sacarosa y usando tampón de acetato de sodio (0.05 M) pH 5.4. Esta técnica se efectuó a una temperatura de 30 °C. Los azúcares se determinaron por el método 3.5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Sumner [11]. La concentración de las muestras fue calculada interpolando en una curva patrón de glucosa (360-1800 mg).

5.2. Determinación de la concentración de los azúcares reductores totales

La determinación de la concentración de los azúcares reductores totales se hizo por el método del 3.5-dinitrosalicílico (DNS) en el cual se tomaron 3 mL de muestra y 2 mL de DNS [11].

5.3. Determinación de proteína

Se desarrolló por el método de Lowry [12].

5. Guisán JM, Bastida A, Cuesta C, Fernández-Lafuente R, Rosell CM. Immobilization-stabilization of a chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Biotechnol. and Bioeng.* 1991;38.

6. Koepsel HJ, Tsuchiya H. Enzymatic synthesis of dextran. *J. Biol. Chem.* 1953; 200:793-801.

7. Lorentsen KJ, Hendrix CW, Collins JM. Dextran sulfate is poorly adsorbed after oral administration. *Ann. Of Intern. Medicine* 1989;111:7:561-6.

8. Neville GA, Gallicano KD, Beckstead HD, Mc Gilvegy IJ. Desintegration of dextran sulfate tablet product: effect of physicochemical properties. *Drug develop. and Industrial Phar.* 1992;18:19:2067-79.

9. Guisán JM. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 1988;10:357-82.

10. Hernández O. Ingeniería y diseño de biocatalizadores y bioprocesos de síntesis enzimática de antibióticos b-lactámicos (disertación). ISPIAE;1996.

11. Sumner JB, Somers GF. *Chemistry and methods of enzymes*;1953.

12. Lowry OH, Farr AL, Rosebooh NJ. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-71.

5.4. Determinación de la concentración de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se hizo por el método de antrona-ácido sulfúrico. Se tomó 0.6 mL de muestra y se le añadió 1.2 mL de solución antrona-sulfúrico (0.2 g de antrona, 5 mL de agua destilada y 95 mL de ácido sulfúrico al 97%). Se agitó bien y se hirvió durante 5 minutos. Posteriormente se colocó en agua fría y se determinó la lectura de densidad óptica a $\lambda=625$ nm.

5.5. Sólidos

Se determinó el % de sólidos por refractometría a una temperatura de 20 °C, en un refractómetro Haake, RFA.

5.6. Viscosidad

La viscosidad intrínseca se determinó en un viscosímetro Ubbelohde, por el método capilar.

Resultados y discusión

1. Purificación de la dextranucrasa

El proceso de purificación partió de un extracto crudo impuro con una concentración baja de la proteína de interés. La actividad específica de la dextranucrasa cruda fue de 1.49 DSU/mg lográndose purificar casi 14 veces y aumentar su concentración casi 20 veces, lo que conlleva a un aumento de la actividad específica (Tabla 1). Con esto se obtiene un producto de mayor interés desde el punto de vista de pureza y por tanto debe obtenerse una mayor estabilidad de la enzima inmovilizada.

El resultado de este proceso reportado por Paul y Monsan [13], plantea rendimientos por partición en dos fases de 95%. En este estudio, el recobrado fue de 97.4% (ligeramente superior) en un proceso simple de partición en fases utilizando Polietilenglicol (PEG 4000), que en caso que se quisiera, pudiera recuperar-se por un sistema de membranas.

2. Selección del soporte y tiempo de inmovilización

Con el objetivo de evaluar y comparar el comportamiento de la dextranucrasa en diferentes soportes, y seleccionar el que mejor características tenga para el funcionamiento estable de la enzima, se probaron variantes.

En todos los casos se procedió a la activación de los geles por el procedimiento de Guisán [9] modificado según se describe en el capítulo de Materiales y métodos, epígrafe 2. La inmovilización multipuntual (mediante grupos polifuncionales) presenta una buena congruencia geométrica y alta densidad de grupos reactivos estables que facilitan la unión del máximo número de subunidades al soporte, contribuyendo a estabilizar la proteína. En la Figura 1 se muestran los resultados del proceso de obtención de derivados

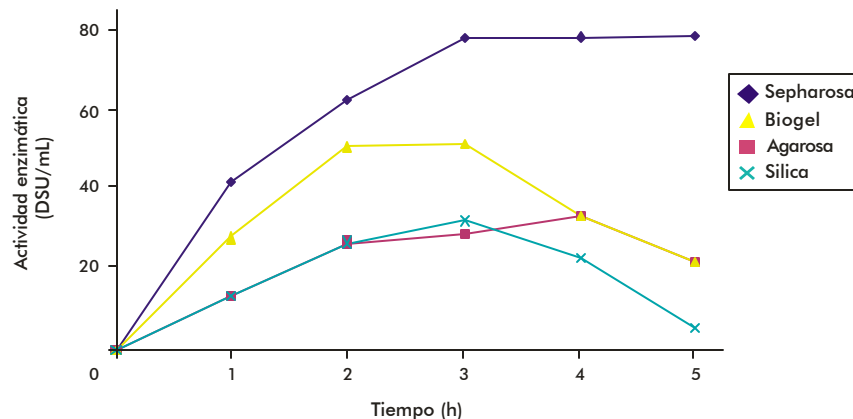


Figura 1. Comportamiento de la actividad enzimática en los diferentes geles con respecto al tiempo (T=30 °C; concentración enzimática de la enzima libre: 118.7 DSU/mL; relación enzima/soporte=1 (mL/mL)).

enzimáticos en dependencia del soporte, donde la mayor inmovilización se logró en el gel de sepharosa (74.53 DSU/mL) que debe corresponder con una menor interferencia en cuanto a impedimentos estéricos por el gran tamaño de la enzima, lo que está relacionado con los poros del soporte y sobre todo con la reactividad del gel activado previamente por el fabricante con CNBr.

Se calcularon los factores de inmovilización (FI) para los 4 derivados enzimáticos (relación de las actividades enzimáticas para la enzima libre e inmovilizada) con los siguientes resultados: agarosa 0.415, biogel 0.149, sílica 0.261 y sepharosa 0.628. Si se compara el orden decreciente de los FI, se observa que la agarosa activada fue el segundo soporte en lograr la inmovilización de la dextranucrasa y coincide con presentar mayor área superficial que el sílica gel activado (850 y 675 m²/g respectivamente) y el biogel P-2 tiene un tamaño de partícula mayor que la sílica (menor área superficial) y además excluye a moléculas de 20 kDa, por lo que no es adecuado para retener la dextranucrasa con un peso molecular 10 veces mayor a este tamaño de exclusión, de ahí los bajos niveles de inmovilización que presenta este soporte.

Según se puede observar en la Figura 1 que describe la cinética del proceso de inmovilización, después de la hora 3 (tiempo escogido para realizar los posteriores procesos de inmovilización) e incluso la 2, existe poca variación en la capacidad inmovilizante para la mayoría de los soportes analizados, lo cual parece producido por el bloqueo de los poros debido a la deposición de proteínas o asociaciones de éstas sobre los mismos, de forma tal que disminuye notablemente su capacidad de carga efectiva. El tiempo de inmovilización puede favorecer el correcto orde-

13. Monsan P, Paul F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiol. 1995;16:187-92.

Tabla 1. Proceso de purificación de la enzima dextranucrasa a partir de *Leuconostoc mesenteroides*. Partición por fases con polietilenglicol 4000 al 15%.

Enzima	Volumen (mL)	Actividad enzimática (DSU/mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Actividad específica (DSU/mg)	Recobrado (%)	Factor de purificación
Cruda	1000	28.52	18.38	1.49	100	1
Purificada	50	555.55	27.17	20.44	97.39	13.72

namiento de las moléculas de proteína en el interior de los poros, facilitando la interacción de la enzima con el soporte [10]. Una larga reacción de inmovilización permite una mayor interacción enzima-soporte y por tanto, la posibilidad de formación de un mayor número de enlaces. Sin embargo, el tiempo de contacto enzima-soporte activado no puede aumentarse infinitamente pues se corre el riesgo que debido al proceso de multiinteracción comience a producirse una inactivación gradual de la enzima sometida a continuas reacciones químicas.

3. Cinética enzimática con la enzima libre e inmovilizada dentro del soporte

El estudio del comportamiento cinético de la dextranucrasa inmovilizada midiendo la velocidad inicial de reacción fue determinado usando sacarosa al 10, 15 y 20%. La velocidad fue calculada como la pendiente de la línea recta que ajusta los reductores liberados en la reacción frente a la sacarosa en el tiempo de reacción. La reacción fue medida con sustrato sacarosa (15%), tampón de acetato de sodio (0.05 M) pH 5.4 y 30 °C. Se ajustó la ecuación de Michaelis-Menten por el método del doble recíproco (Figura 2), y los parámetros calculados fueron la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima de reacción (V_m). Para la dextranucrasa libre el valor de K_m obtenido fue de 0.1372 M y el de V_m fue 0.108 mM/min; para la dextranucrasa inmovilizada la K_m fue de 0.4703 M y la V_m fue 0.163 mM/min. En este modelo, el valor de K_m (que significa la afinidad de la enzima por su sustrato y representa matemáticamente la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la máxima) fue 3.4 veces más alto para la inmovilizada que para la enzima libre. Vale señalar que cuanto más pequeño sea el K_m menos concentración de sustrato necesita la enzima para actuar y más eficiente es el proceso. La inmovilización de la enzima incorpora una resistencia adicional a la ocurrencia de la reacción enzimática. El aumento del K_m , que señala un cambio de afinidad en la enzima a su sustrato, es probablemente causado por cambios estructurales en la enzima por el procedimiento de inmovilización y la pobre accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima inmovilizada. Resultó contradictorio que el V_m ajustado no se afectó por el efecto de la inmovilización.

Observando los valores del K_m para la enzima libre y calculando la concentración de sustrato a la cual la enzima debe tener su velocidad máxima, indica un valor de 94 g/L próximo al reportado por otros autores [14] como óptimo para la ocurrencia de la reacción enzimática, recordar que hasta el propio análisis de actividad enzimática se realiza con concentraciones de sacarosa de 100 g/L. Sin embargo, el sistema inmovilizado necesitará para que trabaje velozmente concentraciones de sacarosa en el orden de los 320 g/L, donde probablemente ocurran otros fenómenos vinculados con la inhibición por sustrato.

Comparando estos resultados con los de Arica [15] los K_m de la enzima libre e inmovilizada son mucho mayores que los reportados para el sistema glucoamilasa-dextrina y en general son también mayores que otros K_m reportados para procesos más

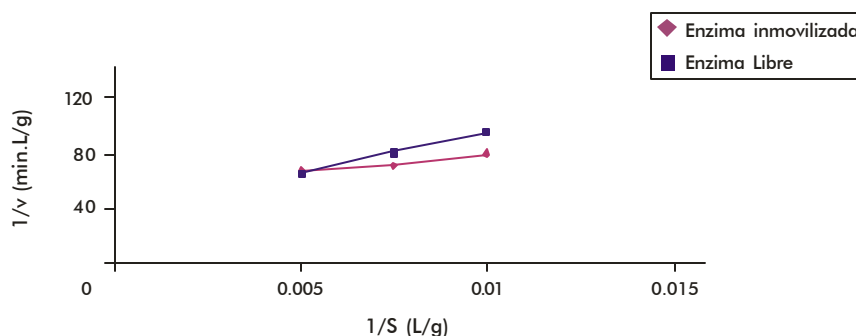


Figura 2. Ajuste de las constantes cinéticas de Michaelis-Menten por la ecuación del doble recíproco.

* v: velocidad inicial de reacción
 ** S: concentración de sustrato
 Enzima inmovilizada: $y = 5490.2x + 34.132$ $R^2 = 0.9616$
 Enzima libre: $y = 2419x + 51.536$ $R^2 = 0.9998$

espontáneos [16]. Sin embargo, estos resultados coinciden con los de Arica en encontrar un K_m mayor para el sistema insoluble con relación al soluble. Arica señala K_m 5 veces mayores para la enzima inmovilizada y la poca afectación de los valores de V_m en ambos sistemas.

4. Análisis de la influencia de la velocidad de dilución en el rendimiento de la reacción de síntesis de dextranas de bajo peso molecular

Con el derivado enzimático dextranucrasa-sepharosa se procedió a empacar un biorreactor para la reacción de síntesis de oligosacáridos de glucosa y dextranas de bajo peso molecular. Las dextranas de peso molecular controlado pueden obtenerse por hidrólisis química o enzimática [17, 18] pero con rendimientos menores que la síntesis enzimática (80-86% de los rendimientos estequiométricos) por ser la hidrólisis un proceso probabilístico de ruptura de la cadena polimérica. Sistemas de inmovilización de dextranucrasa en biorreactores han sido escasamente abordados en la literatura. Se ha intentado unirla por enlace covalente a un biogel P-2 [1, 2], dentro de columnas cromatográficas con geles de poli(acrilamida), en alúmina activada, atrapadas en membranas de acetato de celulosa y fibras huecas de polisulfonatos para el trabajo en ultrafiltros [19] y más recientemente en DEAE-celulosa, DEAE-sephadex y soportes de sílica porosa activados con glutaraldehído [20], resultando muy bajos las retenciones dentro de los soportes o un bajo funcionamiento de los biorreactores por dificultades en la estabilidad del sistema y problemas reológicos.

La disminución de la velocidad de dilución favoreció el aumento de la concentración de azúcares reductores libres, expresado en este sistema como fructosa que es proporcional al contenido de

14. Tsuchiya HM, Hellman NN, Koepsell HJ, Corman J. Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran. *J. American Chem. Soc.* 1955; 7:2412-19.

15. Arica J. Immobilization of glucoamylase in phema. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1999.

16. Stryer L. *Bioquímica*. 4ta ed.: Reverté S. A.; 1995.

17. Mibielli G, Filho M. Biosíntesis *in vitro* de dextrana clínica. *Proceedings of the II Process Engineering Congress; 1999 Agosto 30 - Septiembre 02; Brasil.*

18. Mountzouris K, Gilmour S, Rastall R. Continuous production of oligodextrans via controlled hydrolysis of dextran in an enzyme membrana reactor. *Journal of food science* 2001;(5):1767-71.

19. Kabioli H, Reilly PJ. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase. *Biotechnol. and Bioeng.* 1988;22.

20. El-Sayed A, Mahmoud W, Coughlin R. Comparative study of production of dextranucrase and dextran by cells of *Leuconostoc mesenteroides* immobilized on cellite and Calcium Alginate beads. *Biotechnol. and Bioeng.* 1990; 36:83-91.

Tabla 2. Características de los productos de la biosíntesis en el biorreactor enzimático (Concentración de sustrato: 150 g/L sacarosa; 50 g/L maltosa; pH=5.2; temperatura: 30 °C)

Velocidad de dilución (h ⁻¹)	Azúcares reductores (g/L)	Sólidos (%)	Viscosidad intrínseca (---)	Peso molecular (Da)
0.033	100.8	18.5	0.073	3038
0.1	63.57	15.5	0.049	945
0.2	49.13	10	0.041	810

dextrana, obteniéndose un mol de dextrana por mol de fructosa liberado. Esto se corresponde igualmente con el aumento del contenido de carbohidrato, del % de sólidos y de los valores de la viscosidad intrínseca que corresponde con un determinado peso molecular (Mw) [17].

El aumento de la viscosidad indica la formación de dextranas de mayor peso molecular, como una consecuencia de la adición de unidades de glucosa a la cadena del polímero y a la iniciación de nuevas cadenas propiciado por un mayor tiempo de contacto.

Se obtuvieron rendimientos entre el 50 y 60% para las mayores velocidades de dilución ensayadas. Sin embargo, la reacción ocurrió a valores muy cercanos al 100% de conversión cuando se trabajó a dilución igual a 0.033 h^{-1} , con las concentraciones de sustrato descritas. Con diluciones mayores se observó una disminución marcada en el rendimiento, debida a un insuficiente tiempo de contacto entre el sustrato y el derivado enzimático. La Tabla 2 muestra las características de los productos obtenidos para las diferentes velocidades de dilución en el biorreactor empacado.

No es conveniente operar el biorreactor a tiempos de contacto superiores a 30 horas ($D=0.033 \text{ h}^{-1}$), porque debe esperarse comportamiento de plato a esta misma concentración de sustrato, por no ser posible aumentar la conversión de la reacción e influir negativamente sobre la productividad del sistema.

Según el valor obtenido de la viscosidad intrínseca para dilución de 0.033 h^{-1} , el producto resultante tiene un valor promedio de peso molecular en 3038 Da. Para conocer el rendimiento y la distribución molecular de los productos formados, se inyectó una muestra del producto en una columna de permeación por gel, trabajando con una matriz de Sephadex G-150, calibrada con patrones de dextranas. El cromatograma de la mezcla producto sintetizado en el biorreactor con el derivado enzimático se muestra en la Figura 3.

La distribución de pesos moleculares de la dextrana obtenida muestra una distribución trimodal donde el 18.5% corresponde a un pico de dextrana de peso molecular promedio próximo al rango clínico ($V_e=52.9 \text{ mL}$, $M_w=34398$), un 31% del carbohidrato presenta un peso molecular de 3505 promedio (dextranas de bajo peso molecular con un grado de polimerización de $3505/162=22$ unidades de glucosa) y un tercer pico (50.5% del carbohidrato total) en el volumen de lavado de la columna y fuera del rango de calibración que corresponde a la sacarosa no convertida, oligosacáridos formados y fructosa liberada en la reacción. No se encontró formación de dextranas de alto peso molecular que eluyeran en el volumen muerto de la columna.

Experiencias anteriores [18, 21] con otros sistemas de inmovilización por entrapamiento mostraron que no fue posible operar el sistema sin el uso de la maltosa como aceptor en el sustrato, debido a la formación de dextranas de alto peso molecular que producen altas viscosidades, provocando limitaciones en la difusión interna de la perla que atrapa a la enzima y que dificulta la salida de la molécula de dextrana para producir finalmente una gran unidad polimérica de alta viscosidad en la superficie de las gotas y dificultades muy serias en el flujo de salida del reactor.

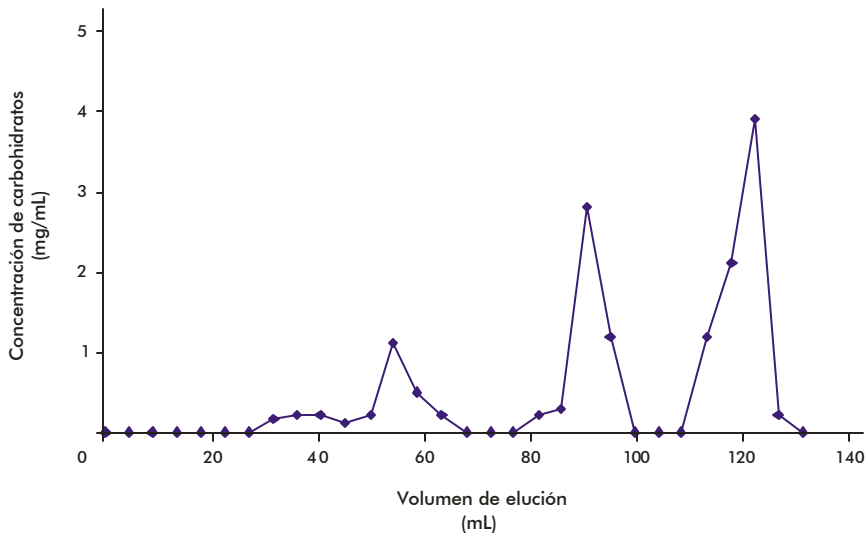


Figura 3. Cromatograma de permeación por gel, de la mezcla producto obtenida en el biorreactor enzimático a dilución de 0.033 h^{-1} .

5. Estabilidad operacional del biorreactor empacado con dextranucrasa-sepharosa

Las características estructurales de una enzima son responsables en gran medida de su nivel de estabilidad bioquímica. La estabilidad operacional del derivado de dextranucrasa fue estudiada en el biorreactor durante 20 días. La Figura 4 muestra el comportamiento de la actividad enzimática mantenida por el derivado de dextranucrasa sobre sepharosa durante los días de operación. Se observó que la dextranucrasa inmovilizada perdió solamente el 30% de su actividad después de 10 días de operación continua. Al final de la experiencia después de 17 días retenía el 13.2% de la actividad inicial.

La constante de velocidad de inactivación operacional (K_{iop}) de la dextranucrasa inmovilizada sobre sepharosa a 25°C con sustrato sacarosa-maltosa (15-5%) en buffer de acetato de sodio, pH 5.4, fue calculada en 0.1119 días^{-1} ($7.77 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$) como muestra la Figura 4, lo que es un valor favorable-

21. Michelena G. Diseño de tecnología de producción del complejo hierro-dextrana (disertación). ICIDCA, 1997.

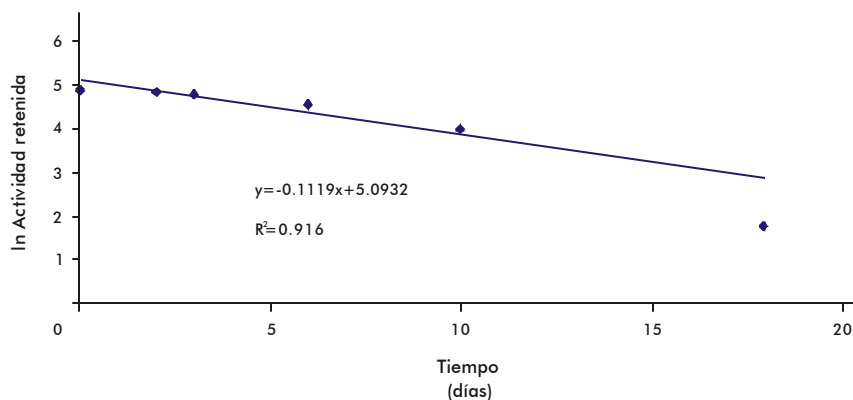


Figura 4. Ajuste de la ecuación para obtener la constante de velocidad de inactivación operacional del biorreactor. Ecuación de la recta: $y=-0.1119x+5.0932$ $R^2=0.9164$

mente pequeño que indica una alta estabilidad operacional del biorreactor. Otros autores han encontrado inactivaciones de sus sistemas inmovilizados trabajando con acilasa a las 48 horas [10]. Por otra parte, Arica [15] mostró un sistema altamente exitoso de glucoamilasa entrampada en esferas de pHEMA cuando el Kiop obtenido fue de $2.78 \times 10^{-10} \text{ min}^{-1}$, valor más favorable que el obtenido en este trabajo pero determinado sobre la base de los resultados de 5 días de operación.

Por consecuencia de este estudio y considerando específicamente la estabilidad operacional del biorreactor, se puede plantear que el derivado dextransucrasa-sepharosa por enlace covalente multipuntual puede ser exitosamente utilizado para la producción continua de dextranas de bajos pesos moleculares y otros oligosacáridos.

Conclusiones

· En el proceso de partición en fase con polietilenglicol 4000 (15%)-dextrana, se obtuvo un concentrado enzimático de 555.55 DSU/mL y casi 14 veces los valores de pureza, con relación a la enzima cruda, resultando adecuado para los propósitos de inmovilización en el sistema ensayado.

Aprobado en febrero de 2004.

· El mejor factor de inmovilización de los sistemas estudiados en este trabajo se obtuvo en el derivado sepharosa-dextransucrasa con un 62.8% de retención de la actividad enzimática.

· La cinética de inmovilización en sepharosa mostró un tiempo de 3 horas, como el adecuado para este proceso.

· El derivado obtenido dextransucrasa-sepharosa ajustó la ecuación de Michaelis-Menten con un Km 3.4 veces mayor que el de la enzima libre. Este hecho puede determinar posibles afectaciones de inhibición por sustrato.

· En la biosíntesis de la dextrana, se observó que a medida que se disminuyó la velocidad de dilución, aumentó la concentración de azúcares reductores, y consecuentemente, aumentó el peso molecular de la dextrana obtenida.

· La cromatografía de permeación por gel mostró la formación de dos grupos de dextrana: una en el rango clínico (18.5%) y otra con un 31% de rendimiento total a los 3500 Da.

· Se logró una estabilidad operacional del reactor de 17 días, para una constante de velocidad de inactivación de 7.77×10^{-5} minutos.