

INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA DEXTRANSUCRASA POR ENLACE COVALENTE MULTIPUNTUAL

Liuba Domínguez¹, Georgina Michelena², José Luis Martínez¹, Emilia Carrera², (1)Centro de Ingeniería de Procesos, Fac. de Ingeniería Química, ISPJAE. Ciudad de la Habana, Cuba. Fax: (537) 267 29 64. e-mail: liuba@tesla.ispjae.edu.cu. (2) ICIDCA, Dpto. Bioingeniería, P.O. Box 4026, e - mail: miche@icidca.edu.cu.

Palabras claves: *inmovilización, dextransucrasa, dextrana*

Introducción. La inmovilización por enlace covalente multipuntual ayuda a la formación del enlace enzima-soporte por la disminución de impedimentos estéricos en el sistema. Con este método se activan grupos funcionales convenientes para la reacción con la enzima, existiendo una mayor cantidad de enlaces entre la enzima y el soporte, y por tanto, aumentando la estabilidad del sistema. El objetivo del trabajo es obtener un derivado enzimático con alta actividad dextransucrasa, evaluando varios soportes para la selección del mejor sistema. Además, hacer un estudio cinético del derivado enzimático y evaluar la estabilidad térmica de éste.

Metodología. Se obtuvo la enzima dextransucrasa a partir de un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* y se purificó con Polietilenglicol 4000 (15 %). Se inmovilizó la enzima en 4 soportes: agarosa, sepharosa, sílica gel y biogel. Se procedió a inmovilizar por el método de Guisán con algunas variaciones (1, 2). Para la determinación de la cinética enzimática de la enzima libre e inmovilizada, se prepararon soluciones de sacarosa al 10, 15 y 20 %. Cada 10 minutos se tomó muestra y se midió la concentración de azúcares reductores por el método del DNS. Para la determinación de la estabilidad térmica se determinó la actividad enzimática residual en el tiempo, cambiando las temperaturas de operación (30, 40 y 50 °C)(2).

Resultados y discusión. La enzima semi-purificada se inmovilizó en los 4 soportes en una reacción de 5 horas donde se obtuvo el comportamiento que se muestra en la figura 1.

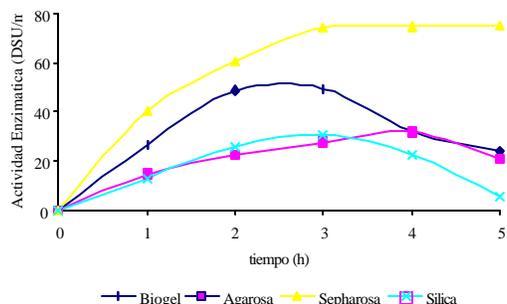


Fig. 1. Comportamiento de la actividad enzimática en el tiempo.

Como se observa el derivado sepharosa-dextransucrasa retuvo la mayor actividad, y por lo tanto el mejor factor de inmovilización (62,8 %). El problema más grave de la inmovilización de enzimas está en la inactivación que sufren, por los cambios estructurales que en ella ocurren.

Se pudo observar una constancia de la actividad enzimática en el sobrenadante durante el tiempo de inmovilización, demostrando que la enzima no se inactivó, sino que los geles llegaron a su máxima capacidad de carga efectiva.

La Fig. 2 muestra el ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten por el método del doble recíproco.

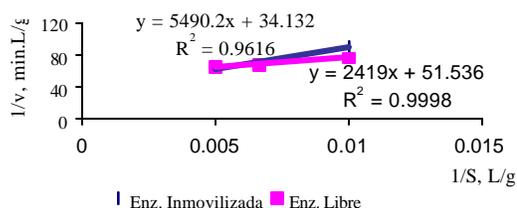


Fig. 2. Ajuste de las constantes de Michaelis-Menten por el método del doble recíproco.

En este caso, la K_m de la enzima libre fue 3,4 veces menor que la de la inmovilizada. Esto se debe a que la inmovilización de la enzima incorpora una resistencia adicional a la ocurrencia de la reacción enzimática.

La estabilidad térmica fue disminuyendo al aumentar la temperatura, pero disminuyó la actividad más velozmente para la enzima libre que para la inmovilizada. Los tiempos de vida medio a 50 °C fueron de 26,2 y 115,1 minutos respectivamente. El ajuste de la ecuación de Arrhenius en el rango de temperatura de 30 a 50 °C, mostró energías de activación de 25,81 y 18,39 kcal/mol para la enzima libre e inmovilizada respectivamente.

Conclusiones. El mejor factor de inmovilización se obtuvo en el derivado sepharosa-dextransucrasa con un 62,8 % de retención de la actividad enzimática. En el ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten se obtuvo que la K_m fue 3,4 veces más alta para la enzima inmovilizada que para la libre. El estudio de termoestabilidad demostró una mayor resistencia térmica para la enzima inmovilizada.

Bibliografía.

- Guisán, J. M. (1988) *Enz. Microb. Technol* (10), 357-382
- Domínguez, L. (2000). Tesis de Diploma. Fac. Química, ISPJAE.