

# FERMENTACIÓN "FEED BATCH" PRODUCCIÓN DE DEXTRANASACARASA

Juan Heraldo Viloche Bazán<sup>1</sup>

## RESUMEN

*La enzima Dextranasacarasa fue producida por fermentación del *Leuconostoc Mesentoreoides* NRRL B512-F por un sistema "feed batch" de 3 litros de capacidad con un caudal de aereación de 0,5 l/min, una velocidad de agitación de 200 RPM y un control de pH. El pH fue mantenido en 6,7  $\pm$  0,2 por la adición de una solución combinada de sacarosa y NaOH a través de la acción de una bomba operada por el controlador.*

## ABSTRACT

*The Dextranasaccharase enzyme was produced by fermentation of *Leuconostoc Mesentoreoides* NRRL B512-F through 3 lts. capacity batch system with 0,5 l/min flowing aeration, 200 RPM agitation speed and pH control. pH was kept at 6,7 ( $\pm$  0,2) by the addition combined solution of saccharose and NaOH through pump action operated by a controller.*

## I. PROPIEDADES

La Dextranasacarasa (1-6- $\alpha$ -glucosiltransferasa) es una enzima extracelular, producida por muchos microorganismos del tipo: *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, que tienen la propiedad de sintetizar la dextrana a partir de la sacarosa. Las propiedades, mecanismos de reacción, métodos de producción y purificación de esta enzima, están relativamente caracterizados, principalmente la enzima producida del *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, que produce una dextrana con dos tipos de uniones glucosídicas: (1,6) y (1,3).

Durante muchos años se pensó que la sacarosa era el único sustrato conocido para la inducción de la producción de la dextranasacarasa, porque azúcares como, glucosa, fructosa, manosa, lactosa, etc., sólo promueven el crecimiento vegetativo de la bacteria, pero sin producción de la enzima. Otros

estudios demuestran que muchos compuestos conteniendo una unión  $\alpha$ -D-glucosídica con energía similar a la de la sacarosa, sirven como sustrato para la producción de la dextranasacarasa.

La Dextranasacarasa cataliza la síntesis de dextrana a partir de la sacarosa en un amplio rango de temperatura (de 0 a 40°C). En la reacción no intervienen compuestos fosforilados y la energía para la formación de las unidades glucosídicas, es proporcionada por la hidrólisis de la sacarosa.

La enzima bruta y liofilizada retiene la actividad por varios años, cuando es almacenada a temperaturas menores de 5°C. En solución, varios factores influyen en la estabilidad de la enzima, siendo la temperatura y el pH dos de los parámetros fundamentales. La presencia de dextrana, polímeros neutros como polietilenglicol (PEG), metilcelulosa y detergentes neutros aumentan significativamente la estabilidad de la enzima. En cambio, la presencia de  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  y EDTA, inhiben la actividad enzimática.

<sup>1</sup> Mgr. en Ingeniería de Alimentos

La energía de activación aún no está bien determinada, encontrándose en la literatura valores de 5 a 11 Kcal/mol. La cinética es descrita por el modelo de inhibición por el sustrato alcanzando una velocidad máxima a 200 mM de sustrato.

La enzima dextranasacarasa puede ser producida por dos sistemas: batch y feed batch, siendo el feed batch el sistema que mejor rendimiento produce. La adición de sacarosa puede ser realizada de dos formas: adición de sacarosa combinada con el sistema controlador de pH y adición independiente del pH (alimentación separada de solución de sacarosa en forma continua con una velocidad de 18 g/l.h y alimentación de solución de NaOH de acuerdo al controlador de pH).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 REACTIVOS

El microorganismo usado en las fermentaciones "feed batch", para la producción de la enzima, fue el *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, almacenado a -20°C en solución de glicerol a 10%.

### 2.2 METODOLOGÍA

#### 2.2.1 Medio patrón

Los componentes del medio de patrón fueron diluidos en agua destilada y ajustado el pH a 6,7 con HCl. El fosfato fue diluido separadamente

MEDIO PATRÓN	
COMPONENTES	G/L
Sacarosa	40
Extracto de levadura	20
Sulfato de Magnesio	0,2
Cloruro de sodio	0,01
sulfato de magnesio	0,01
Cloruro de calcio	0,01
TAMPÓN	
Fosfato de potasio dibásico	20

y el pH también fue ajustado a 6.7. Ambas soluciones fueron esterilizadas separadamente a 121°C por 15 min y luego mezcladas en frío.

#### 2.2.2 Inóculo

Se preparó en un Erlenmeyer de 250 ml,

conteniendo 100 de medio patrón estéril y con un tubo de cultura conteniendo el *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, a la temperatura de 27°C, con una agitación de 200 RPM durante 12 horas.

#### 2.2.3 Alimentación

Se utiliza el sistema de alimentación combinada, porque la demanda de sacarosa está asociada al crecimiento y el control de pH es más adecuado. Se prepara 400 ml de sacarosa de 120 a 250 g/l, 100 ml de NaOH 5N y se esterilizan separadamente a 121°C por 15 minutos. Después se mezclan (en frío) para obtener una solución final de 80 a 200 g/l de sacarosa y NaOH 1 N.

#### 2.2.4 Fermentación

Fue utilizado un fermentador de la New Brunswick de 3 litros de capacidad, que contenía 900 ml de medio patrón estéril. Después de adicionar el inóculo, se incubó a la temperatura de 27 a 29°C, con un caudal de aire de 0,5 l/min, una agitación de 200 RPM y con un control de pH en 6.7 ±0,2, mediante la adición de una alimentación de la solución combinada, preparada de acuerdo con el ítem anterior, a través de la acción de una bomba operada por el control automático de pH del fermentador. Al final de la fermentación se regula el pH a 5,2 con HCl y se centrifuga a 10000 RPM a 4°C por 15 minutos con la finalidad de eliminar las células.

#### 2.2.5 Extracción de la Dextranasacarasa

Después de eliminar las células, el caldo es colocado en un baño de hielo y sometido a una ultrafiltración hasta conseguir una concentración aproximada de enzima, 10 veces la concentración inicial. Al concentrado, con agitación y a 4°C, se adiciona lentamente una solución de polietilenglicol 1500 al 50% (PEG 1500), hasta que la solución se torne turbia y luego se centrifuga a 10000 RPM a 4°C y 15 minutos. La fase inferior rica en enzima dextranasacarasa se disuelve en una solución tampón de acetato de sodio 200 mM (pH 5.2 conteniendo 0,5 g/l de cloruro de calcio) y se almacena en frascos a -15°C.

## 2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.3.1 Crecimiento celular

Se determina la concentración celular en el

medio de cultura por el método espectrofotométrico, por la lectura de la absorbancia a 650 nm (utilizando agua destilada para calibrar el espectrofotómetro).

### 2.3.2 Determinación de azúcares reductores (Método de DNS)

#### a) Preparación del reactivo DNS

Se disuelve 10,16 gramos de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en 1416 ml de agua destilada. Se adiciona 7,6 ml de fenol (fundido a 50°C) y 8,32 g de metabisulfito de sodio y se guarda este reactivo en un frasco protegido de la luz. En forma paralela se prepara una solución de tartarato doble de sodio y potasio 11,25 g/l y se guarda en otro frasco.

#### b) Curva patrón

Se prepara soluciones de glucosa, con concentraciones entre 0,1 a 1 g/l de azúcares reductores. Se toma 1 ml de estas concentraciones en tubos de ensayo, 1 ml de reactivo DNS y se coloca en un "baño maría" en ebullición por 5 minutos. Se enfría instantáneamente por la inmersión de los tubos en baño de hielo fundente y enseguida se añade 16 ml de solución de tartarato doble de sodio y potasio para estabilizar el color. Después de homogeneizar los tubos, se lee la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

#### c) Azúcares Reductores Totales

Para determinar azúcares reductores totales, primero debe hacerse la inversión de la sacarosa por hidrólisis ácida. Se mezcla 1 ml de la muestra con 1 ml de HCl 2N y se mantiene durante 5 minutos en "baño maría" en ebullición. Después de enfriar se añade 1 ml de NaOH 2N y luego se procede de la misma forma descrita en la curva patrón.

### 2.3.3 Actividad enzimática

Se determina la actividad de la enzima midiendo la velocidad inicial de producción de fructosa. Se coloca entre 0,1 a 1 ml de solución enzimática, 0,5 ml de tampón acetato 200 mM (pH 5,2 conteniendo 2,5 g/l de  $\text{CaCl}_2$ ) y agua hasta completar 10 ml en un reactor enchaquetado de vidrio. Cuando la solución, agitada magnéticamente, llega a 30°C se agrega 2 ml de solución sacarosa 600 g/l y se va retirando muestras cada 3 minutos,

determinando fructosa por el método de azúcares reductores. La actividad enzimática puede ser determinada por la ecuación:

$$\text{ACT} = \beta \cdot d \cdot 114 \quad (\text{UDS/ml})$$

donde:

$\beta$  : coeficiente de la curva ABS vs tiempo

$\beta$  : coeficiente de la curva patrón de AR

d : volumen de dilución final del reactor.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las fermentaciones "feed batch", con *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, fueron realizadas usando las condiciones dadas en materiales y métodos. Una muestra de los resultados, es presentada en la Tabla N° 1 y en las Figuras Nros. 1, 2, 3 y 4, demostrando que la producción de la enzima dextranasacarasa está asociada al crecimiento celular del *Leuconostoc mesenteroides* y cesa en la fase estacionaria. En la mayoría de las fermentaciones se procede al corte de la alimentación y al control del pH, después de 7 horas de fermentación, en el final de la fase exponencial, con la finalidad de favorecer la producción de la enzima, así como la disminución de la concentración residual de sacarosa.

TABLA N° 1: Rendimiento del proceso de extracción de la Dextranasacarasa

N <sup>a</sup>	ACT UDS/ml	ART g/l	V <sub>i</sub> ml	V <sub>p</sub> ml	ACT UDS/ml	V <sub>f</sub> ml	ACT UDS/ml	R %
1	56,45	2,74	2300	230	309	100	590.1	0,45
1*	31,89	2,74	2300	230	309	100	590.1	0,80
2	63,90	7,00	2500	250	593	100	1285	0,80
3	71,90	16,13	2800	284	491	100	1280	0,64
4	106,18	6,54	2700	261	897	100	2060	0,72
5	66	1,24	2450	220	598	100	1210	0,75

(\*) Actividad después de 6 horas de fermentación.

En la Fig. N° 4, podemos verificar que la actividad llega a 106 UDS/ml y 6,54 g/l de azúcares reductores totales, en contraste con la Fig. N° 1, donde dicha actividad alcanza 56 UDS/ml a las 5 horas de fermentación, cayendo a 32 UDS/ml y 2,74 g/l de azúcares reductores totales, después de casi 6 horas de fermentación. La disminución de la actividad de la enzima, en el final de las fermentaciones, es típica de esta enzima, debido a su baja estabilidad en las

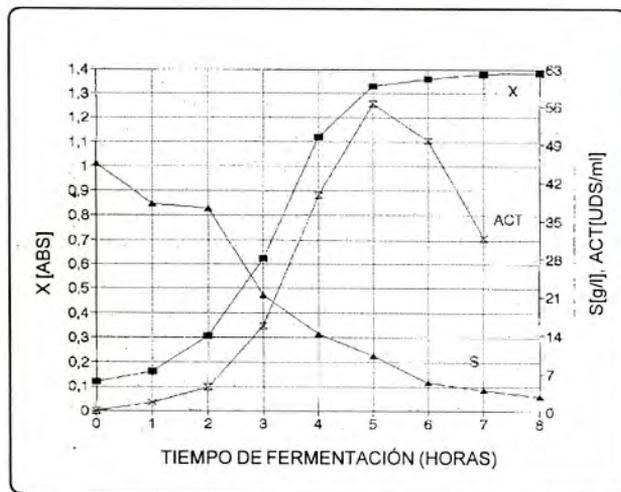
condiciones de fermentación empleadas de temperatura (27 a 29°C) y pH de 6.7

En la Fig. N° 3 se observa que la cantidad de azúcares reductores es de 16.13, lo que significa que habia mucho sustrato en el medio de fermentación, por lo que el caldo fermentado tiene alta viscosidad al producirse dextrana de alto peso molecular en forma paralela, que no permite realizar un buen proceso de ultrafiltración, teniendo que perderse enzima.

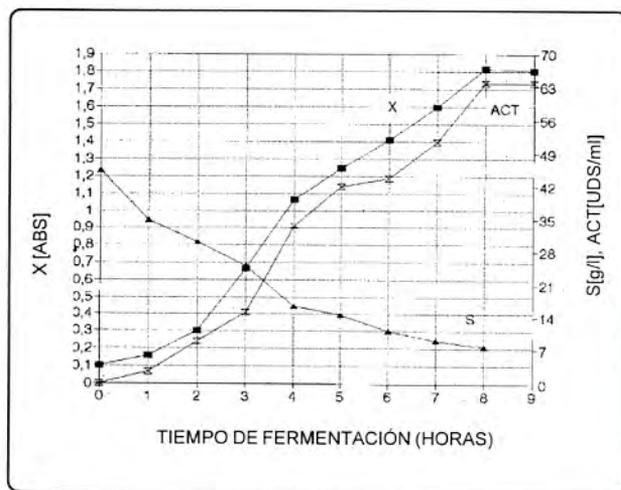
Para la obtención de la enzima con máxima

actividad y cantidades mínimas de azúcares reductores totales en el final de la fermentación, de acuerdo con la Tabla N° 1, la Fig. N° 4, fue el experimento que presentó mejores condiciones para la producción de la enzima dextranasacarasa por fermentación en "feed batch" (sacarosa de 160 g/l, NaOH 1N y una temperatura de 27°C) con mayor actividad enzimática (106 UDS/ml) y menores cantidades de azúcares reductores (6,54 g/l). En vista de estos resultados, se adoptó estas condiciones para la mayor producción de la enzima dextranasacarasa.

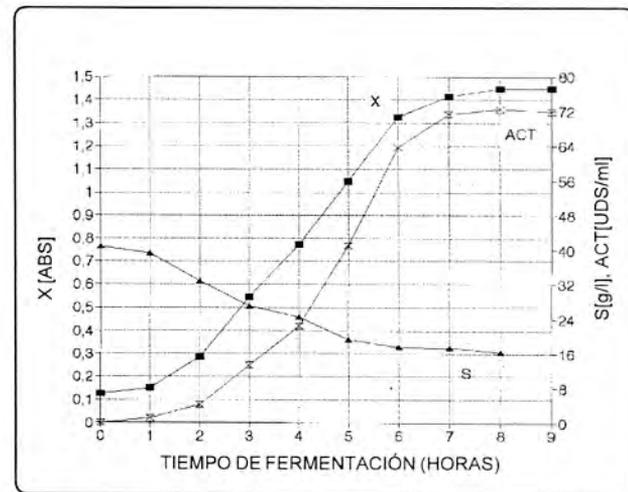
**FIGURAN° 1:** Fermentación "feed batch" del *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, con una alimentación de 80 g/l de sacarosa y una temperatura de 28°C.



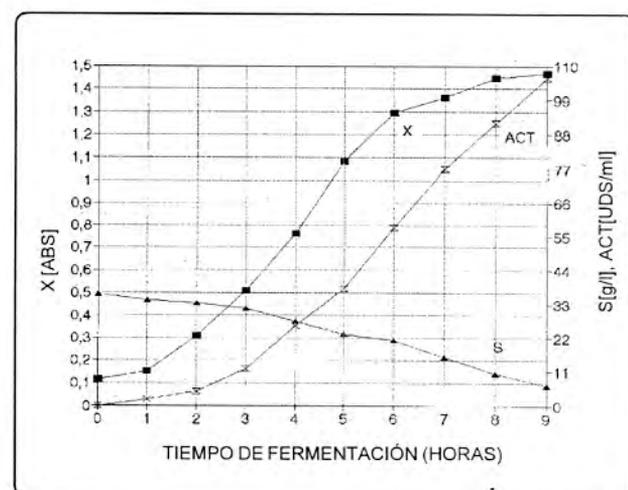
**FIGURAN° 2:** Fermentación "feed batch" del *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, con una alimentación de 160 g/l de sacarosa y una temperatura de 28°C.



**FIGURAN° 3:** Fermentación "feed batch" del *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, con una alimentación de 160 g/l de sacarosa y una temperatura de 29°C.



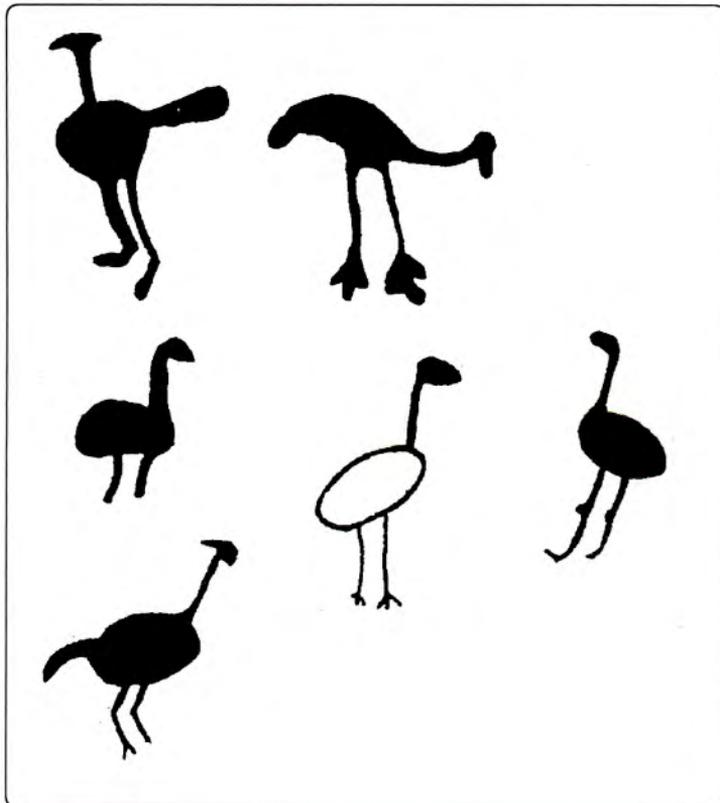
**FIGURAN° 4:** Fermentación "feed batch" del *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512-F, con una alimentación de 160 g/l de sacarosa y una temperatura de 27°C.



#### IV. BIBLIOGRAFÍA

- ALSOP, L. **Industrial productions o dextran**. *Progress. Ind. Microbiology*. 18: 1-44, 1983.
- BARKER, T.P. **The Production of the enzyme dextranucrase using nonaerated fermentations techniques**. *Biotechnol. Bioeng.* 37 703-707, 1991.
- BINDER, T.P. & ROBYT, J.F. **P-nitrophenyl $\alpha$ -D-glucopyranoside a new substrate for glucansucrases**. *Carbohydr. Res.* 124: 287-299, 1983.

- HEHRE, H.J. **Studies of the enzymatic syntesis of dextran from sucrose**. *J.Biol. chem.* 163: 221-223, 1946.
- VILOCHE, J.H. **Estudio de producción enzimática de Dextrana Clínica**, Campinas - Sao Paulo, 1993. Tesis de Maestria-Facultad de Ingenieria de Alimentos de la Universidad de Campinas - Brazil.



Suris