

Universidad de la República

Facultad de Química-PEDECIBA Química

Tesis de Doctorado en Química

**DESARROLLO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS EN FASE
SÓLIDA PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN DE
LACTOSA DE SUEROS DE QUESERÍA**

Lic. Pedro Torres

Director Académico y Director de Tesis:

Prof. Francisco Batista Viera

Cátedra de Bioquímica-Departamento de Biociencias

Montevideo, Uruguay

2012

Agradecimientos

Al Prof. Batista, por su muy valiosa orientación y consejos en el terreno académico, su gran generosidad y la inquebrantable paciencia que ha tenido para conmigo en el trabajo diario.

A las Dras. Cantera, Coppes, Brena, Franco Fraguas, Manta, Ovsejevi, Giacomini e Irazoqui, por sus diversos aportes a mi formación, su disposición de siempre a orientarme en las tareas del laboratorio y el uso de equipos y técnicas, y el buen talante con que han perdonado a menudo mis errores.

También agradezco por todo lo anterior a la Q.F. Barros y la Dra. González, y además por ser de una u otra manera compañeras de ruta durante un tiempo, compartir con alegría mis buenos resultados, y contenerme en los malos momentos, tanto en lo profesional como en lo personal.

A todos los demás miembros de la Cátedra de Bioquímica, por su calidez de siempre.

A los Dres. Rubiolo y Mammarella, de la Universidad Nacional del Litoral, por considerarme más como un miembro local de su equipo de trabajo que como un pasante extranjero.

A todos los integrantes del Grupo de Tecnología de los Alimentos y Biotecnología del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, en especial al Lic. Manzo y la Dra. Regenhardt, quienes han cooperado en distintas etapas de este trabajo.

A las compañías CONAPROLE, Daiwa Kasei, Genencor, Resindion y Röhm Pharma, por el generoso suministro de sueros, enzimas y soportes de inmovilización utilizados.

A PEDECIBA-Química, el Sistema Nacional de Becas (SNB, ANII) y CSIC por las diferentes becas de posgrado, maestría y doctorado que facilitaron la realización de esta Tesis, al programa CYTED y la DICYT (MEC) por el apoyo económico para realizar las pasantías incluidas en el programa académico.

A mi familia, en especial a mis padres Elsa y Pedro, por confiar en la educación como legado, por inculcarme la libertad de pensamiento y por el afecto incondicional de toda la vida.

Índice General

1. Introducción.....	17
1.1. Enzimas.....	17
1.2. Inmovilización.....	18
1.3. Soportes acrílicos epoxi-activados.....	21
1.4. Procesamiento de lactosuero.....	27
1.5. β -Galactosidasa.....	28
1.6. D-Tagatosa.....	32
1.7. L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	35
1.8. D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.....	39
2. Objetivos.....	47
3. Estrategias de Investigación.....	49
4. Materiales y Métodos.....	52
4.1. Materiales.....	52
4.2. Cultivo de microorganismos y preparación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	52
4.2.1. Producción de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	52
4.2.2. Purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	53
4.3. Acondicionamiento de enzimas solubles.....	55
4.3.1. β -Galactosidasa.....	55
4.3.2. D-xilosa isomerasa.....	56
4.3.3. L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	56
4.4. Inmovilización.....	56
4.4.1. Eupergit C y Eupergit C 250 L.....	56
4.4.2. Sepabeads EC-EP.....	57
4.4.3. Sepabeads EC-HFA.....	57
4.4.4. Parámetros de inmovilización.....	57
4.4.5. Estabilización térmica.....	58
4.5. Propiedades de los derivados insolubles.....	59
4.5.1. pH óptimo y estabilidad frente al pH.....	59
4.5.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad.....	59
4.5.3. Estabilidad térmica.....	59
4.5.4. Efecto de cationes sobre la actividad enzimática.....	60

4.5.5. Determinación de parámetros cinéticos.....	60
4.6. Aplicaciones.....	60
4.6.1. Desmineralización de lactosuero.....	60
4.6.2. Lactolisis.....	61
4.6.3. Isomerización de sueros lactosa-hidrolizados (procesos secuenciales).....	62
4.6.4. Lactolisis e isomerización conjuntas (procesos simultáneos).....	63
4.7. Métodos analíticos.....	63
4.7.1. Determinación de calcio.....	64
4.7.2. Determinación de glucosa.....	64
4.7.3. Determinación de cetohexosas totales (fructosa, tagatosa).....	64
4.7.4. Análisis de carbohidratos por HPLC.....	65
4.7.5. Cálculo de productividad.....	65
4.7.6. Determinación de proteínas.....	65
4.7.7. Ensayos de actividad.....	66
4.7.8. Determinación de grupos epóxido.....	67
4.7.9. Electroforesis.....	67
4.7.10. Espectrometría de masas.....	68
5. Resultados y Discusión.....	69
5.1. Inmovilización/estabilización de β -Galactosidasa.....	70
5.1.1. Inmovilización de β -Galactosidasa.....	70
5.1.2. Caracterización de los derivados obtenidos.....	84
5.1.3. Aplicaciones.....	98
5.2. Producción y purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	114
5.2.1. Producción de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y preparación del extracto crudo.....	114
5.2.2. Purificación.....	115
5.2.3. Espectrometría de masas.....	122
5.2.4. Caracterización de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa nativa.....	122
5.3. Inmovilización/estabilización de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	126
5.3.1. Caracterización de los derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.....	127
5.3.2. Isomerización de D-galactosa.....	133
5.3.3. Biotransformación de lactosa.....	134
5.4. Inmovilización/estabilización de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.....	144
5.4.1. Caracterización de los derivados de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.....	146

5.4.2. Biotransformación de lactosa.....	149
5.5. Sistema trienzimático.....	160
5.5.1. Inmovilización/estabilización de derivados trienzimáticos.....	161
5.5.2. Biotransformación de lactosa.....	162
5.5.3. Entrampamiento y uso en sistemas de lecho fijo.....	169
6. Conclusiones.....	173
7. Futuras perspectivas.....	178

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Algunas aplicaciones industriales de las enzimas.	17
Tabla 1.2. Características generales de tres soportes acrílicos epoxi-activados disponibles comercialmente.	23
Tabla 1.3. Algunos microorganismos productores de β -galactosidasa.	29
Tabla 1.4. Algunos soportes reportados para la inmovilización de β -galactosidasas.	30
Tabla 1.5. Poder edulcorante relativo de una selección de carbohidratos.	33
Tabla 1.6. Algunos microorganismos productores de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	36
Tabla 1.7. Propiedades bioquímicas de algunas L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas.	39
Tabla 1.8. Influencia de la temperatura sobre el equilibrio en la reacción de isomerización D-galactosa/D-tagatosa catalizada enzimáticamente.	39
Tabla 1.9. Influencia de la temperatura sobre el equilibrio de la reacción de isomerización D-glucosa/D-fructosa catalizada enzimáticamente.	42
Tabla 1.10. Algunas fuentes de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.	43
Tabla 1.11. Cultivo de algunos productores de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	45
Tabla 1.12. Condiciones óptimas para algunas D-xilosa (D-glucosa) isomerasas.	46
Tabla 1.13. Métodos empleados para la inmovilización de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa comercial.	46
Tabla 5.1. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa a carga aplicada de 30 mg/g de gel.	71
Tabla 5.2. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa a distintas cargas aplicadas.	72
Tabla 5.3. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads HFA a carga aplicada de 15 mg/g de gel.	73
Tabla 5.4. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa en Eupergit C 250 L a carga aplicada de 30 mg/g de gel.	74
Tabla 5.5. Influencia de la carga enzimática sobre la inmovilización de β -galactosidasa.	76
Tabla 5.6. Cinética de inmovilización de β -galactosidasa en función de la carga enzimática aplicada.	79
Tabla 5.7. Influencia de la carga enzimática aplicada sobre la inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads HFA.	80

Tabla 5.8. Dos protocolos alternativos para la inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads HFA.	82
Tabla 5.9. Condiciones óptimas para la inmovilización de β -galactosidasa a 25°C.	83
Tabla 5.10. Efecto de tioles y glicina sobre la actividad de β -galactosidasa.	87
Tabla 5.11. Termoestabilidad de los derivados de β -galactosidasa a 50°C en función de la carga enzimática y la extensión del tratamiento alcalino post-inmovilización.	90
Tabla 5.12. Constantes cinéticas de β -galactosidasa soluble y sus derivados en Eupergit C y Sepabeads EP para lactosa como sustrato.	96
Tabla 5.13. Porcentajes de lactolisis alcanzados operando en modo continuo a pH 6.0 en función del derivado utilizado, el sustrato y la temperatura.	102
Tabla 5.14. Efecto de agentes sanitizantes sobre la actividad de los derivados en Eupergit C.	104
Tabla 5.15. Etapas en la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa por intercambio iónico (Protocolo 1) y cromatografía de afinidad (Protocolo 2).	117
Tabla 5.16. Efecto de diferentes iones metálicos a una concentración 1 mM sobre la actividad L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa a 50 °C y pH 7.0.	124
Tabla 5.17. Inmovilización y estabilización de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L.	126
Tabla 5.18. Constantes cinéticas de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa soluble y sus derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L.	132
Tabla 5.19. Influencia de la temperatura sobre el equilibrio en la reacción de isomerización D-galactosa/D-tagatosa catalizada por L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa a pH 7.0 y 7.5.	133
Tabla 5.20. Inmovilización y estabilización de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L.	143
Tabla 5.21. Constantes cinéticas de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa soluble y sus derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L.	147
Tabla 5.22. Influencia de la temperatura sobre el equilibrio en la reacción de isomerización D-glucosa/D-fructosa catalizada por D-xilosa (D-glucosa) isomerasa a pH 7.0.	150
Tabla 5.23. Coinmovilización y estabilización de enzimas en Eupergit C 250 L.	160
Tabla 5.24. Influencia de la temperatura de operación sobre la composición de los jarabes obtenidos a partir del tratamiento de suero de Mozzarella con derivado trienzimático.	161
Tabla 5.25. Cinética del proceso simultáneo de biotransformación de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con enzimas inmovilizadas.	162
Tabla 5.26. Desmineralización de lactosueros de queso Mozzarella, Goya y Manchego y nanofiltrados de suero con CM-aspártico-agarosa.	166

Índice de Figuras

Figura 1.1. Métodos de inmovilización de enzimas: métodos químicos y métodos físicos.	20
Figura 1.2. Estructuras de tres resinas acrílicas epoxi-activadas comerciales.	22
Figura 1.3. Mecanismo de inmovilización de proteínas, a pH próximos a la neutralidad y temperaturas moderadas, en soportes acrílicos epoxi-activados.	24
Figura 1.4. Inmovilización covalente de enzimas sobre soportes amino-epóxido con una pequeña proporción de grupos amino.	25
Figura 1.5. Inmovilización en soportes epoxi-amino con una proporción 1:1 de grupos amino.	26
Figura 1.6. Lactosuero, un coproducto de la industria quesera.	27
Figura 1.7. Hidrólisis de lactosa.	29
Figura 1.8. Izumoring: mapa de las transformaciones posibles entre hexosas abundantes y raras.	33
Figura 1.9. <i>Sterculia setigera</i> .	34
Figura 1.10. Isomerización de L-arabinosa y D-galactosa por L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	37
Figura 1.11. Estructura tridimensional de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de <i>E. coli</i> .	38
Figura 1.12. Reacciones catalizadas por la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.	40
Figura 1.13. Estructura de la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> .	42
Figura 1.14. Los procesos industriales en los cuales se emplea la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.	42
Figura 3.1. Esquema general del proceso trienzimático planteado.	50
Figura 3.2. Estrategias de estabilización térmica y operacional utilizadas en este trabajo.	52
Figura 4.1. Procedimientos para la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	56
Figura 4.2. Métodos analíticos empleados en este trabajo.	64
Figura 4.3. Actividades específicas en el marco de este trabajo.	69
Figura 5.1. Cinética de inmovilización en Sepabeads EP a carga aplicada de 3 mg/g de gel y 120 mg/g de gel.	79
Figura 5.2. Cinética de inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads HFA a pH 7.5 y 8.5.	81
Figura 5.3. Cinética de inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads HFA (Protocolo 2).	83
Figura 5.4. Efecto del pH sobre la estabilidad de β -galactosidasa y sus derivados.	85
Figura 5.5. Estabilidad térmica a 50°C (32 horas de exposición) de derivados obtenidos a cargas baja (3 mg/g de gel), media (30 mg/g de gel) y alta (120 mg/g de gel).	87
Figura 5.6. Influencia del bloqueo en la estabilidad térmica.	88

Figura 5.7. Influencia del bloqueo y naturaleza del agente bloqueante en la estabilidad térmica de los derivados β -galactosidasa-Sepabeads EP y β -galactosidasa-Eupergit C.	88
Figura 5.8. Estrategias de estabilización post-inmovilización.	91
Figura 5.9. Estabilidad térmica de los derivados de β -galactosidasa a 50°C.	92
Figura 5.10. Efecto esperado de la duración del tratamiento alcalino sobre el proceso de unión multipuntual.	94
Figura 5.11. Efecto de galactosa y glucosa sobre la actividad de derivados en Eupergit C.	97
Figura 5.12. Efecto de iones metálicos sobre la actividad lactasa de la enzima soluble y de sus derivados.	98
Figura 5.13. Grados de lactolisis alcanzados en 3 h en procesos en batch a 25°C, con β -galactosidasa soluble e inmovilizada.	99
Figura 5.14. Lactolisis a 50°C con β -galactosidasa soluble e inmovilizada.	100
Figura 5.15. Reuso de los derivados de β -galactosidasa en procesos en batch con suero de Mozzarella.	100
Figura 5.16. Actividades residuales de los derivados de β -galactosidasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L al cabo de sucesivos usos.	101
Figura 5.17. Reuso de los derivados de β -galactosidasa en procesos en columna con suero de Mozzarella como sustrato.	102
Figura 5.18. Lactolisis de suero de queso Mozzarella con derivado β -galactosidasa-Eupergit C para distintas relaciones derivado/sustrato.	103
Figura 5.19. Microscopía electrónica de barrido del biocatalizador β -galactosidasa-Eupergit C atrapado en alginato de calcio.	107
Figura 5.20. Entrampamiento de derivados en partículas de alginato de calcio.	107
Figura 5.21. Microscopía electrónica de barrido del biocatalizador β -galactosidasa-Eupergit C atrapado en alginato de calcio luego del uso con lactosa y permeado de lactosuero.	111
Figura 5.22. Comparación de los resultados obtenidos con el derivado β -galactosidasa-Eupergit C libre y atrapado utilizado sobre diferentes sustratos.	112
Figura 5.23. Estructura de las resinas de intercambio utilizadas.	116
Fig. 5.24. Diagrama de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharose en modo continuo.	118
Fig. 5.25. PAGE-SDS de diferentes fracciones.	118
Figura 5.26. Síntesis del bioadsorbente L-arabitol-agarosa. Procedimiento general y representación esquemática de las reacciones.	120

Figura 5.27. Diagrama de elución correspondiente a la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa por cromatografía de afinidad (Protocolo 2).	120
Figura 5.28. Monitoreo de la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	121
Fig. 5.29. Efecto de la temperatura sobre la actividad de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	122
Fig. 5.30. Efecto del pH sobre la actividad de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	123
Fig. 5.31. Efecto de diferentes concentraciones de Mn^{2+} sobre la actividad de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	124
Figura 5.32. Efecto del pH sobre la actividad de LAI y sus derivados.	127
Figura 5.33. Efecto del pH sobre la estabilidad de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y sus derivados (24 horas de exposición).	128
Figura 5.34. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	128
Figura 5.35. Estabilidad térmica (30 h de exposición a 60°C) de los derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L.	129
Figura 5.36. Uso de derivados de β -galactosidasa y derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en procesos bi-reactor.	133
Figura 5.37. Hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con β -galactosidasa soluble y posterior isomerización de galactosa.	134
Figura 5.38. Hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con β -galactosidasa y posterior isomerización de galactosa (enzimas inmovilizadas).	135
Figura 5.39. Porcentajes de conversión alcanzados durante las reacciones de lactólisis e isomerización secuenciales (400 minutos de reacción) a distintas temperaturas.	136
Figura 5.40. Hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con β -galactosidasa inmovilizada y posterior isomerización de galactosa en ausencia o presencia de ésta.	137
Figura 5.41. Uso de derivados de β -galactosidasa y de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en procesos mono-reactor.	137
Figura 5.42. Procesos simultáneos mono-reactor de hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con β -galactosidasa e isomerización de galactosa.	138
Figura 5.43. Procesos simultáneos mono-reactor de hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con β -galactosidasa soluble e isomerización de galactosa.	139
Figura 5.44. Uso de β -galactosidasa y LAI coinmovilizadas.	140

Figura 5.45. Operación de sistemas secuenciales (bi-reactor) y simultáneos (mono-reactor) con β -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.	140
Figura 5.46. Comparación de velocidades para procesos simultáneos con enzimas inmovilizadas individualmente y simultáneos con enzimas coinmovilizadas.	141
Figura 5.47. Niveles de conversión (en términos de lactolisis e isomerización) y productividades (en términos de tagatosa) alcanzados con sistemas mono-reactor.	141
Figura 5.48. Reuso en reactores en batch a 50°C.	142
Figura 5.49. Efecto del pH sobre la actividad de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y sus derivados.	144
Figura 5.50. Efecto del pH sobre la estabilidad de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y sus derivados.	145
Figura 5.51. Isomerización a 50°C por medio de derivado IGI de sueros de queso Pratto y Mozzarella lactosa-hidrolizados.	149
Figura 5.52. Reusos a 50°C de derivados IGI con suero de Mozzarella lactosa-hidrolizado como sustrato.	149
Figura 5.53. Efecto de la relación derivado-sustrato utilizada.	149
Figura 5.54. Efecto de la temperatura sobre la isomerización de D-glucosa catalizada por D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (derivado GI-Eupergit C 250 L).	150
Figura 5.55. Uso de derivados de β -galactosidasa y de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en procesos bi-reactor.	151
Figura 5.56. Proceso secuencial de lactolisis y posterior isomerización de suero de queso Mozzarella.	152
Figura 5.57. Niveles de isomerización de D-glucosa alcanzados en procesos secuenciales con suero de Mozzarella lactosa-hidrolizado como sustrato.	154
Figura 5.58. Uso de derivados de β -galactosidasa y de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en procesos mono-reactor.	155
Figura 5.59. Procesamiento secuencial y simultáneo de sueros de queso Mozzarella y Manchego con derivados de β -galactosidasa y de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.	156
Figura 5.60. Uso de β -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa coinmovilizadas en procesos mono-reactor.	157
Figura 5.61. Reuso de los derivados D-xilosa (D-glucosa) isomerasa-Eupergit C 250 L y β -galactosidasa-D-xilosa (D-glucosa) isomerasa-Eupergit C 250 L.	158
Figura 5.62. Efecto de distintas concentraciones de Ca^{2+} sobre la isomerización	159

Figura 5.63. Biotransformaciones de la lactosa del suero de quesería.	160
Figura 5.64. Productividades de los sistemas trienzimáticos coinmovilizados, estabilizados y sin estabilizar, y composición de los jarabes luego del sexto ciclo.	162
Figura 5.65. Operación de sistemas mono-reactor con β -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.	164
Figura 5.66. Lactolisis de nanofiltrado a 50°C con derivado β -galactosidasa-Eupergit C.	165
Figura 5.67. Perspectiva de los procesos de desmineralización y tratamientos enzimáticos empleados en este trabajo.	166
Figura 5.68. Lactolisis e isomerización de glucosa y galactosa de nanofiltrado desmineralizado con derivado β -galactosidasa-LAI-GI-Eupergit C 250 L.	168
Figura 5.69. Lactolisis e isomerización de glucosa y galactosa de nanofiltrado desmineralizado y sin desmineralizar.	168
Figura 5.70. Reactor tubular con camisa calefactora operando en la modalidad de lecho fijo con derivado trienzimático.	169
Figura 5.71. Operación de un reactor de lecho fijo con derivados trienzimáticos entrampados	170
Figura 5.72. Operación de un reactor de lecho fijo con derivado trienzimático coinmovilizado y entrampado con nanofiltrado como sustrato.	171

Abreviaturas utilizadas

BCA- Ácido bicinconínico.

CM-Asp- Carboximetil-aspártico-agarosa.

CPC- Cerámica de poro controlado.

GOS- Galactooligosacáridos.

IGI- D-xilosa (D-glucosa) isomerasa inmovilizada

LAI- L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa

PEI- Polietilenimina.

SD- Desviación estándar.

Resumen

La utilización de coproductos derivados de diversos procesos industriales, ha sido el foco de múltiples investigaciones en las últimas décadas. El desarrollo de biocatalizadores estabilizados en fase sólida mediante estrategias de inmovilización y estabilización ha dado origen a numerosas aplicaciones en este campo.

El propósito central de este trabajo ha sido el desarrollo y caracterización de nuevos biocatalizadores inmovilizados y el estudio de sus aplicaciones para la biotransformación de la lactosa (uno de los mayores componentes del suero de quesería) en los monosacáridos tagatosa y fructosa, de gran interés por sus propiedades edulcorantes. Para ello, se desarrolló un sistema trienzimático basado en la inmovilización de las enzimas β -galactosidasa de *Bacillus circulans*, D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de *Streptomyces rubiginosus* y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 en resinas acrílicas epoxi-activadas. Este sistema enzimático permitió transformar la lactosa presente en sueros de quesería en azúcares de mayor poder edulcorante (fructosa y tagatosa). La fructosa posee un poder edulcorante superior al de la glucosa y sacarosa, en tanto la tagatosa, azúcar hipocalórico y con propiedades prebióticas, puede a su vez utilizarse como sustituto de la sacarosa. El producto resultante de esta biotransformación podría resultar de interés para diversas aplicaciones en la industria alimentaria.

Si bien las enzimas β -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa utilizadas se encuentran disponibles comercialmente, en el caso de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa la misma fue producida y purificada en el marco de este trabajo mediante precipitación salina seguida de cromatografía de afinidad en el bioadsorbente L-arabitol-agarosa.

Se investigó el proceso de inmovilización covalente de la β -galactosidasa de *Bacillus circulans* en resinas acrílicas epoxi-activadas convencionales (Sepabeads EP, Eupergit C, Eupergit C 250 L) y heterobifuncionales (Sepabeads HFA). Se evaluó la influencia sobre el proceso de inmovilización de los siguientes parámetros: tiempo de incubación, pH, fuerza iónica, carga enzimática aplicada y relación enzima-soporte. En base al comportamiento de los parámetros de inmovilización y a las posibilidades de estabilización térmica de los derivados de β -galactosidasa, se seleccionaron aquellos en Eupergit C y Eupergit C 250 L para su aplicación en procesos de lactólisis con lactosueros. Asimismo se seleccionaron estos soportes para la inmovilización de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.

Se estudiaron tres estrategias para la estabilización térmica y mecánica de los biocatalizadores obtenidos: tratamiento alcalino post-inmovilización, bloqueo de grupos reactivos remanentes, y entrapado de los derivados en perlas de alginato de calcio. La reducción de la

eficiencia de inmovilización como consecuencia de la incubación alcalina se vio compensada por una ganancia significativa en estabilidad. El entrapamiento en alginato no generó retardos difusionales, mostrando los derivados buena estabilidad mecánica en las condiciones de operación. El entrapado evita la pérdida que resultaría del entrapamiento de las enzimas libres directamente en alginato, así como los inconvenientes relacionados con el reducido tamaño de las partículas acrílicas utilizadas en su inmovilización. La estabilización térmica de los derivados permitió trabajar a 50°C, alcanzando mayores niveles de conversión en las reacciones de hidrólisis de lactosa e isomerización de los productos.

Los sistemas bienzimáticos en base a β -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y β -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa mostraron una reducción en los niveles de inhibición de la actividad lactásica por galactosa y glucosa, respectivamente. La coinmovilización y estabilización de las tres enzimas en una misma partícula, permitió obtener rendimientos y eficiencias de inmovilización comparables a los alcanzados para la inmovilización de cada una de las enzimas por separado. Como consecuencia del proceso de inmovilización-estabilización se alcanzaron a su vez estabilidades térmicas similares a los derivados monoenzimáticos de cada una de las enzimas consideradas. Comparativamente, el sistema trienzimático coinmovilizado demostró ventajas con respecto a la operación con mezclas de enzimas solubles o derivados inmovilizados individualmente. Por un lado, los derivados inmovilizados son térmicamente más estables que las enzimas libres. Por otra parte el sistema coinmovilizado llevó a cabo la bioconversión en menor tiempo que el requerido por la mezcla de derivados individuales. El consumo de galactosa y glucosa por parte de las actividades de las correspondientes cetoisomerasas llevó a una reducción en el grado de inhibición por producto de la β -galactosidasa. De esta manera se logró alcanzar la hidrólisis completa de lactosa en sueros de quesería y altos valores de conversión en nanofiltrados desmineralizados, permitiendo de este modo aumentar los niveles de conversión en términos de cetohehexosas, demostrando la eficacia del sistema desarrollado, la cual se evidencia en los niveles de productividad alcanzados.

1. Introducción

1.1. Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos caracterizados por su alta especificidad y gran poder catalítico, capaces de operar en condiciones moderadas. Por ello desde 1970 ha habido un creciente interés en desarrollos tecnológicos que involucran a las enzimas, y se ha generalizado su uso en distintos procesos en la industria (Tabla 1.1). Pero a diferencia de otros catalizadores, las enzimas requieren condiciones suaves de reacción, las cuales son necesarias debido a su limitada estabilidad (Klibanov y Ahern, 1987; Thompson et al., 1998). No obstante, el uso de enzimas presenta ventajas comparado con los procesos químicos convencionales (Saibi et al., 2012; Fernandes, 2010), en particular en las industrias de alimentos y farmacéutica (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Algunas aplicaciones industriales de las enzimas (Wiseman, 1995)

Enzima	Fuente	Aplicación
Alanina deshidrogenasa	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Candida boidinii</i>	Formación de alanina a partir de piruvato
Aminoacilasa	<i>Escherichia coli</i>	Resolución de mezclas racémicas de L-acetil aminoácidos
Aspartato decarboxilasa	<i>Pseudomonas dacunhae</i>	Producción de alanina
α -Amilasa	Numerosas bacterias y hongos	Tratamiento de almidón
Amiloglucosidasa	<i>Aspergillus niger</i> , <i>awamori</i> y <i>oryzae</i>	Tratamiento de almidón
Catalasa	<i>Aspergillus niger</i>	Remoción de H ₂ O ₂ en leche, queso y huevos.
Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Procesamiento de frutas y vegetales
Ciclodextrin-glucosil transferasa	<i>Bacillus macerans</i> y <i>megaterium</i>	Formación de dextrinas cíclicas
Epoxisuccinato hidrolasa	<i>Nocardia tartarices</i>	Formación de ácido tartárico
α -Galactosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Hidrólisis de oligosacáridos durante el refinado de azúcar
β -Galactosidasa	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Kluyveromyces</i> spp.	Hidrólisis de lactosa en leche y productos lácteos
β -Glucanasa	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>circulans</i>	Hidrólisis de polisacáridos durante la extracción de jugo de fruta
Glucosa isomerasa	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Isomerización de glucosa en jarabes de fructosa
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Antioxidante
Inulinasa	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Producción de edulcorantes
Isomaltulosa sintasa	<i>Erwinia rhaponticii</i> y <i>Protaminobacter rubrum</i>	Formación de isomaltulosa
Penicilanasas	<i>Bacillus licheniformis</i> y <i>cereus</i>	Remoción de antibióticos de leche
Proteasas	Diversas fuentes vegetales, animales y microbianas	Producción de extractos de levadura, procesamiento de cueros, quesos, y otros alimentos, detergentes
Pululanasa	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Procesamiento de almidón

En las últimas décadas se han desarrollado múltiples procesos biocatalíticos para la transformación de matrices no explotadas tradicionalmente, conteniendo principalmente almidón, lactosa, celulosa, y en menor medida hemicelulosa y lignina. El desarrollo de estos nuevos procesos

hizo necesario el diseño de estrategias experimentales adecuadas para llevarlos a cabo de manera eficaz.

Se considera a los procesos de inmovilización de enzimas como una estrategia muy promisoría para la implementación de procesos eficaces de biotransformación (Mateo et al., 2007a).

1.2. Inmovilización

Una enzima inmovilizada es un biocatalizador que ha sido confinado en una región definida del espacio, mediante la unión a un soporte insoluble, atrapado o entrecruzamiento, con retención de su actividad catalítica (Katchalski-Katzir, 1993).

El empleo de enzimas inmovilizadas ofrece algunas ventajas, entre ellas la factibilidad de utilizarlas repetidamente, en algunos casos mejorar su estabilidad, reducir el tiempo de reacción mediante la utilización de concentraciones elevadas de enzima, tratar grandes cantidades de sustrato en instalaciones más pequeñas, y obtener el producto final libre de enzima (Sheldon, 2007; Wang et al., 2011).

A menudo los cambios que ocurren en las propiedades de una enzima cuando se la inmoviliza pueden ser ventajosos. La inmovilización es una estrategia de gran valor que mejora la estabilidad y la manipulación de las enzimas, reduciendo costos en procesos a gran escala debido a la estabilidad operacional de los derivados, siendo una herramienta fundamental para el diseño de biotransformaciones, incluso a escala industrial.

Sin embargo, la selección de un sistema enzimático inmovilizado para su aplicación a procesos biotecnológicos debe llenar requisitos en términos de actividad, estabilidad y pH óptimo.

En muchos procesos industriales las condiciones operativas no son adecuadas para las enzimas solubles, que pueden desnaturalizarse debido a efectos mecánicos y del solvente. La recuperación de las enzimas de la mezcla de reacción es dificultosa y a menudo imposible (Sheldon, 2007). La inmovilización de enzimas representa la solución a algunos de estos problemas. En particular permite el uso del derivado enzimático por más de un ciclo, hace posible detener la reacción rápidamente por remoción del derivado de la mezcla de reacción o viceversa, eliminando la contaminación del producto con la enzima, y sin requerir inactivación térmica la que podría afectar los productos de reacción. Posibilita el empleo de mayores concentraciones de catalizador en el medio de reacción, permitiendo además su aplicación en procesos continuos, muchas veces mejorando la manipulación y aumentando la estabilidad del biocatalizador (Fernández-Lafuente et al., 1999). Así pues, el uso de procedimientos de inmovilización de

enzimas y células se reveló como una poderosa herramienta capaz de ser aplicada con éxito a una gran variedad de situaciones experimentales.

Sin embargo, el costo de la enzima y la estabilidad del biocatalizador, restringen su uso masivo. A pesar de que la inmovilización de enzimas presenta una serie de ventajas, no siempre es factible trabajar con una enzima inmovilizada. La aplicación de esta tecnología depende de distintos factores, entre los que se incluyen: la naturaleza y el costo del proceso, el método de inmovilización, el tipo de reactivos, la aparición de una nueva fase en el reactor, las restricciones difusionales del sistema, la vida útil del catalizador, el cambio de escala y el control del desarrollo microbiano durante el proceso.

Las propiedades de una enzima inmovilizada pueden diferir de las de la enzima libre dependiendo del método de inmovilización y la naturaleza del soporte. Se puede constatar una reducción en la actividad específica, particularmente si el proceso químico de inmovilización conduce a cierto grado de inactivación (Brena y Batista-Viera, 2006).

El soporte también crea un nuevo microentorno para la enzima y éste puede influenciar la actividad de formas muy variadas. Las características de la enzima se pueden ver alteradas si el sitio activo sufre algún cambio conformacional como resultado de la interacción química o física entre la enzima y el soporte. También el soporte puede afectar las características de la reacción catalizada por la enzima, imponiendo impedimentos estéricos, evitando la libre difusión del sustrato, o produciendo interacciones electrostáticas con moléculas de sustrato o producto (Sheldon, 2007).

La estabilidad de una enzima frente a la temperatura o bajo condiciones de almacenamiento puede verse incrementada cuando se la inmoviliza, dependiendo de cómo el nuevo microambiente afecta su tendencia a la desnaturalización. Otro factor importante en relación a la estabilidad es la posibilidad de reducir el ataque por parte de sustancias que degradan o inactivan la enzima. El pH óptimo puede variar hasta 2 unidades (usualmente 0.5-1 unidad) cuando se inmoviliza la enzima, debido al efecto del nuevo microambiente. La K_m aparente es con frecuencia significativamente más alta que la de la enzima en solución, siendo afectada por factores difusionales (Valencia et al., 2010; Zavrel et al., 2010). Las restricciones a la difusión de sustrato o productos pueden afectar también la velocidad de reacción, particularmente si existe inhibición por productos. La tasa de difusión de sustrato tiende a un valor límite cuando la concentración de sustrato en solución se incrementa. Si este valor límite se alcanza, la enzima inmovilizada está completamente saturada de sustrato y la velocidad máxima aparente alcanzada es menor que la correspondiente a la enzima en solución en iguales condiciones (Sheldon, 2007).

Existen distintos métodos para la inmovilización de enzimas, con o sin participación de un soporte sólido (Brena y Batista-Viera, 2006; Wilson et al., 2008; Wilson et al., 2009; Roessl et al., 2010; Bayraktar et al., 2011) (Fig. 1.1). La adsorción física a un soporte inerte es el procedimiento más simple. En él se establecen enlaces débiles entre enzima y soporte que tienen poco efecto sobre la actividad catalítica, permitiendo una fácil desorción del biocatalizador apelando a cambios de pH o fuerza iónica. El proceso de adsorción es reversible, pero inespecífico. La adsorción iónica, por ejemplo, depende fuertemente del pH y la fuerza iónica.

Otros métodos incluyen el uso de agentes quelantes, entrecruzamiento, atrapado en gel y microencapsulación en membranas sintéticas semipermeables o liposomas (Katchalski-Katzir, 1993; Cao, 2005).

La unión covalente de la enzima al soporte es un proceso factible; sin embargo es esencial que las condiciones empleadas para dicha unión no provoquen grandes pérdidas de actividad catalítica.

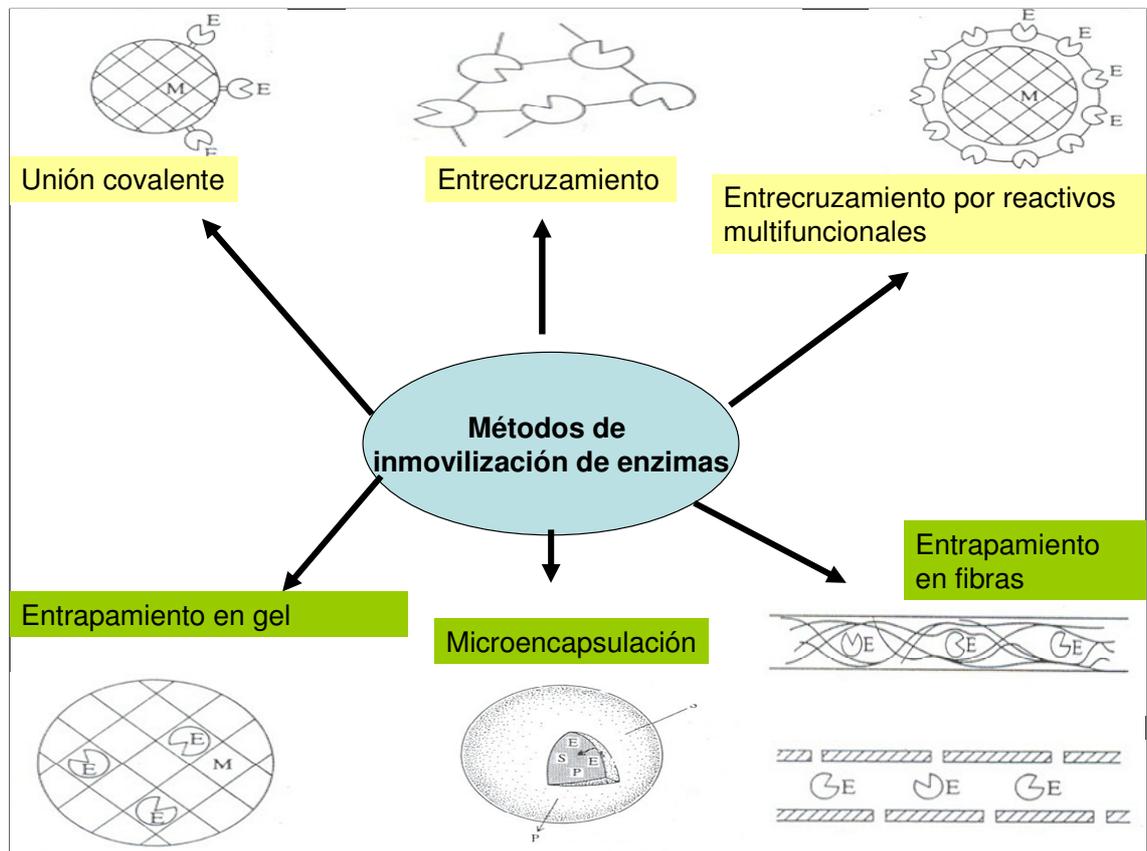


Figura 1.1. Métodos de inmovilización de enzimas: métodos químicos (arriba), métodos físicos (abajo).

En general, en la mayoría de los procedimientos para la inmovilización covalente, la capacidad catalítica de la enzima se ve afectada. En particular se generan grandes cambios en los parámetros cinéticos de la reacción catalizada enzimáticamente y en la termoestabilidad del

derivado, en dependencia con el método de unión covalente. No obstante, la inmovilización covalente presenta algunas ventajas importantes respecto a la adsorción física (Sheldon, 2007). El desarrollo de nuevos soportes y estrategias de inmovilización en los últimos años han incrementado el interés por la inmovilización covalente, lográndose por este medio una mejora significativa de las características de las enzimas (Boller et al., 2002; Mateo et al., 2007b; Rocha-Martín et al., 2012). Más aún, esta estrategia se ha combinado exitosamente con otras herramientas como la mutagénesis dirigida, evolución dirigida y modificación química para mejorar las características de los biocatalizadores como su enantio- y regioselectividad, así como su termoestabilidad (Wang et al., 2008a; Wang et al., 2008b; Wang et al., 2009).

Una etapa importante en la inmovilización de enzimas es la elección de un soporte y de un método de activación adecuados que permitan obtener una elevada concentración de grupos reactivos en la superficie del soporte que puedan interactuar con los grupos reactivos de la enzima.

Se han utilizado una gran variedad de soportes para la inmovilización covalente de enzimas tanto a escala de laboratorio como industrial; entre ellos, soportes inorgánicos (tales como cerámica, sílica y vidrio de poro controlado), colágeno, agarosa, así como geles de poliacrilamida y fibras de acetato de celulosa (Sheldon, 2007; Wang et al., 2008a). Las propiedades de la enzima y la aplicación a la que esté destinado el derivado enzimático influyen en la elección del soporte y del método de inmovilización a utilizar.

El uso de soportes de costo accesible, no tóxicos, y que se encuentran disponibles comercialmente para la inmovilización covalente de enzimas, es de gran interés en los procesos alimentarios a los que se aplique. Durante las últimas décadas han sido evaluados numerosos soportes, siendo las resinas acrílicas las más estudiadas (Grazú et al., 2003; Mateo et al., 2007b). Estos soportes, por su congruencia geométrica, proporcionan condiciones ideales para la estabilización de la enzima, a la vez de permitir su activación con varios agentes químicos. Entre los agentes activantes, los que despiertan mayor interés, tanto a escala de laboratorio como industrial, son los que incorporan grupos epóxido porque éstos son muy estables a pH neutro, aún en condiciones de humectación, por lo que los soportes epoxi-activados pueden ser almacenados por largos períodos. Dentro de las matrices que pueden ser epoxi-activadas se pueden encontrar soportes como la agarosa, polímeros acrílicos, sílica, hidrocoloides y glicanos (Saudagar et al., 2004; Xue et al., 2008).

1.3. Soportes acrílicos epoxi-activados

Los soportes acrílicos epoxi-activados comerciales son perlas macroporosas de polímeros acrílicos formados por una matriz levemente hidrofóbica y con una alta densidad de grupos epóxido reactivos (Fig.1.2). Además, estos soportes epoxi-activados son capaces de reaccionar en condiciones suaves (pH cercano al neutro y alta fuerza iónica) con diferentes grupos nucleofílicos de la enzima, tales como los grupos amino, hidroxilo y/o tiol, dependiendo del pH del medio, con una mínima modificación química de la proteína (Mateo et al., 2007a). Tienen un bajo factor de hidratación, elevada capacidad de unión, alta rigidez que permite mantener la morfología interna tanto en agua como en solventes orgánicos (Iyer y Ananthanarayan, 2008) y el procedimiento de inmovilización es sencillo, obteniéndose habitualmente altos rendimientos de inmovilización. Entre matriz y ligando se generan enlaces N-C, S-C ó O-C muy estables (Mateo et al., 2000a), lo cual facilita la manipulación, transporte y almacenamiento de los derivados incluso en condiciones de humectación. Dado el alto grado de activación del soporte, en muchos casos es posible que la unión se efectúe por múltiples enlaces. Este tipo de unión multipuntual enzima-soporte deriva en una rigidificación de la estructura tridimensional de la proteína, lo cual puede resultar en una gran estabilización frente a agentes físicos y químicos (calor, pH, solventes orgánicos, etc.). Adicionalmente es posible lograr flujos elevados cuando se opera en columna (Boller et al., 2002). Las partículas tienen un diámetro medio de 150-300 μm y el soporte posee un contenido de grupos epóxido entre 250-700 μmoles por gramo de gel seco (Tabla 1.2).

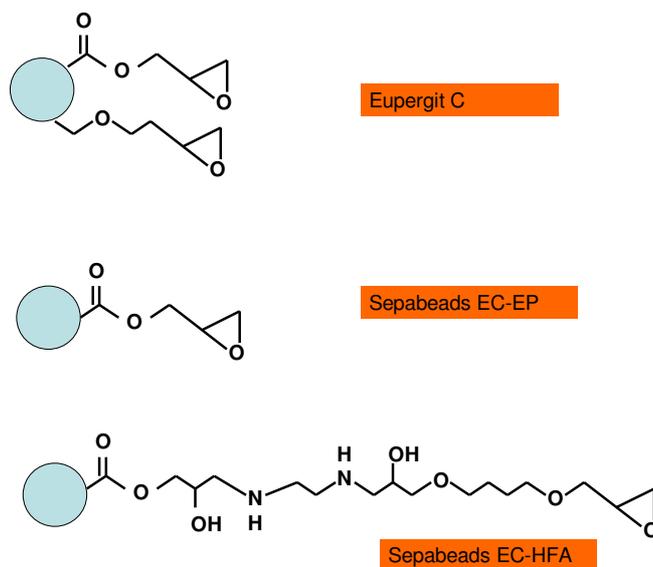


Figura 1.2. Estructuras de tres resinas acrílicas epoxi-activadas comerciales.

Entre este tipo de soportes disponibles comercialmente se encuentran las resinas Eupergit (Röhm Pharma) y Sepabeads (Resindion). La resina Eupergit C es un polímero acrílico (partículas esféricas con un diámetro promedio de 150 μm) que contiene grupos epóxido como componentes reactivos (mínimo 600 μmol de grupos epóxido por gramo de gel seco, unos 170 μmol de grupos epóxido por gramo de gel húmedo). El soporte denominado Eupergit C 250 L tiene la misma estructura química que el Eupergit C, pero posee poros de mayor tamaño y un número más reducido de grupos epóxido (250 μmol de grupos epóxido por gramo de gel seco). Por su parte, la resina Sepabeads EC-EP es un polímero acrílico con grupos epóxido reactivos, con un diámetro medio de partícula de 150 μm , y un contenido mínimo de grupos epóxido de 110 μmol de grupos reactivos por gramo de gel húmedo (Tabla 2). La inmovilización de proteínas en estos soportes no necesita reactivos adicionales para llevarse a cabo, como los requieren, por ejemplo, los soportes alhído-agarosa, glioxil-agarosa y muchos otros (Blanco y Guisán, 1989; Mateo et al., 2005; Mateo et al., 2006a; Mateo et al., 2006b), y prescinde de equipamientos especiales. No hay pérdida detectable de enzima en la mayoría de los casos, y generalmente se logra incrementar la estabilidad operacional y la termoestabilidad, como se explicó antes, así como la estabilidad operativa en medio orgánico y la estabilidad de almacenamiento (Fernández-Lorente et al., 2000). Estos soportes resultan compatibles con la inmovilización de distintos tipos de enzimas.

Tabla 1.2. Características generales de tres soportes acrílicos epoxi-activados disponibles comercialmente (información de los fabricantes).

Características	Eupergit C	Eupergit C 250 L	Sepabeads EC-EP	Sepabeads EC-HFA
Matriz	Copolímero acrílico ^a		Polimetacrilato	
Grupos reactivos	Epóxido	Epóxido	Epóxido	Amino epóxido
Densidad mínima de grupos epóxido ($\mu\text{mol/g}$ de gel hidratado)	170	70	110	50
Diámetro medio de partícula (μm)	150-300	150-300	150-300	150-300
Factor de hinchamiento	3.5	4.0	3.5	4.1
Tamaño de poro promedio (nm)	25	250	30	30

a- Copolímero de metacrilamida, alilglicidiléter, glicidilmetacrilato y metilen (bis) metacrilamida.

La inmovilización en soportes epoxi-activados convencionales (Eupergit C y C250L, Sepabeads EC-EP) sigue un mecanismo en dos pasos (Fig. 1.3). En el primer paso se promueve la rápida adsorción de la proteína al soporte; la mayoría de los soportes acrílicos tienen una naturaleza débilmente hidrofóbica y las condiciones incluyen el uso de alta fuerza iónica para promover la

adsorción de proteínas mediada por interacciones hidrofóbicas (Mateo et al., 2000a-b; Mateo et al., 2002). En el segundo paso del mecanismo la proteína previamente adsorbida se une covalentemente a través de los grupos epóxido presentes en la superficie y poros del soporte (reacción unimolecular). Aún cuando se aplican altas cargas proteicas, sólo se utilizan un pequeño porcentaje de los grupos epóxido disponible. Esto puede provocar algunos problemas de estabilidad, pero para evitarlo se lleva a cabo un proceso de bloqueo de los grupos reactivos remanentes en el soporte. El procedimiento de inmovilización en general se efectúa a temperatura ambiente y en medio acuoso. La inmovilización es afectada por la relación proteína/soporte, el tiempo de incubación, el pH y la fuerza iónica (Katchalski-Katzir y Kramer, 2000).

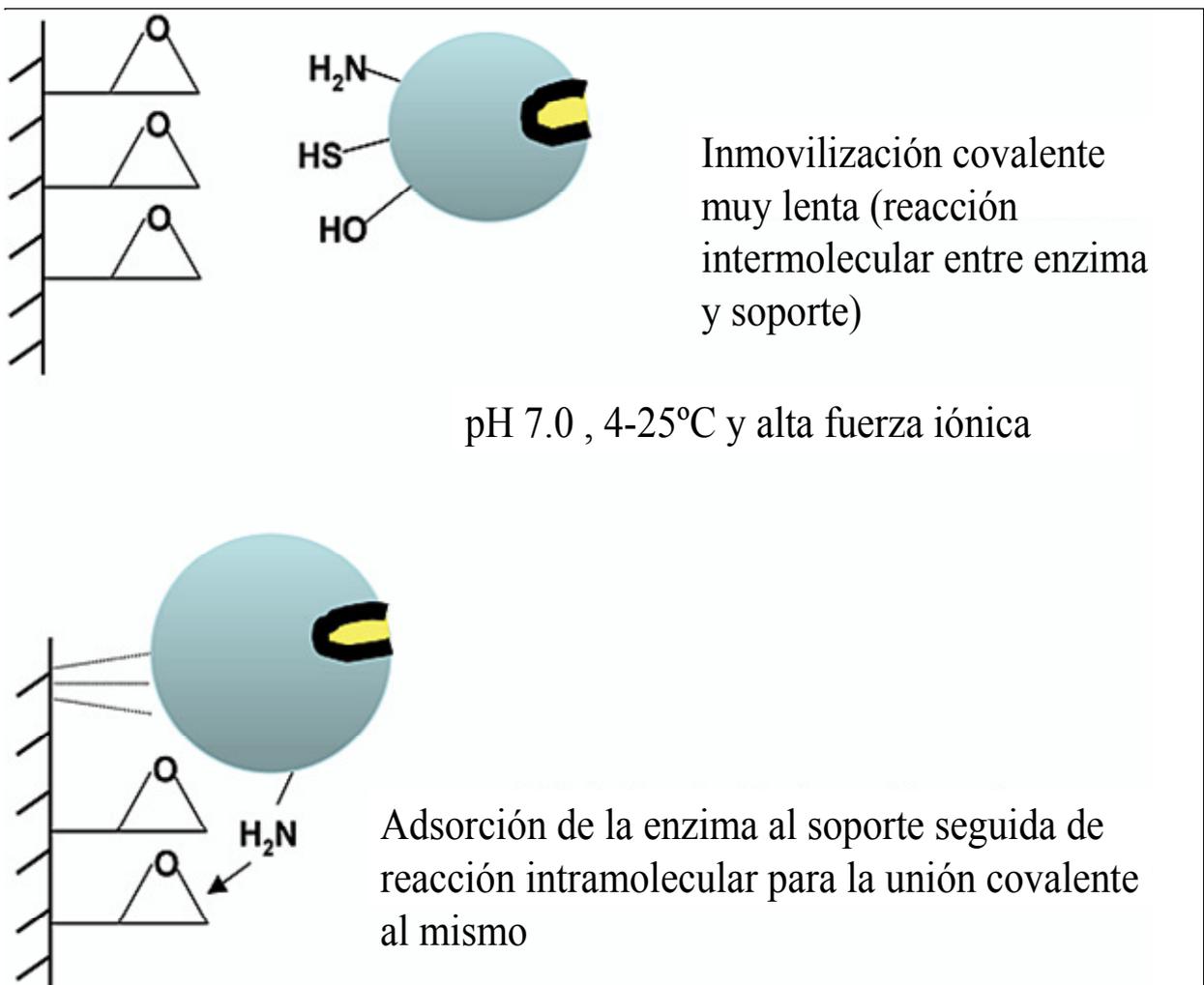


Figura 1.3. Mecanismo de inmovilización de proteínas, a pH próximos a la neutralidad y temperaturas moderadas, en soportes acrílicos epoxi-activados (Mateo et al., 2003, con modificaciones).

Más recientemente, se han desarrollado geles bifuncionales de polímero acrílico con grupos epóxido y amino (Mateo et al., 2003), que permiten la inmovilización de proteínas en condiciones experimentales muy suaves y a baja fuerza iónica (Fig. 1.4).

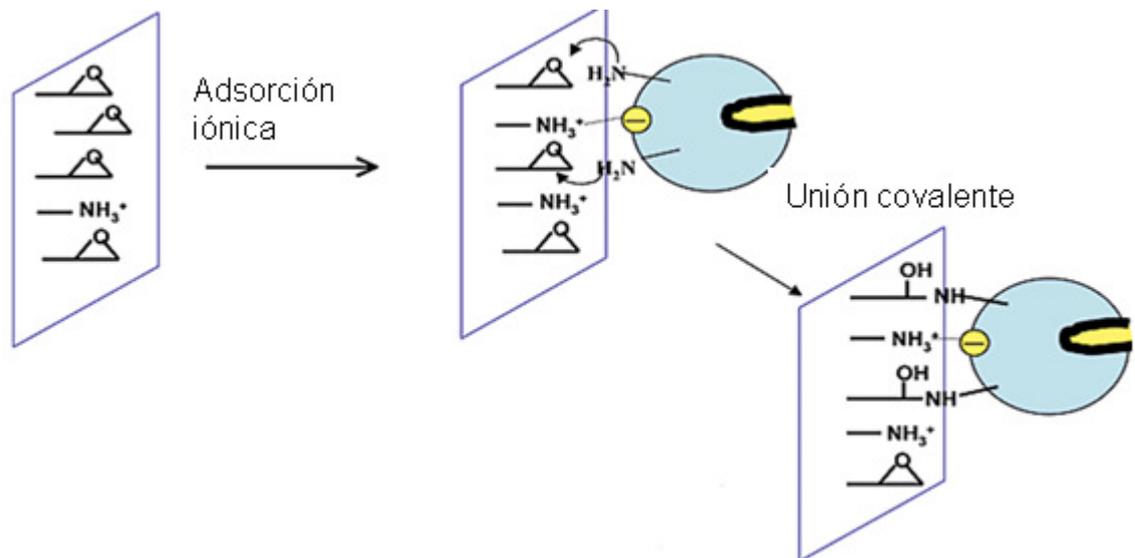


Figura 1.4. Inmovilización covalente de enzimas sobre soportes amino-epóxido con una pequeña proporción de grupos amino (Mateo et al., 2003, con modificaciones).

Estos soportes amino-epóxido heterobifuncionales inmovilizan proteínas por un mecanismo diferente. En tanto los grupos amino son capaces de promover la adsorción física de la proteína en base a interacciones iónicas, los grupos epóxido forman enlaces covalentes con las proteínas (Mateo et al., 2003). De este modo, las enzimas son primero adsorbidas físicamente en un proceso de intercambio iónico y luego se produce la unión covalente gracias a los grupos epóxido del soporte.

Estos geles heterobifuncionales se preparan por modificación de algunos grupos epóxido del soporte con compuestos capaces de promover la adsorción (Mateo et al., 2003) y dentro de los mismos se distinguen dos clases, de acuerdo al grado de modificación de los grupos reactivos del soporte.

En un primer tipo de soportes heterobifuncionales se lleva a cabo sólo un pequeño grado de modificación de la superficie del soporte (aproximadamente 20% de los grupos epóxido). Sin embargo, otros soportes heterobifuncionales, generados por modificación de una capa de etilendiamina covalentemente unida a la superficie del soporte (Fig. 1.2 y Fig. 1.5), presentan una relación 1 a 1 entre grupos amino y epóxido (Mateo et al., 2004).

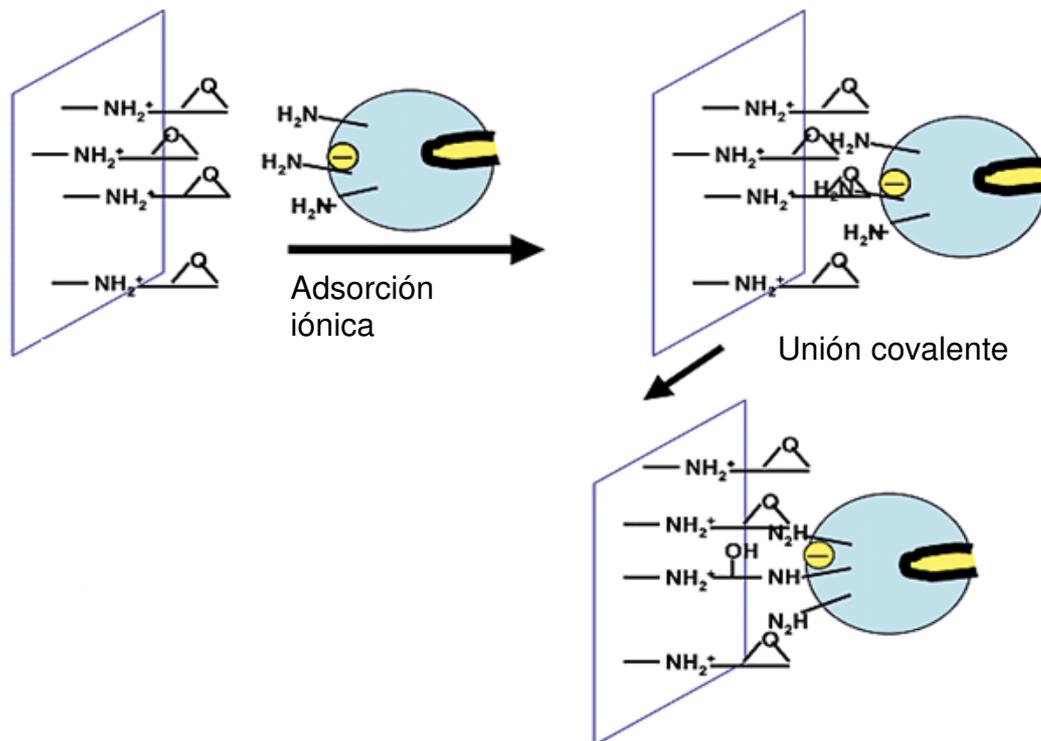


Figura 1.5. Inmovilización en soportes epoxi-amino con una proporción 1:1 de grupos amino (Mateo et al., 2004, con modificaciones).

El gel Sepabeads HFA pertenece a esta segunda generación de soportes bifuncionales y posee un mínimo de 50 μmol de grupos epóxido por gramo de gel húmedo (Torres et al., 2003; Bhattacharjee, 2006).

Los soportes acrílicos epoxi-activados permiten obtener muy buenos rendimientos de inmovilización y una alta recuperación de actividad, aumentando en muchos casos la estabilidad de los derivados frente a distintos agentes físicos y químicos debido a la generación de uniones múltiples entre enzima y soporte, que llevan a una rigidificación de la estructura (Mateo et al., 2003).

El empleo de la inmovilización covalente de enzimas en soportes epoxi-activados aplicada a procesos biotecnológicos presenta grandes posibilidades de desarrollo en los más diversos campos. Muchas enzimas han sido inmovilizadas con éxito en soportes acrílicos (O'Fágáin, 2003; Goedl et al., 2007). No obstante, estos soportes no son los más adecuados para la inmovilización de ciertas enzimas con características especiales, como se ha reportado en el caso de la dextranasa de *Chaetomium erraticum* (Erhardt y Jördening, 2007) y la epóxido hidrolasa de *Solanum tuberosum* (Mateo et al., 2007c).

En este trabajo se desarrollarán biocatalizadores específicos en base a la inmovilización covalente de enzimas en soportes acrílicos epoxi-activados

1.4. Procesamiento de lactosuero

Como es sabido en Uruguay la industria láctea, y en particular la quesería, tiene un papel importante en la economía y en las últimas décadas ha encontrado las condiciones para un desarrollo notable. No obstante, subsisten ciertas limitaciones que impiden el aprovechamiento integral de los recursos generados como consecuencia directa o indirecta de esta rama de actividad.

En este trabajo nuestro interés se centró en la utilización del lactosuero, considerado como un co-producto en el proceso de manufactura de quesos, que generalmente es descartado generando pérdida de recursos y problemas ambientales (Hernández-Ledesma et al., 2011). El lactosuero es un efluente líquido que se obtiene durante la fabricación del queso en la etapa de coagulación de la leche (Fig. 1.6). El suero se deteriora rápidamente a causa de la acción microbiana y su disposición final requiere tratamientos previos que eviten la contaminación ambiental (Siso, 1996).



Figura 1.6. Lactosuero, un coproducto de la industria quesera.

Los componentes solubles en su mayoría son proteínas (6-8 g/L), azúcares, especialmente lactosa (44-52 g/L), y sales minerales (4.3-9.5 g/L). El lactosuero contiene un 25% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y el 95% de la lactosa (Tunick, 2008; Illanes, 2011).

Parte del suero de quesería se ultrafiltra para recuperar las proteínas, generando un permeado conteniendo 4.5% de lactosa, sales minerales y vitaminas (Giacomini et al., 1998, Tunick, 2008). La nanofiltración proporciona un método para la desmineralización parcial del

lactosuero, y permite la recuperación de proteínas y lactosa (Alkhatim et al., 1998). Sin embargo, aproximadamente el 47 % de los 115 millones de toneladas anuales de lactosuero producidas en el mundo se dispone en ríos, lagos y otros cuerpos de agua (Prazeres et al., 2012). Esto representa una significativa pérdida de recursos y causa serios problemas de polución dado que el suero es un contaminante orgánico con altas BOD (40000-60000 ppm) y COD (50000-80000 ppm). Más del 90% de esta BOD se debe a la lactosa (Smithers y Copleland, 1997; Cristiani-Urbina et al., 2000).

Si bien la lactosa ha sido utilizada durante mucho tiempo como aditivo en la industria de alimentos, su uso siempre ha estado restringido como consecuencia de su escasa solubilidad, facilidad de cristalización (que dificulta los procesos de producción de lácteos no fermentados como helados o leche condensada) y bajo poder edulcorante, además de que una buena parte de la población mundial es intolerante a la lactosa, y no pueden consumir leche y subproductos con alto contenido en este azúcar. Dificultades similares tiene su empleo en aditivos y medios de fermentación. Estudios nutricionales han demostrado que la población intolerante a la lactosa puede consumir productos lácteos lactosa hidrolizados (Turnbull, 2000).

Los procesos de filtración para la recuperación de la lactosa del lactosuero resultan muy costosos y la mayor parte de las industrias no los llevan a cabo (Alkhatim et. al., 1998). Una alternativa para la utilización del lactosuero es la transformación química (mediante hidrólisis ácida) o enzimática de la lactosa.

La hidrólisis química requiere el uso de altas concentraciones de ácidos y altas temperaturas. En cambio, las condiciones de la hidrólisis enzimática, ya sea mediante β -galactosidasas o β -glicosidasas, son mucho más moderadas (Petzelbauer et al., 1998a-d). Como consecuencia de la hidrólisis enzimática específica no se obtienen productos secundarios, sabores, aromas o colores indeseados. En nuestro caso, se empleará una β -galactosidasa para la hidrólisis de lactosa en sueros de quesería, primer paso en el proceso de biotransformación que se llevará adelante.

1.5. β -Galactosidasa

La enzima β -galactosidasa (β -D-galactósido galactohidrolasa, EC 3.2.1.23) es uno de los biocatalizadores de mayor potencial en la industria de alimentos (Grosová et al., 2008). Es una enzima de la más amplia distribución, producida por animales, plantas y microorganismos (Tabla 1.3), la cual cataliza *in vivo* la hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa (Fig. 1.7). Esta actividad es importante desde el punto de vista nutricional y tecnológico (Panesar et al., 2010). Además, bajo

determinadas condiciones experimentales la enzima también cataliza procesos de transglicosilación para producir galactósidos y oligosacáridos (Irazoqui et al., 2009; Neri et al., 2011).

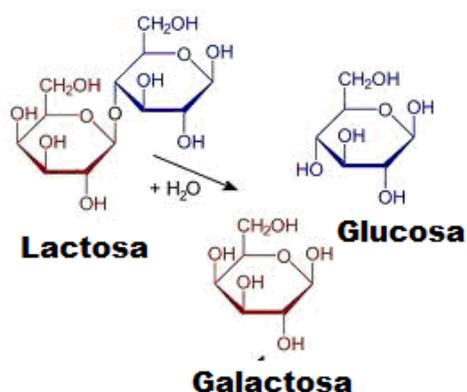


Figura 1.7. Hidrólisis de lactosa.

Tabla 1.3. Algunos microorganismos productores de β -galactosidasa (Panesar et al., 2010).

Microorganismos productores de β -galactosidasa		
Bacterias	Hongos	Levaduras
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. palmi</i>	<i>Bullera singularis</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Aspergillus foetidus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. oryzae</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterum</i> , <i>B. stearothermophilus</i>	<i>Auerobasidium pullulans</i>	<i>Saccharomyces anamensis</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. fragilis</i>
<i>Bacteriodes polypragmatus</i>	<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Kluyveromyces bulgaricus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. infantis</i>	<i>Fusarium monilliforme</i> , <i>F. oxysporum</i>	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. thermosulfurogens</i>	<i>Mucor meihei</i> , <i>M. pusillus</i>	
<i>Corynebacterium murisepticum</i>	<i>Neurospora crassa</i>	
<i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>E. cloacae</i>	<i>Penicillium canescens</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharopolyspora rectivergula</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Scopulariopsis</i> sp	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. kefiranoferiens</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i>	<i>Streptomyces violaceus</i>	
<i>Leuconostoc citrovorum</i>		
<i>Pediococcus acidilacti</i> , <i>P. pento</i>		
<i>Propioionibacterium shermanii</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>		
<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>		
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.		
<i>Thermus rubus</i> , <i>T. aquaticus</i>		
<i>Trichoderma reesei</i>		
<i>Vibrio cholera</i>		
<i>Xanthomonas campestris</i>		

La estrategia más simple para la hidrólisis enzimática de la lactosa se basa en el uso de la enzima parcialmente purificada, en procesos de tipo batch. No obstante, la inhibición por productos aparece como la mayor desventaja de este tipo de tecnología. Se han desarrollado un gran número

de modelos matemáticos para dar cuenta del comportamiento cinético de ciertas β -galactosidasas de interés industrial, en forma soluble e inmovilizada en diversos soportes (Bakken et al., 1992; Santos et al., 1998; Zhou et al., 2001; Zhou et al., 2003). Muchas fuentes microbianas de β -galactosidasa han despertado interés industrial. Como puede verse en la Tabla 1.4, se han empleado un gran número de soportes para la inmovilización de β -galactosidasas (Giacomini et al., 1998, Giacomini et al., 2001, Pessella et al., 2003, Ovsejevi et al., 1998, Pessella et al., 2004).

Tabla 1.4. Algunos soportes reportados para la inmovilización de β -galactosidasas (Panesar et al., 2010).

<i>Método de inmovilización</i>	<i>Organismo</i>	<i>Soporte</i>
Adsorción física	<i>K. fragilis</i> y <i>K. lactis</i>	Quitosano, perlas de quitosano, CPC-sílica, PEI-Sepabeads, DEAE-agarosa, perlas de celulosa, agarosa, Celite y Sephadex G-75
	<i>A. oryzae</i>	Resina de fenolformaldehído Membrana de polivinil cloruro y sílica gel Chromosorb-W Polivinil cloruro y sílica
	<i>E. coli</i>	Quitosano
	<i>B. circulans</i>	Monolito cerámico poroso
	<i>B. stearothersophilus</i>	Perlas de quitosano
	<i>A. niger</i>	Quitosano Perlas de quitosano
	<i>Thermus</i> sp. T2	Celite, quitosano Perlas de quitosano
	<i>Pisum sativum</i>	
Entrampado	<i>K. bulgaricus</i>	Alginato, usando BaCl ₂
	<i>E. coli</i>	Gel de poliacrilamida
	<i>A. oryzae</i>	Nylon-6 y zeolita, esponja de polivinil alcohol Cryogel, perlas de agarosa
	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Perlas de agarosa Alginato de calcio
	<i>Penicillium expansum</i> F3	Hidrogel de polivinilalcohol
	<i>K. lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hidrogel de polivinilalcohol Hidrogel de polivinilalcohol
Unión covalente	<i>L. bulgaricus</i>	Cáscara de huevo
	<i>S. anamensis</i>	Alginato de calcio
	<i>E. coli</i>	Clara de huevo, polivinilalcohol, celulosa activada con cloruro de cianógeno, gelatina
	<i>A. oryzae</i>	Sílica, sílica gel activada con TiCl ₃ y FeCl ₃ , membrana de nylon, hidrogel de polivinilalcohol y partículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ -quitosano
	<i>K. lactis</i>	Perlas de quitosano, algodón, algodón activado con cloruro de tosilo, Eugrit, grafito y tiolsulfonato/tiolsulfonato
	<i>B. circulans</i> <i>K. fragilis</i>	Eupergit C Sílica-alúmina

Las lactasas de *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis*, y *Aspergillus oryzae* son los ejemplos más destacados en los que se han utilizado procedimientos de inmovilización (Matioli et

al., 2003; Panessar et al., 2010). Asimismo existen reportes sobre la producción de β -galactosidasas heterólogas en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* y *E. coli*. El clonado, la mutagénesis, así como la construcción de diversas proteínas de fusión a partir de las enzimas de *K. lactis*, *A. niger* y diversos microorganismos de interés, incluyendo extremófilos, ha derivado en la mejora de su potencial en aplicaciones biotecnológicas (Sheik y Gunasekaran, 2010).

Las β -galactosidasas se pueden utilizar para procesar co-productos de la manufactura de quesos (sueros y permeados), eliminando los problemas ambientales relacionados a su disposición y permitiendo la revalorización del componente lactosa del lactosuero (Panessar et al., 2010).

El suero dulce tiene un pH de 5.5-6.3 (Bakken et al., 1992) y la leche descremada de 6.5-6.7 (Salaün et al., 2005). Una lactasa cuyo pH óptimo abarca este rango proviene de *Bacillus circulans* y fue seleccionada para nuestros estudios.

La β -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Mozaffar et al., 1984; Vetere y Paoletti, 1998; Hernaiz y Crout, 2000) es una enzima extracelular, que posee una termoestabilidad significativamente mayor que la mayoría de las β -galactosidasas de levaduras, y la misma no requiere cofactores metálicos para su actividad (una ventaja respecto a la mayoría de las enzimas de *Kluyveromyces* spp., las cuales además son inhibidas por calcio [Demirhan et al., 2008]). Las propiedades de esta enzima son de interés para su empleo en la hidrólisis de lactosa. La enzima soluble presenta un óptimo de actividad en 40 °C y el pH óptimo se ubica en el rango de pH del suero dulce (Bakken et al., 1992; Salaün et al., 2005). En condiciones apropiadas, la enzima cataliza la producción de oligosacáridos, mostrando una alta regioselectividad con formación de enlaces β (1-4) y preferencia por la formación de oligosacáridos de más de tres unidades monoméricas (Boon et al., 2000). En consecuencia, estas propiedades la convierten en una enzima de interés para la hidrólisis de lactosa en leche y coproductos de la industria quesera, así como en otros procesos biotecnológicos (producción de galactooligosacáridos con propiedades prebióticas).

La forma soluble de la enzima, parcialmente purificada, está disponible comercialmente bajo la denominación de Biolacta N-5 (Daiwa Kasei, Osaka, Japón). En la preparación comercial se ha demostrado la presencia de al menos 4 isoenzimas (siendo la β -galactosidasa I la más abundante), las que poseen distintas afinidades por el sustrato natural (lactosa) y el ONPG, un sustrato alternativo. Dos de las isoenzimas (incluida la β -galactosidasa I) son inhibidas por galactosa, en tanto que las restantes no presentan inhibición por producto (Vetere y Paoletti, 1998; Song et al., 2011a). Varias formas de esta enzima se han clonado en *E. coli* (Song et al., 2011b).

Actualmente la β -galactosidasa de *Bacillus circulans* no cuenta con el estatus GRAS de la FDA, pero este organismo analiza varias solicitudes tendientes a incorporar algunas de sus aplicaciones para su empleo en procesos de producción de alimentos.

El diseño de bioprocesos para el aprovechamiento de la lactosa como recurso, especialmente con la generación de productos de mayor valor agregado, ha sido abordado por muchos investigadores en las últimas décadas. En este sentido, la hidrólisis de lactosa suele establecerse como el primer eslabón para la obtención de productos de interés. Por su parte, los productos de la hidrólisis de la lactosa (glucosa y galactosa) pueden ambos ser objeto de transformaciones posteriores, que además de generar nuevos productos, disminuyen la concentración de azúcares inhibidores de la β -galactosidasa.

1.6. D-Tagatosa

El conocimiento de varios procesos biocatalíticos, facilitados por el uso de enzimas inmovilizadas, ha determinado el desarrollo de estrategias experimentales para la generación de productos lácteos con bajo porcentaje de lactosa, utilización de los productos de hidrólisis de la lactosa como edulcorante en diversos alimentos, y producción de jarabes con poder edulcorante equivalente al de la sacarosa (por ejemplo producción biológica de D-tagatosa) a partir de sustratos alternativos como el lactosuero. La mayoría de estos esfuerzos no han alcanzado aún el refinamiento requerido para utilizar el proceso a escala industrial (Panesar, 2010). Sin embargo, la producción de D-tagatosa y el incremento del poder edulcorante del suero de quesería mediante la biotransformación de la lactosa, constituyen procesos con grandes posibilidades de desarrollo a largo plazo.

Los denominados azúcares raros (Izumori, 2002; Ganström et al., 2004) son aquellos que se presentan en bajas cantidades en la naturaleza y han recibido especial atención a partir de algunos trabajos de recopilación de información en base a bibliografía y especulaciones teóricas (Fig. 1.8).

La D-tagatosa es uno de estos azúcares, enantiómero de la D-fructosa (inversión en C-4) que ha sido introducido como agente endulzante bajo en calorías (1,5 kcal/g) (Patra et al., 2009). En tanto que la D-fructosa posee un poder edulcorante muy superior al de la glucosa y sacarosa (Bhosale et al., 1996), la D-tagatosa es un monosacárido de poder edulcorante similar a la sacarosa, y a diferencia de los polioles no presenta retrogusto. La glucosa posee el 74% del poder edulcorante de la sacarosa, en tanto que fructosa y tagatosa alcanzan 180% y 92% respectivamente (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Poder edulcorante relativo de una selección de carbohidratos (Zall, 1992).

Carbohidrato	Poder edulcorante relativo (%)
Sacarosa	100
Lactosa	16
D-Galactosa	32
D-Glucosa	74
D-Tagatosa	92
D-Fructosa	180

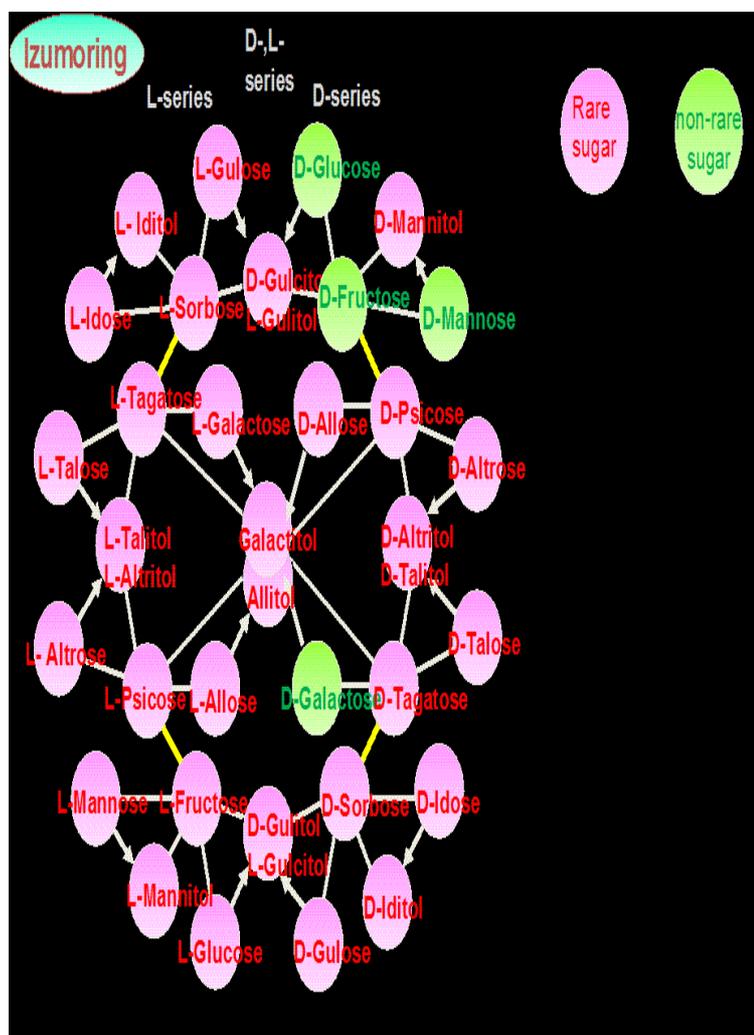


Figura 1.8. Izumoring: mapa de las transformaciones posibles entre hexosas abundantes y raras (Izumori, 2002).

La D-tagatosa aparece naturalmente en baja cantidad en la goma producida por el árbol *Sterculia setigera* (Fig 1.9) como así también en pequeñas cantidades en diversos alimentos tratados térmicamente como leche de vaca en polvo y esterilizada o cacao caliente, donde es formada a partir de la D-galactosa por isomerización (Cheetham y Wootton, 1993). También se la encuentra en una variedad de quesos, yogures y otros productos lácteos (Mendoza et al., 2005). La tagatosa no tiene contribución neta al valor calórico de la dieta (Kim et al., 2003b) y en diabéticos

tipo 2 contribuye al adelgazamiento (Jung et al., 2005). Como consecuencia, este edulcorante hipocalórico puede emplearse en una gran variedad de alimentos, bebidas y suplementos dietéticos (Jung et al., 2005).



Figura 1.9. *Sterculia setigera*.

Son numerosos sus efectos beneficiosos para la salud, por tratarse de un azúcar hipocalórico que promueve la pérdida de peso (Moore, 2006), y cuyo efecto glucémico es nulo (Donner et al., 1999), además de poseer efecto prebiótico reconocido, y de actuar en la prevención de la formación de la placa dentaria y del biofilm de microorganismos (Wong, 2000). Se han probado a su vez numerosos efectos benéficos, como la reducción de síntomas asociados a diabetes tipo 2, hiperglicemia, anemia y hemofilia (Bär, 2004). Asimismo, posee efecto antioxidante y crioprotector, por lo que ha sido utilizada como agente estabilizante y de transporte de órganos a ser trasplantados (Paterna et al., 1998). Por último, la D-tagatosa ha sido utilizada como intermediario en la síntesis de otros compuestos orgánicos ópticamente activos, siendo empleada, además, como aditivo en detergentes, cosméticos y en formulaciones farmacéuticas (Kim, 2004). La D-tagatosa ha sido reconocida como una sustancia GRAS por la FAO/WHO desde 2001 y por lo tanto, puede ser utilizada en la industria de alimentos (Levin, 2002; Oh, 2007).

Por las razones mencionadas, la producción biológica de D-tagatosa genera creciente interés, tanto debido a su uso como edulcorante e ingrediente funcional en alimentos, como al creciente interés clínico y nutricional de la D-tagatosa (Muddada, 2012).

Industrialmente, la D-tagatosa es producida químicamente a partir de la D-galactosa, la cual es isomerizada a D-tagatosa bajo condiciones alcalinas (pH 12) usando hidróxido de calcio como agente complejante (Beadle et al., 1992; Ibrahim y Spradlin, 2000; Muddada, 2012). El hidróxido de calcio altera el equilibrio de isomerización entre D-galactosa y D-tagatosa favoreciendo la formación de la D-tagatosa, debido a que forma un complejo insoluble con este

azúcar a pH elevados. El tratamiento de la suspensión con dióxido de carbono libera la D-tagatosa mediante la neutralización de la mezcla y la precipitación del calcio como carbonato de calcio. La desventaja que tiene este proceso es que toda isomerización química es inespecífica y, por ende, lleva a la formación de subproductos no deseados (sobre todo como consecuencia del pH alcalino del medio), aromas y desechos químicos. Además, a través de esta vía se ha comprobado una reducción del poder edulcorante de la D-tagatosa.

Por su parte, el proceso enzimático de obtención de cetozúcares (en particular D-tagatosa) tiene las ventajas de utilizar condiciones de temperatura y pH más suaves, además de no formar productos secundarios, demostrando que la reacción de isomerización enzimática es altamente específica (Kim, 2004).

La interconversión de aldosas a cetosas sirve como recurso nutricional en bacterias saprofitas que pueden utilizar desechos vegetales (hemicelulosa) o animales (leche) y también como recurso tecnológico, formando parte de ciertos procesos de bioconversión, para producir etanol, o jarabes de alto contenido en fructosa (HFCS) a partir de granos (en especial maíz) mediante un proceso multienzimático que utiliza almidón como materia prima (Bhosale et al., 1996).

En este trabajo se empleará un método enzimático para la conversión parcial de la D-galactosa (resultante del proceso de hidrólisis de lactosa) en D-tagatosa.

1.7. L-Arabinosa (D-galactosa) isomerasa

La enzima L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (L-arabinosa cetoisomerasa, E.C. 5.3.1.4, LAI) es una enzima intracelular que cataliza *in vivo* la isomerización reversible de L-arabinosa a L-ribulosa e *in vitro* la de D-galactosa a D-tagatosa, siendo de interés industrial debido a su potencial aplicación en la producción de D-tagatosa (Fig. 1.10). Estas actividades catalíticas de LAI son posibles en virtud de la configuración semejante de D-galactosa y L-arabinosa (Boudebouze et al., 2011). Algunas fuentes de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa entre las más estudiadas son *Escherichia coli*, *Thermoanaerobacter mathrani*, *Thermotoga neapolitana*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus halodurans* (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Algunos microorganismos productores de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (Hong et al., 2007b; Kim et al., 2010).

***Microorganismos productores de L-arabinosa
(D-galactosa) isomerasa***

Arthrobacter spp.
Bacillus halodurans
Enterobacter spp.
Escherichia coli
Geobacillus stearothermophilus
Klebsiella spp.
Lactobacillus spp.
Mycobacterium spp.
Salmonella spp.
Thermoanaerobacter mathranii
Thermotoga maritima
Thermotoga neapolitana
Thermus spp.

La literatura contiene múltiples reportes de purificación, caracterización y estudios cinéticos y químicos de LAI de diversas fuentes, entre ellas *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Lee et al., 2005c), *Geobacillus stearothermophilus* (Kim et al., 2002, 2003b), *Thermotoga maritima* (Lee et al., 2004; Kim y Oh, 2005), *Thermotoga neapolitana* (Patrick y Lee, 1975), *Thermus* sp. (Patrick y Lee, 1968), *Thermoanaerobacter mathranii* (Rhimi y Bejar, 2006), *Arthrobacter globiformis* (Izumori et al., 1984) y *Geobacillus thermodenitrificans* (Patrick y Lee, 1969). La mayoría de estas LAI provienen de organismos termófilos o hipertermófilos excepto los mesófilos *Escherichia coli* (Wallace et al., 1978), *Enterobacter aerogenes* (Zhang et al., 2007), *Enterobacter agglomerans* (Muniruzzanman et al., 1994), *Lactobacillus gayonii* (Rhimi et al., 2010a), *Lactobacillus plantarum* (Kim, 2004), *Lactobacillus sakei* (Rhimi et al., 2010b), *Mycobacterium smegmatis* (Izumori et al., 1978; Izumori y Tzuzaki, 1988), *Mycobacterium phleii* (Izumori y Tzuzaki, 1988) organismos del género *Mucor* (Yoshihara et al., 2006), *Gluconobacter oxidans* (Manzoni y Rollini, 2001; Rollini y Manzoni, 2005) *Klebsiella pneumoniae* (Shimonishi et al., 1995) y *Bacillus halodurans* (Lee et al., 2005a). El mayor interés por estas LAI de extremófilos se debe a que se pueden alcanzar mayores velocidades y porcentajes de conversión en términos de D-tagatosa como consecuencia de la operación a mayores temperaturas. Como contrapartida, estas enzimas son difíciles de obtener empleando métodos no recombinantes y la mayoría de estos microorganismos provienen de ambientes no reconocidos como seguros desde el punto de vista de su empleo en la industria alimentaria.

Otras estrategias de purificación sin el empleo de tecnologías de biología molecular se han empleado sobre todo en bacterias mesófilas como *E. coli*, *L. plantarum*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *L. gayonii*, *Bacillus lichemiformis* y *M. smegmatis* (Prabhu et al., 2008). Las mismas involucran múltiples pasos incluyendo precipitación salina, tratamientos térmicos y

técnicas cromatográficas como intercambio iónico, gel filtración, HPLC preparativo y cromatografía de interacción hidrofóbica. Sin embargo, la mayoría de las LAI tecnológicamente relevantes se obtienen como proteínas de fusión en las cuales se introduce una secuencia que actúa como diana para el reconocimiento por parte de un bioadsorbente no específico, interacción que permite la purificación (Lee et al., 2004). Finalmente, otras LAI han sido producidas por medios recombinantes que no involucran proteínas de fusión, y se han purificado por técnicas convencionales (Roh et al., 2000).

El mecanismo de acción de esta enzima es del tipo transferencia protónica (Boudebbouze et al., 2011), catalizando el intercambio del protón del carbono 2 de la L-arabinosa. La enzima no requiere cofactores para su actividad, pero ciertos iones divalentes actúan como activadores. La naturaleza del ion depende del origen de la enzima considerada (Tabla 1.7).

La estructura de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *E. coli* se ha resuelto a 2.8 Å en base al análisis por difracción de rayos X de cristales generados en ausencia y en presencia de Mn^{2+} (Manjasetty y Chance 2006; Zhu et al., 2007). La enzima funcional tiene una estructura hexamérica de 336 kDa (Fig. 1.11). Otros microorganismos producen enzimas con estructuras cuaternarias diferentes, fundamentalmente dímeros y tetrámeros (Boudebbouze et al., 2011).

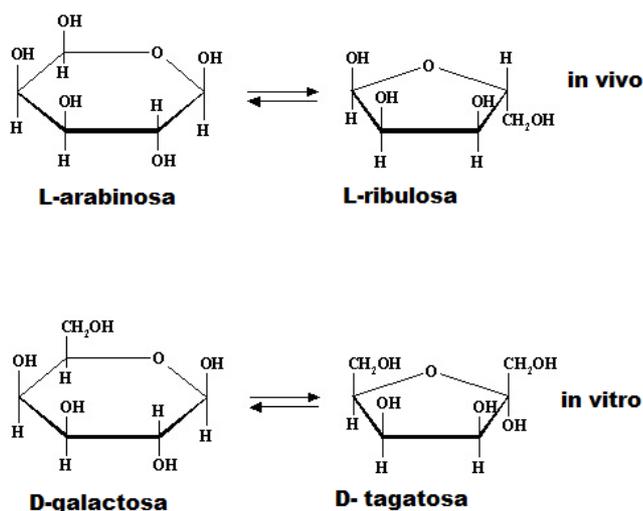


Figura 1.10. Isomerización de L-arabinosa y D-galactosa por L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (Kim et al., 2001, con modificaciones).

Se ha reportado la inmovilización de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *Escherichia coli* y de otras fuentes por unión covalente en agarosa y entrapamiento en alginato, matrices poco explotadas a nivel industrial (Yoon et al., 2003). El pH y la temperatura óptimos de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *Escherichia coli* inmovilizada en alginato son 7-8 y 65-70°C, en tanto que en la forma soluble son 7.5 y 60°C (Kim et al., 2001; Kim et al., 2003b). Los derivados insolubles presentan mayor estabilidad que la forma soluble de esta enzima, bajo

iguales condiciones de operación. El cociente tagatosa/galactosa depende fuertemente de la temperatura de operación (Tabla 8). Los porcentajes de tagatosa obtenidos en el equilibrio se ubican entre 27.5% y 50% a 30°C y 60°C, respectivamente.

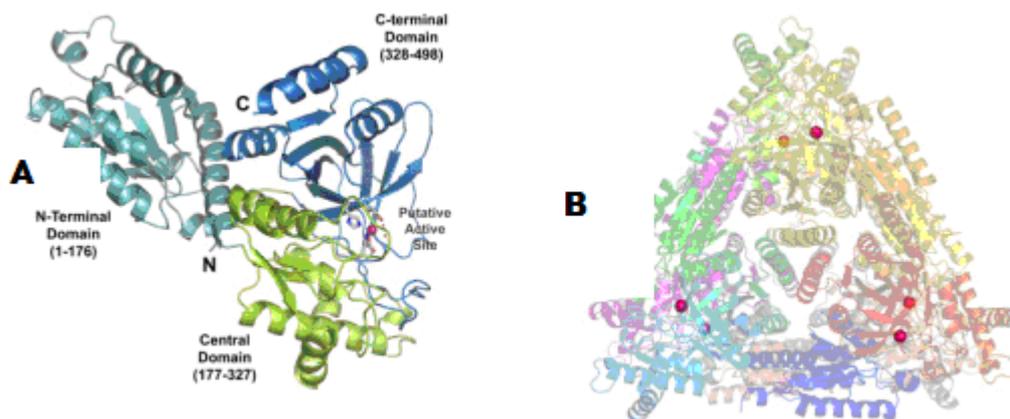


Figura 1.11. Estructura tridimensional de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *E. coli*. A. Monómero. B. Hexámero (Zuh et al., 2007).

Dado que el proceso de isomerización de D-galactosa en D-tagatosa es de interés comercial, la mayor parte de la información sobre la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa ha sido documentada recientemente en diferentes patentes. Diversos microorganismos han sido patentados como fuentes de la enzima (Muddada, 2012).

Si bien hay varios grupos de investigación estudiando extensivamente la producción de D-tagatosa a partir de D-galactosa por isomerización enzimática utilizando la enzima LAI, no existe aún un método enzimático de producción industrial de esta cetohexosa, y la enzima no está disponible comercialmente.

Tabla 1.7. Propiedades bioquímicas de algunas L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas (Kim et al., 2003a; Rhimi y Bejar, 2006; Zhang et al., 2009c; Zhang et al., 2011).

Bacteria	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Activadores
<i>Lactobacillus sakei</i>	30-40	5.0-7.0	Mn ²⁺ , Mg ²⁺
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	65	6.0-6.5	Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺
<i>Lactobacillus gayonii</i>	30-40	6.0-7.0	Mn ²⁺
<i>Lactobacillus plantarum</i> SK-2	50	7.0	Mn ²⁺ , Fe ³⁺
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	45	7.0-7.5	Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺
<i>Lactobacillus plantarum</i> NC8	60	7.5	Mn ²⁺ , Co ²⁺
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	70	7.0-7.5	Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺
<i>Thermotoga maritima</i>	90	7.5	Mn ²⁺ , Co ²⁺
<i>Escherichia coli</i>	30	8.0	Fe ²⁺ , Mn ²⁺
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	65	8.0	Mn ²⁺
<i>Thermus</i> sp. IM6501	60	8.5	Mn ²⁺
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	70	8.5	Mn ²⁺
<i>Lactobacillus fermentum</i> CGMCC2921	65	6.5	Mn ²⁺ , Co ²⁺

Tabla 1.8. Influencia de la temperatura sobre el equilibrio en la reacción de isomerización D-galactosa/D-tagatosa catalizada enzimáticamente.

Temperatura (°C)	Concentración de tagatosa (%)	
	Enzima libre	Enzima inmovilizada
25	20	20.8
30	24.5	27.5
50	30.6	35.9
60	46	50
65	50	52.8

1.8. D-xilosa (D-glucosa) isomerasa

La D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (D-xilosa cetoisomerasa, E.C. 5.3.1.5, GI) es una enzima intracelular que cataliza *in vivo* la isomerización reversible de D-xilosa en D-xilulosa e *in vitro* la de D-glucosa en D-fructosa, teniendo entonces el potencial para la transformación del otro producto de la hidrólisis enzimática de la lactosa (Fig. 1.12). Al igual que en el caso de las actividades catalíticas de LAI, estas conversiones son posibles en virtud de la configuración semejante de xilosa y glucosa.

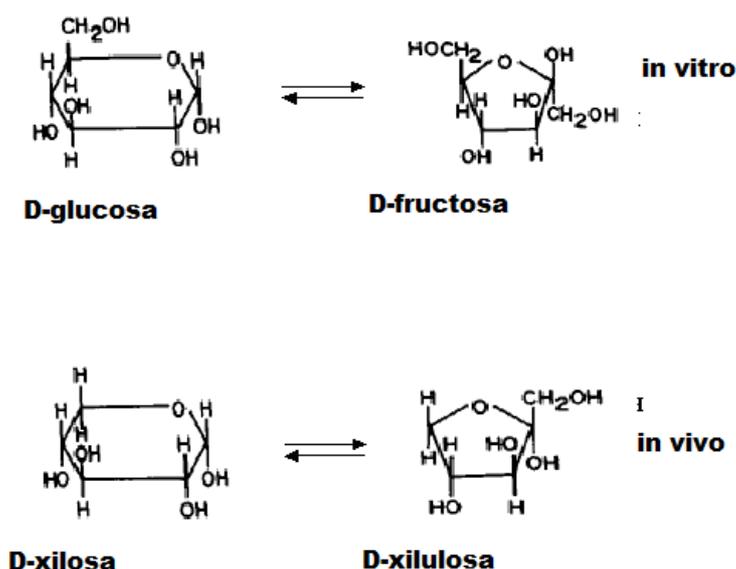


Figura 1.12. Reacciones catalizadas por la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (Bhosale et al., 1996, con modificaciones).

La D-xilosa (D-glucosa) isomerasa pertenece al mismo grupo de cetoisomerasas que la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa. Sin embargo, el mecanismo de isomerización en este caso es del tipo transferencia de hidruro (Fábián et al., 1994; Kowalevsky et al., 2010). Esta diferencia entre D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa sugieren que estas dos enzimas podrían no ser producto de una evolución convergente (Seeman y Schulz, 1997). La estructura de enzimas de diversas fuentes se ha resuelto cristalográficamente a 2.3-2.9 Å, en presencia de metales, sustratos y análogos estructurales de los mismos (Henrick et al., 1989), y a su vez ha sido posible estudiar estas interacciones mediante estrategias bioinformáticas, con el desarrollo de simulaciones de la dinámica molecular de la enzima en estas situaciones (Santa et al., 2005). En la Figura 1.13 se muestra la estructura tetramérica de la D-xilosa (D-glucosa)

isomerasa de *Bacillus stearothermophilus*. Otras estructuras cuaternarias incluyen dímeros y tetrameros.

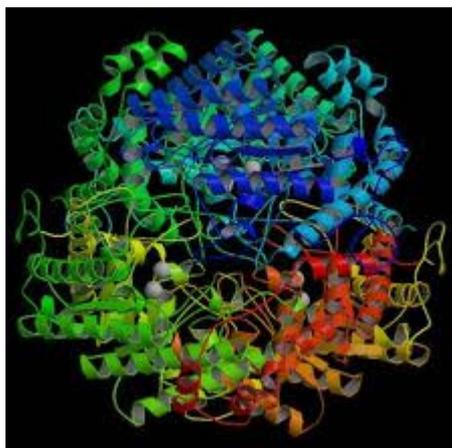


Figura 1.13. Estructura de la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de *Bacillus stearothermophilus*.

La capacidad catalítica de la enzima ha sido empleada como la base de diversos procesos industriales y biotecnológicos (Fig. 1.14). El proceso industrial de producción de jarabes de alto contenido en fructosa (HFCS) ha sido extensamente estudiado y progresó hacia una automatización temprana por su alto valor económico (Gram et al., 1990; Khalilpour y Roostaazad, 2008).

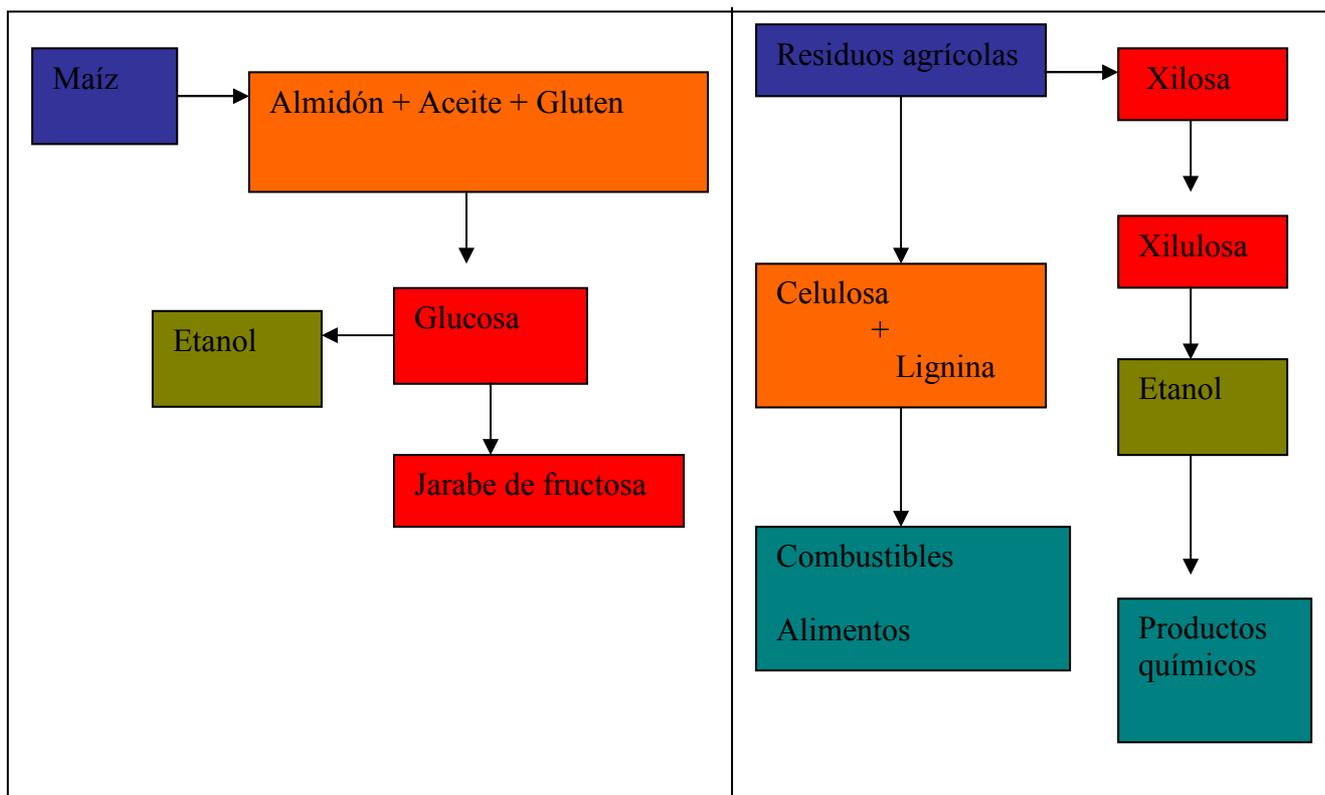


Figura 1.14. Procesos industriales en los cuales se emplea la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.

Los porcentajes de D-fructosa obtenidos en el equilibrio varían con la temperatura de reacción y se ubican entre 43.5% y 50% de D-fructosa a 25°C y 55°C, respectivamente (Tabla 1.9).

Tabla 1.9. Influencia de la temperatura sobre el equilibrio de la reacción de isomerización D-glucosa/D-fructosa catalizada enzimáticamente (Bhosale et al., 1996).

Temperatura (°C)	Concentración de fructosa (%)
25	43.5
45	48.2
55	50
65	51.5
75	53.1
85	54.7

Si bien el porcentaje de conversión aumenta con la temperatura, la operación a altas temperaturas plantea algunos problemas de estabilidad del biocatalizador.

La D-xilosa (D-glucosa) isomerasa está ampliamente distribuida en procariotas (Tabla 1.10). Luego de su descubrimiento en *Pseudomonas hydrophila*, se encontró un gran número de bacterias y actinomicetos que la producen. Entre las bacterias heterolácticas, *Lactobacillus brevis* produce el mayor volumen de enzima comparativamente (Bor et al., 1992; Lindén y Hahn-Hägerdal, 1993). Esta enzima es activa a bajo pH pero inestable a alta temperatura y por lo tanto inadecuada para explotarse con fines comerciales. En la mayoría de los casos se trata de una enzima intracelular. Las D-xilosa (D-glucosa) isomerasas extracelulares no son comunes. Se han reportado en el caso de *Streptomyces glaucescens* y *S. flavogriseus*, para las que la liberación de la enzima desde las células es atribuida a un cambio de permeabilidad de la pared y lisis parcial. Así como *Streptomyces*, muchos *Bacillus* son buenos productores de D-xilosa (D-glucosa) isomerasas. También la producen algunas levaduras como *Candida utilis* y *Candida boidinii*. *Aspergillus oryzae* es el único hongo con actividad D-xilosa (D-glucosa) isomerasa descubierto hasta el momento. Asimismo, se ha reportado la existencia de la enzima en germen de trigo.

Entre las fuentes de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa empleadas comercialmente se destacan *Actinoplanes missouriensis*, *Bacillus coagulans*, y especies de *Streptomyces* y *Arthrobacter* (Gaikwad y Deshpande, 1992; Bhosale, 1996; Hartley et al., 2000; Dauter et al., 1989). Las cantidades de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa obtenidas de varios organismos que se han listado en la Tabla 1.10, rondan entre las 1000 y 35000 U/L.

Tabla 1.10. Algunas fuentes de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (Bhosale et al., 1996).

<i>Actinomyces olivocinereus</i>
<i>Actinoplanes missouriensis*</i>
<i>Aerobacter cloacae</i>
<i>Aerobacter levanicum</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Cortobacterium helvolum</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Flavobacterium arborescens</i>
<i>Flavobacterium devorans</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus fermenti</i>
<i>Lactobacillus gayonii</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Pseudomonas hydrophila</i>
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>
<i>Streptomyces rubiginosus*</i>

*Fuentes comerciales.

La enzima se produce en fermentadores aeróbicos sumergidos. La mayoría de los productores de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa requieren D-xilosa para inducir la producción de la enzima. Sin embargo la xilosa es cara y su empleo es poco práctico a nivel industrial. Como alternativa se han empleado con mayor o menor éxito, almidón, glucosa, sorbitol o glicerol en lugar de xilosa. *Streptomyces* y *Bacillus thermoantarcticus* son capaces de crecer sobre xilanos y materiales que los contengan (Çalik et al., 2009). *Actinoplanes*, cepas mutantes de *Bacillus coagulans* y *Streptomyces olivochromogenes*, son capaces de inducir la producción de la enzima en presencia de glucosa. Una de las cepas de *A. missouriensis* produce la enzima de manera constitutiva.

La fuente de nitrógeno es un factor crítico y necesita optimizarse para cada fuente de la enzima. Fuentes de nitrógeno complejas se usan con cierto éxito, pero sólo en el caso de ciertos organismos productores. Peptona, extracto de levadura, o sales de amonio pueden usarse con *B. coagulans*, pero la urea y el nitrato no son adecuados. Existen fuentes de nitrógeno más baratas pero su empleo es limitado por su gran variabilidad lote a lote y efectos estacionales. Las alternativas al licor de maíz son la harina de soja (50% más producción que con dicho licor). La adición de determinados aminoácidos mejora la producción de la enzima en *Streptomyces violaceoruber*.

La naturaleza de la fuente de nitrógeno afecta el pH y consecuentemente la producción de la enzima. La mayoría de las fermentaciones se realizan entre pH 7.0-8.0 sin control de pH. *Streptomyces*, *Arthrobacter* y *A. missouriensis* crecen a 30°C, en tanto que los *Bacillus* termófilos

lo hacen a 50-60°C. El período de fermentación varía de 6-48 horas dependiendo del tipo de cultivo.

La producción requiere la presencia de cationes divalentes en el medio. Sin embargo, los requerimientos específicos dependen de la fuente. El cobalto es esencial para las cepas de *Streptomyces*, en tanto que *Bacillus coagulans* requiere manganeso o magnesio. En general, las sales de cobalto son necesarias para los *Streptomyces* mesófilos pero no para los termófilos. Asimismo algunos organismos como *Arthrobacter* y *Streptomyces olivaceus* no requieren cobalto para una producción óptima.

Existen reportes de la purificación de varias D-xilosa (D-glucosa) isomerasa. Dado que es una enzima intracelular en la mayor parte de los casos, la enzima debe extraerse de las células por disrupción mecánica, o lisis con lisozima, detergentes cationicos, tolueno, etc.. Las D-xilosa (D-glucosa) isomerasas de especies de *Chaina* y de *Bacillus* alcalotermófilos se han purificado por técnicas convencionales como gel filtración, intercambio iónico y electroforesis en poliacrilamida preparativa. La ingeniería de proteínas ha permitido generar proteínas de fusión con señales de localización no citoplasmáticas que facilitan la purificación (Sariyar et al., 2004). Se ha reportado la purificación por métodos convencionales involucrando tratamiento térmico, precipitación con sulfato de amonio-acetona-Mg⁺⁺/Mn⁺⁺, intercambio iónico y/o gel filtración. Existe la posibilidad de emplear cromatografía de afinidad para la purificación, por ejemplo en el caso de la enzima de *Streptomyces*, se ha empleado un adsorbente xilitol-Sepharose. Se han desarrollado otros bioadsorbentes basados en los ligandos xilitol o manitol inmovilizados en Biogel-P 100 o silocromo. Finalmente también existen reportes de purificación a partir de *Streptomyces* por técnicas de inmunoafinidad.

Los esfuerzos actuales están dirigidos fundamentalmente a reemplazar la xilosa por un inductor más barato, evaluar el efecto de emplear fuentes de nitrógeno más baratas y optimizar la temperatura y el pH para maximizar la producción, así como sustituir los iones Co⁺⁺ por otros iones divalentes en el medio de fermentación. No hay un medio típico para cultivar un productor de glucosa isomerasa y esto depende grandemente de la cepa. Cada cepa requiere condiciones distintas de cultivo que le son propias para una producción eficiente de la enzima. La D-xilosa (D-glucosa) isomerasa proveniente de diversas fuentes se ha expresado en vectores como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*; esta estrategia depende en gran medida del origen de la glucosa isomerasa. Por ejemplo, las glucosa isomerasas de *Thermus thermophilus* y *Piromyces* sp. se han expresado con relativo éxito en *Saccharomyces cerevisiae*, y su actividad se ha mejorado mediante mutagénesis dirigida de residuos situados en la interfase de sus subunidades (Xu et al., 2009), en tanto que la de *Streptomyces rubiginosus* expresada en el mismo vector no es activa

(Gárdonyi y Hahn-Hägerdal, 2003). La expresión en levaduras es sin embargo tecnológicamente importante dado el potencial de las mismas para transformar D-xilulosa (producto de la acción de la D-glucosa isomerasa sobre xilanos y otros materiales hemicelulósicos hidrolizados) en etanol (Roman et al., 1985; Ho et al., 1993).

En la Tabla 1.11 se listan las condiciones sugeridas para la producción de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa. Datos similares también se proporcionan para la producción de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, si bien no se trata de una enzima que se produzca comercialmente.

Tabla 1.11. Condiciones de cultivo de algunos productores de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.

Organismos productores de glucosa isomerasa	<i>Requiere iones metálicos</i>	<i>pH óptimo</i>	<i>Temperatura óptima(°C)</i>	<i>Fuente de nitrógeno</i>	<i>Inductor</i>
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Mn ²⁺ /Mg ²⁺	7.0	30°C	CSL	Glucosa
<i>Bacillus licheniformis</i>	Mn ²⁺ /Mg ²⁺	7.3	40°C	Peptona	Xilosa
<i>Streptomyces wedmorensis</i>	Co ²⁺	7.2	30°C	CSL	Xilanos
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> y <i>rubiginosus</i>	Co ²⁺	7.5	30°C	CSL	Glucosa
Organismos productores de galactosa isomerasa					
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Co ²⁺ /Mn ²⁺	7.0	50°C	Extracto de levadura	arabinosa
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Mn ²⁺	7.0	55°C	Peptona	arabinosa
<i>Thermotoga neapolitana</i> y <i>maritima</i>	Co ²⁺ /Mn ²⁺	7.0	60°C	Peptona	arabinosa
<i>Bacillus halodurans</i>	Mn ²⁺	7.5	50°C	Peptona	arabinosa

El pH óptimo de las D-xilosa (D-glucosa) isomerasas se sitúa entre 7.0 y 9.0 (Tabla 1.12), si bien existen diferencias entre las formas soluble e inmovilizada de la enzima y en general, se constata un corrimiento hacia pH mayores en las formas inmovilizadas (Bhosale et al., 1996). La temperatura óptima por su parte, se encuentra en el rango de 50-80°C (Tabla 1.12) y se incrementa en presencia de Co²⁺. La actividad catalítica requiere Mg²⁺ o Mn²⁺, en tanto que el Co²⁺ actúa como estabilizante en la mayoría de estas enzimas (Bhosale et al., 1996). La mayor parte de las D-xilosa (D-glucosa) isomerasas son inhibidas por elevadas concentraciones de Ca²⁺, lo que constituye un obstáculo para su aplicación sobre suero de quesería lactosa-hidrolizado. Se han estudiado las causas de la termoestabilidad de la glucosa isomerasa del termófilo *Streptomyces* sp. SK (Borgi et al., 2004). Esta actividad ha sido expresada en *Streptomyces violaceoniger* (Mezghani et al., 2005) y se ha reportado recientemente la obtención de una variante de la enzima que no presenta inhibición por Ca²⁺, y que es independiente del ion Co²⁺ (Hlima et al., 2012).

Tabla 1.12. Condiciones óptimas para algunas D-xilosa (D-glucosa) isomerasas (Bhosale et al., 1996).

<i>Organismo</i>	<i>Temperatura óptima(°C)</i>	<i>pH óptimo</i>
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	75	7.0
<i>Bacillus licheniformis</i>	70	No establecido
<i>Streptomyces wedmorensis</i>	70	7.2
<i>Streptomyces olivochromogenes y rubiginosus</i>	60	7.5

Ciertas D-xilosa (D-glucosa) isomerasas han sido inmovilizadas (Gaikwad y Deshpande, 1992; Bhosale et al., 1996), lo que representa un avance tecnológico significativo, pues se trata de una enzima intracelular y de alto costo de producción (Tabla 1.13). De hecho, las alternativas más utilizadas para el incremento de la termoestabilidad de las glucosa isomerasas de interés industrial han sido clásicamente la inmovilización y la modificación genética, complementarias a la búsqueda de nuevas fuentes de la enzima en microorganismos termófilos (Quax, 1993).

En esta investigación se ha avanzado en el desarrollo de un proceso multienzimático integrado para la transformación de la lactosa presente en el suero de quesería en un jarabe enriquecido en azúcares de mayor poder edulcorante, tales como fructosa y tagatosa. La fructosa posee un poder edulcorante superior al de la glucosa y sacarosa, en tanto la tagatosa puede a su vez utilizarse como sustituto de la sacarosa, como agente edulcorante en alimentos, y no tiene retrogusto, habiéndose demostrado su efecto prebiótico (Oh, 2007). El producto resultante de esta biotransformación podría resultar de interés para diversas aplicaciones en la industria alimentaria.

Tabla 1.13. Métodos empleados para la inmovilización industrial de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.

Origen	Método de inmovilización
Inmovilización de enzima libre	
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Adsorción en resina de intercambio aniónico.
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Entrecruzamiento con glutaraldehído en alúmina tratada con polietilimina.
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	DEAE-celulosa aglomerado con poliestireno y TiO ₂ .
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Adsorción a partículas de SiO ₂ seguida de entrecruzamiento con glutaraldehído.
Inmovilización de células	
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Oclusión en gelatina seguida de entrecruzamiento con glutaraldehído.
<i>Flavobacterium arborescens</i>	Células entrecruzadas con glutaraldehído y poliamina, extrudadas y granuladas.
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	Quitosano tratado con glutaraldehído como agente de entrecruzamiento.
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Células tratadas térmicamente unidas a una resina de intercambio aniónico.
<i>Streptomyces murinus y Bacillus coagulans</i>	Extrudado de células entrecruzadas con glutaraldehído.

2. Objetivos

Objetivo general

Desarrollo de un sistema trienzimático en fase sólida para la transformación de la lactosa presente en el suero de quesería en un jarabe enriquecido en fructosa y tagatosa.

Objetivos específicos

- Desarrollo y caracterización de biocatalizadores en base a β -galactosidasa de *Bacillus circulans* inmovilizada en soportes acrílicos epoxi-activados.
- Producción, purificación y caracterización parcial de una L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.
- Desarrollo y caracterización de biocatalizadores en base a D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa inmovilizadas en soportes acrílicos epoxi-activados.
- Estabilización térmica de estos biocatalizadores a través de estrategias post-inmovilización, combinando procesos de tratamiento alcalino y bloqueo.
- Aplicación de los derivados estabilizados de β -galactosidasa en procesos de biotransformación de lactosa en sueros de quesería.
- Estudios funcionales de sistemas bi- y trienzimáticos en base a β -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y/o D-xilosa (D-glucosa) isomerasa inmovilizadas individualmente, en procesos mono- y bi-reactor, para obtener jarabes enriquecidos en tagatosa y/o fructosa a partir de lactosueros.
- Coinmovilización y estabilización de sistemas bi- y trienzimáticos en base a β -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y/o D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.
- Aplicación de sistemas bi- y trienzimáticos coinmovilizados para obtener jarabes enriquecidos en tagatosa y fructosa a partir de lactosueros y nanofiltrado de sueros.

- ✿ Estabilización operativa de los distintos derivados enzimáticos por entrapamiento en perlas de alginato de calcio.

- ✿ Aplicación de los biocatalizadores estabilizados por entrapamiento en procesos de biotransformación de lactosa en sueros de quesería y nanofiltrado de sueros.

3. Estrategias de investigación

La hipótesis de trabajo supone que la aplicación de un sistema de bio-reactores en base a enzimas en fase sólida permitiría realizar una biotransformación eficiente de la lactosa en productos de interés, en base al incremento de estabilidad térmica, mecánica y funcional de los biocatalizadores. Dentro de esta línea se plantea el desarrollo y estabilización de biocatalizadores en base a la β -galactosidasa de *Bacillus circulans*, una L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa purificada de *Enterococcus faecium* y una D-xilosa (D-glucosa) isomerasa comercial de fuente *Streptomyces rubiginosus*, las cuales serán inmovilizadas o coinmovilizadas en soportes acrílicos epoxi-activados, llevándose a cabo la caracterización de los derivados en fase sólida, y aplicándose los mismos de modo secuencial o simultáneo en procesos de lactólisis e isomerización en sueros de quesería. De esta forma, la glucosa y galactosa resultantes del proceso de lactólisis se isomerizarán parcialmente en las respectivas cetohexosas mediante las aldosa-cetosa isomerasas mencionadas, con el objetivo de obtener un jarabe enriquecido en fructosa y tagatosa, de alto poder edulcorante (Fig. 3.1).

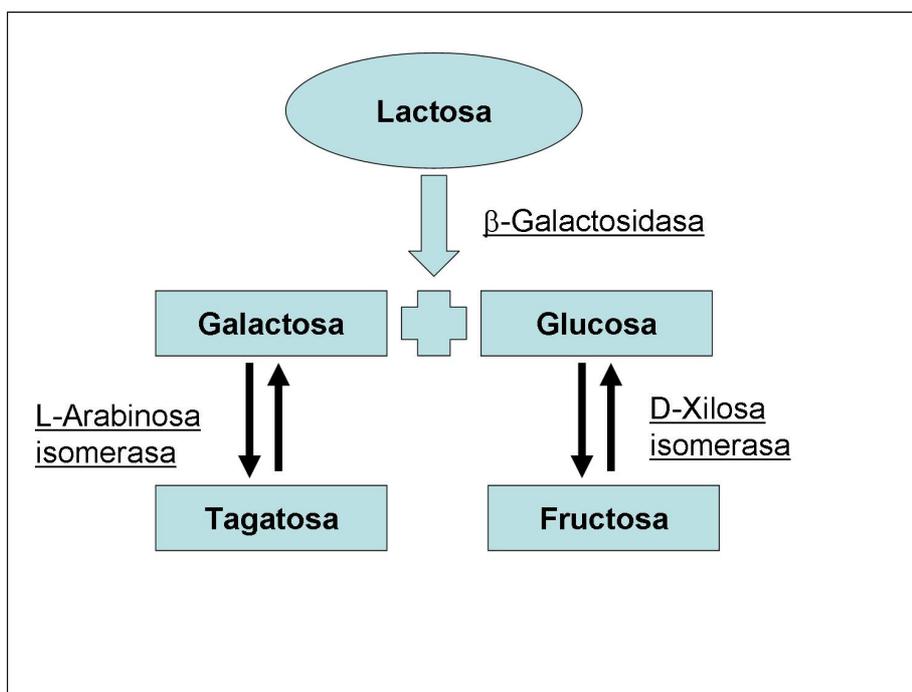


Figura 3.1. Esquema general del proceso trienzimático planteado.

Las tres enzimas mencionadas fueron seleccionadas por presentar condiciones operativas y requerimientos que resultan compatibles con las características del lactosuero como sustrato, pudiendo ser aplicadas en forma conjunta.

La β -galactosidasa de *Bacillus circulans* (parcialmente purificada, Daiwa Kasei), se utilizó para la hidrólisis de la lactosa del lactosuero originando una mezcla de glucosa y galactosa. Esta enzima se seleccionó en base a su pH óptimo (5.0-7.0) el cual está en el rango de pH de los

lactosueros. Es una enzima extracelular y su estabilidad térmica es mayor que la de gran parte de las β -galactosidasas de levaduras. Además no requiere cofactores metálicos para su actividad.

Para la transformación parcial de D-glucosa en D-fructosa se emplearon D-xilosa (D-glucosa) isomerasa soluble de *Streptomyces rubiginosus* (Hampton Research) o un derivado inmovilizado comercial de la enzima de la misma fuente microbiana (Gensweet IGI, Genencor) Por su parte, para la transformación parcial de D-galactosa en D-tagatosa se utilizó la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *E. faecium*, la cual ha sido producida y purificada en este trabajo.

Las tres enzimas seleccionadas pueden operar en conjunto, dado que sus requerimientos catalíticos son compatibles. En el caso de las cetoisomerasas, ambas requieren iguales cofactores metálicos para su actividad, y la temperatura y pH óptimos son similares, y están en el rango de actividad de la lactasa.

La posibilidad de desarrollar las reacciones a mayor temperatura, sumado a la acción conjunta de múltiples enzimas, conduciría a un mayor porcentaje de conversión de sustrato, con exclusión del crecimiento microbiano, siendo de gran importancia la obtención de derivados térmicamente estables y cuyas condiciones de operación sean compatibles entre sí y con el sustrato a transformar. Dicha termoestabilidad puede alcanzarse y/o mejorarse mediante inmovilización y posterior estabilización.

Estas enzimas se inmovilizarán empleando distintos tipos de resinas acrílicas epoxi-activadas, debido al potencial de dichos soportes en aplicaciones industriales, buscando obtener derivados más estables que la enzima en solución. El uso de resinas acrílicas como alternativa a los soportes tradicionales (como la agarosa) para la inmovilización de estas enzimas permitiría utilizar los derivados insolubles obtenidos con fines tecnológicos. En nuestro caso se evaluarán tres estrategias para la estabilización de los biocatalizadores en fase sólida, a saber: incubación post-inmovilización en condiciones alcalinas (para favorecer la unión multipuntual enzima-soporte), bloqueo de grupos reactivos remanentes, y entrapamiento en partículas de alginato de calcio (Fig. 3.2).

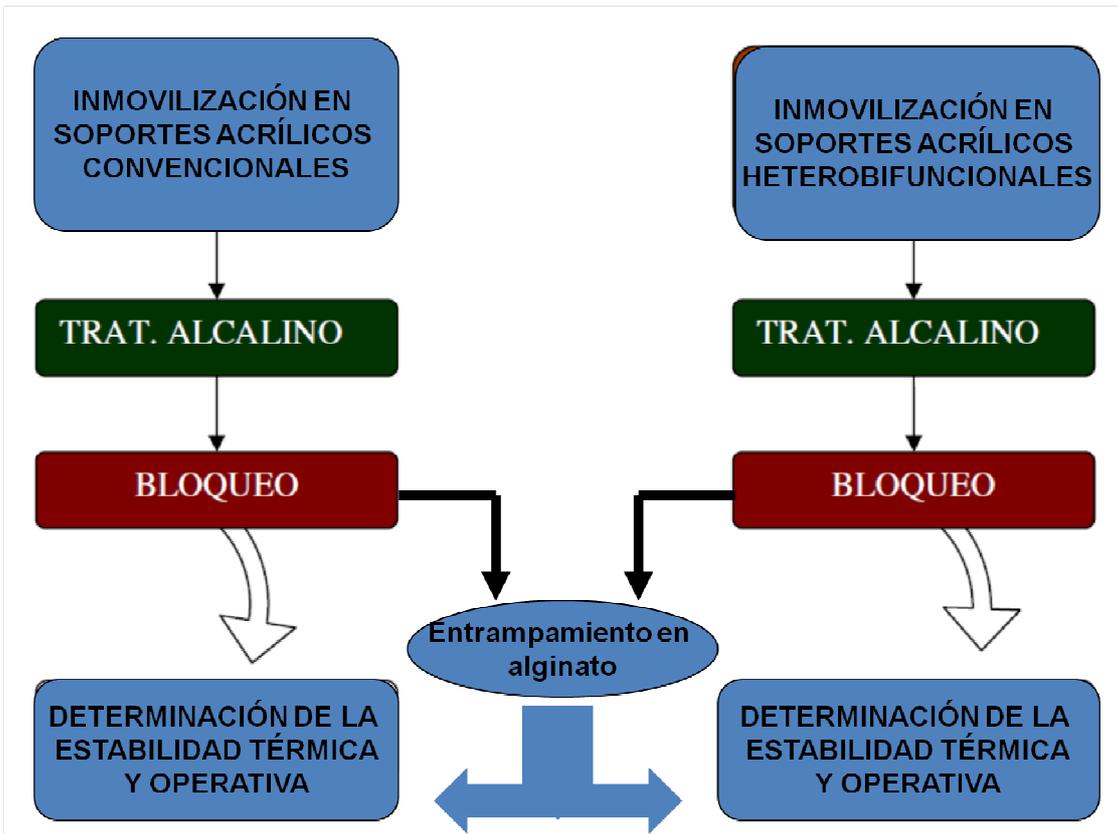


Figura 3.2. Estrategias de estabilización térmica y operacional de biocatalizadores en fase sólida utilizadas en este trabajo.

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales

La enzima β -galactosidasa de *B. circulans* (Biolacta N-5) fue donada por Daiwa Kasei (Osaka, Japón), la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de *Streptomyces rubiginosus* se obtuvo de Hampton Research (Aliso Viejo, CA) y Genencor (Palo Alto, CA). Los soportes Eupergit C y Eupergit C 250 L, Sepabeads EC-EP y Sepabeads EC-HFA fueron donados por Röhm Pharma (Darmstadt, Alemania) y Resindion (Milán, Italia), respectivamente. Los geles QAE-Sephadex, QAE-Sepharose, agarosa, agarosa epoxi-activada, Sephadex G-25, DEAE-Sepharose y CM-Sephadex, así como los geles, marcadores de PM y pI, y demás insumos para electroforesis e isoelectroenfoque (PhastSystem) fueron adquiridos de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). El o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), todos los azúcares empleados en este trabajo, el clorhidrato de L-cisteína, el carbazol y el β -mercaptoetanol fueron adquiridos de Sigma (San Luis, MO). El reactivo en base a ácido bicinonínico (BCA) fue comprado de Pierce (Rockford, IL). Todos los demás reactivos y sustancias utilizadas fueron de grado analítico. El kit enzimático para la determinación de glucosa provino de Spinreact S.A. (Sant Esteve de Bas, España). Los lactosueros fueron una donación de CONAPROLE (Cooperativa Nacional de Productores de Leche, Uruguay).

4.2. Cultivo de microorganismos y preparación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa

4.2.1. Producción de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *Enterococcus faecium*

Para la obtención del cultivo final, a partir del conservado de la cepa del microorganismo (*Enterococcus faecium* DBFIQ E36), se realizaron dos resiembras sucesivas en MRS y se inoculó una alícuota de 180 mL de esta segunda resiembra a 6000 mL de medio MRS modificado con 0,1% (p/v) de D-glucosa y 0,5% (w/v) de L-arabinosa, de manera de alcanzar una concentración del inóculo del 3% (v/v). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Al final del período de incubación, el cultivo bacteriano fue centrifugado a 3000 g durante 15 minutos a 4°C, en condiciones de esterilidad; las células obtenidas fueron lisadas por sonicación pulsada a 20 W durante 60 minutos a 4 °C (pulse on, 4s; pulse off, 3 s). La suspensión obtenida fue centrifugada a 20000 g por 30 minutos a 4 °C, de modo de eliminar los detritos celulares producidos. Finalmente,

el homogenato obtenido fue esterilizado por filtración empleando membranas de 0,22 µm de tamaño de poro (Sartorius), alicuotado y almacenado para su posterior uso (Heckly, 1978).

4.2.2. Purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa

Al homogenato obtenido se lo sometió inicialmente a una precipitación salina con sulfato de amonio 80-85% de saturación. La precipitación se llevó a cabo durante 24 horas a 4 °C con agitación. La suspensión resultante fue sometida a una centrifugación a 12000 g durante 30 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante. El precipitado obtenido fue disuelto en 100 mL de amortiguador fosfato 50 mM pH 7.0 (amortiguador de actividad para esta enzima). Dicha solución proteica se sometió a gel filtración en una columna de Sephadex G-25, equilibrada en amortiguador de actividad. La fracción eluída en el volumen muerto se utilizó como muestra de partida para todos los ensayos de purificación posteriores, analizando la eficiencia de distintas estrategias.

Cromatografía HIC

Con el objetivo de estudiar el comportamiento del extracto proteico y, en particular, de la enzima, frente a una resina hidrofóbica, se realizaron dos cromatografías de interacción hidrofóbica (HIC) en modo batch empleando dos resinas diferentes (Phenyl-Sepharose Fast-Flow y Octyl-Sepharose CL-4B).

Se incubaron 2.50 g de Phenyl-Sepharose o 2.75 g de Octyl-Sepharose con 4 mL de extracto sin gel filtrar en amortiguador de actividad durante 45 minutos. La elución se efectuó con un gradiente escalonado de NaCl. La concentración de proteínas en las distintas fracciones se monitoreó midiendo la absorbancia a 280 nm. A su vez se determinó la actividad enzimática en todas las fracciones utilizando D-galactosa como sustrato. La concentración de proteínas en las fracciones activas se determinó mediante el método de BCA.

Intercambio iónico

Este ensayo consistió en la aplicación secuencial de dos procesos cromatográficos de intercambio aniónico: cromatografía con DEAE-Sepharose en modos continuo o batch, seguida de cromatografía con QAE-Sephadex en modo batch.

Se efectuó una cromatografía de intercambio iónico en la resina DEAE-Sepharose en modo batch, incubando 2 g de intercambiador previamente equilibrado en el amortiguador de actividad con 3.5 mL de extracto gel filtrado con agitación. La elución se realizó con un gradiente escalonado

con concentraciones crecientes de NaCl entre 0.1 M y 1.0 M. La concentración de proteínas y la actividad enzimática en las fracciones, se determinaron como se explicó en el apartado anterior.

A su vez se evaluó la eficiencia de una cromatografía de intercambio en la resina DEAE-Sephrose en modo continuo. Para ello se utilizó una columna (1,4 cm de diámetro por 3,9 cm de altura), equilibrada en el amortiguador de actividad. Se aplicaron 31,5 mL de muestra gel filtrada y se recircularon por la columna durante dos horas. El flujo utilizado durante la cromatografía fue de 0,40-0.50 mL min⁻¹, manteniéndose constante durante todo el desarrollo de la misma. Luego de la recolección del percolado, se procedió a la elución de las proteínas adsorbidas aplicando un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl en amortiguador de actividad.

La fracción con mayor actividad se sometió a una cromatografía en modo batch incubando durante 45 minutos, 7 g del gel QAE-Sephadex con 6 mL de muestra desalinizada en amortiguador de actividad. La elución se realizó en batch empleando un gradiente de 0.1-0.9 M de NaCl.

Cromatografía de afinidad

Se ensayó el comportamiento de la muestra conteniendo la actividad de la enzima LAI frente a los siguientes bioadsorbentes: D-arabinosa-agarosa, L-ribitol-agarosa y L-arabitol-agarosa, basados en la unión covalente de ligandos que tienen similitud estructural con el sustrato de la enzima o son inhibidores conocidos de otras L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas.

A 2,0 mL de bioadsorbente empacado en una columna NAP-5 equilibrada en amortiguador fosfato 100 mM pH 7.5, se le aplicó con la ayuda de una bomba peristáltica el pellet redisuelto y gel filtrado de la precipitación salina con sulfato de amonio al 85%, el cual fue recirculado durante dos horas a 25°C. Tras separar el percolado, la columna se lavó con 2 volúmenes del mismo amortiguador. La elución se realizó con una solución 30-35 mM del ligando correspondiente. Finalmente, las muestras se gel filtraron para eliminar el mismo. Todas las muestras fueron monitoreadas por medida de la A₂₈₀ y se determinó actividad y concentración de proteínas en aquellas fracciones más relevantes.

Preparación de bioadsorbentes

Para la preparación de los bioadsorbentes se siguió el método descrito por Sundberg y Porath (1974), modificado en atención a los ligandos particulares a inmovilizarse. Se lavaron 6 g de agarosa epoxi-activada con 100 mL de agua desmineralizada seguido por un lavado con 100 mL de NaOH 0,5 M (pH 13-14). Dicho gel se suspendió en 6 mL de una solución de D-arabinosa, L-

ribulosa o L-arabitol al 10 o 20 %, y las suspensiones fueron incubadas a 25°C bajo agitación constante durante 16 horas. Posteriormente, los geles fueron filtrados filtraron y lavados con 150 mL de una solución 0,5M de NaOH. Luego, se procedió al bloqueo de grupos epóxido remanentes en los geles con β -mercaptoetanol 150 mM (60 μ L en 6 mL de NaOH 0.5M) a temperatura ambiente durante 1 hora. Por último, cada bioadsorbente fue lavado exhaustivamente con agua destilada y equilibrado con amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.0 (amortiguador de actividad para esta enzima).

La Figura 4.1 describe en detalle las dos últimas estrategias de purificación mencionadas.

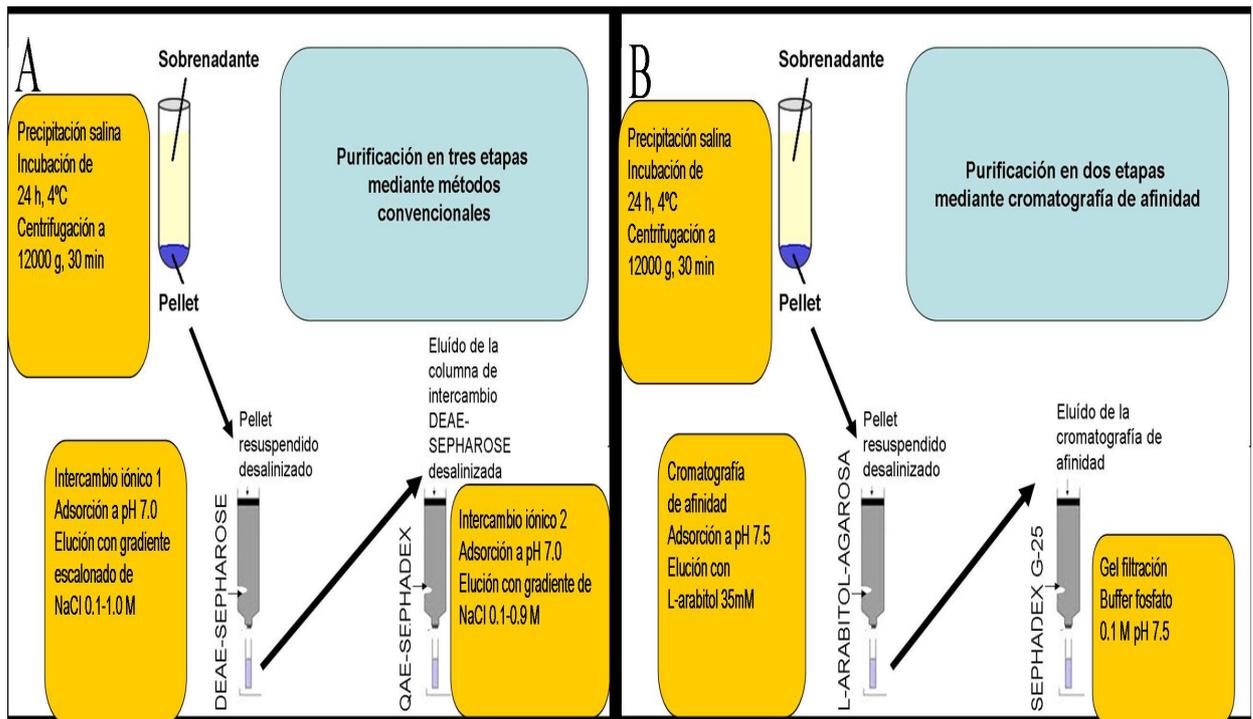


Figura 4.1. Procedimientos para la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa. A. Intercambio iónico; B. Cromatografía de afinidad.

4.3. Acondicionamiento de enzimas solubles

4.3.1. β -Galactosidasa

Alícuotas de 0.5 g de la preparación comercial (Biolacta N-5, Daiwa Kasei) se disolvieron en 5 mL de amortiguador fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0, y se incubaron durante 1 hora a 25°C con agitación. Posteriormente la enzima fue parcialmente purificada mediante un único paso de gel filtración en una columna comercial de Sephadex G-25, para remover aditivos e impurezas de bajo peso molecular.

4.3.2. D-Xilosa isomerasa

D-Xilosa (D-glucosa) isomerasa Hampton

La preparación comercial se diluyó 1/10 en fosfato de potasio 0.1 M pH 7.5 y se gel filtró en Sephadex G-25 para remover el sulfato de amonio y otros aditivos de bajo peso molecular.

D-Xilosa (D-glucosa) isomerasa Genencor

El derivado comercial IGI (Genencor) fue hidratado, lavado y equilibrado en amortiguador fosfato de sodio 0.1M pH 7.5 a temperatura ambiente con agitación, durante una hora.

Con la finalidad de extraer parcialmente esta enzima, el derivado comercial IGI (Genencor) se sometió a un pH de 5.0 durante 90 minutos con agitación, separándose la fracción soluble por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos.

4.3.3. L-Arabinosa (D-galactosa) isomerasa

El extracto de partida fue el generado en la etapa de purificación correspondiente. Tanto la fracción redisuelta de la precipitación con sulfato de amonio, como aquellas provenientes de la purificación parcial por intercambio iónico y la purificación por cromatografía de afinidad en L-arabitol-agarosa fueron gel filtradas en Sephadex G-25 y empleadas para los correspondientes ensayos de inmovilización.

4.4. Inmovilización

La preparación de derivados se realizó por inmovilización en los soportes epoxi-activados Eupergit C, Eupergit C 250 L, Sepabeads EP y Sepabeads HFA. La optimización de las condiciones de inmovilización incluyó estudios con diferentes amortiguadores (fosfato, citrato, citrato-fosfato y Tris-HCl), fuerzas iónicas (en el rango 0.75-1.4 M), pH (en el rango 4-9), períodos de incubación y cargas enzimáticas aplicadas (3-120 mg de proteína/g de gel). Los protocolos optimizados se describen a continuación.

4.4.1. Eupergit C y Eupergit C 250 L

La inmovilización en Eupergit C o Eupergit C 250 L se llevó a cabo a 25°C con agitación en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5 durante 24 h. Los derivados se colectaron en un filtro de vidrio sinterizado y se lavaron con amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5, amortiguador

fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 (para remover aquellas proteínas no unidas covalentemente) y amortiguador fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0, pH 7.0pH 7.5 (amortiguadores de actividad que corresponden a β -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa isomerasa, respectivamente). Los grupos epóxido remanentes se bloquearon con β -mercaptoetanol 0.2 M durante 4 h a 4°C o glicina 3 M pH 8.5 durante 24 h a 25°C.

4.4.2. Sepabeads EC-EP

La inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads EC-EP se realizó a 25°C durante 48 horas en amortiguador fosfato de potasio 1.4 M pH 8.5, con agitación. El derivado se filtró y lavó con amortiguador fosfato de potasio 1.4 M pH 8.5, amortiguador fosfato de sodio 0.1 M pH 8.5 y finalmente con el amortiguador de actividad correspondiente. Los grupos reactivos remanentes se bloquearon como se describe en el apartado anterior.

4.4.3. Sepabeads EC-HFA

La β -galactosidasa se inmovilizó en Sepabeads HFA a 25°C con agitación en amortiguador fosfato de potasio 20 mM pH 7.5 (protocolo 1a) o 8.5 (protocolo 1b) durante 24 h. Se diseñó un protocolo alternativo (protocolo 2) incubando la enzima con el soporte a pH 7.5 durante 6 h y a pH 8.5 por un período adicional de 18 h. El derivado obtenido se filtró y lavó con amortiguador fosfato de potasio 20 mM pH 7.5 (protocolo 1a) o 8.5 (protocolos 1b y 2), amortiguador fosfato de sodio 1 M pH 7.5 (protocolo 1) o 8.5 (protocolos 1b y 2) y finalmente con el amortiguador de actividad correspondiente. Los grupos reactivos remanentes se bloquearon como se describe para los soportes Eupergit C y Eupergit C 250 L.

4.4.4. Parámetros de inmovilización

El rendimiento de inmovilización en términos de proteínas se definió como el porcentaje de proteínas halladas en el gel respecto a la cantidad de proteínas aplicada.

$$P = (P_{\text{gel}}/P_{\text{aplicada}}) \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

El rendimiento en actividad enzimática (eficiencia de inmovilización) se definió como el porcentaje de actividad expresada en el derivado respecto a la cantidad de enzima total ligada al gel.

$$A_1 = [A_{\text{gel}} / (A_{\text{aplicada}} - A_{\text{sobrenadante}} - A_{\text{lavados}})] \times 100 \text{ (Ec. 2)}$$

El rendimiento en términos de actividad inmovilizada se definió como el porcentaje de actividad expresada en el derivado respecto a la actividad total aplicada.

$$A_2 = [A_{\text{gel}} / A_{\text{aplicada}}] \times 100 \text{ (Ec. 3)}$$

4.4.5. Estabilización térmica

Estabilización por tratamiento alcalino

La inmovilización de las enzimas en Eupergit C o Eupergit C 250 L se realizó durante 24 h en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5. El pH de la suspensión se incrementó a 8.5, y los derivados se incubaron en estas condiciones por períodos adicionales de 8 o 24 h previo al bloqueo.

La inmovilización en Sepabeads EP (o Sepabeads HFA) se llevó a cabo durante 48 h (24 h en el caso del Sepabeads HFA) en amortiguador fosfato de potasio 1.4 M pH 8.5 (fosfato de potasio 0.2 M pH 7.5 o 8.5 durante 6 y 18 horas, respectivamente, para Sepabeads HFA). Para su estabilización, los derivados fueron incubados a pH 8.5 por períodos adicionales de 8 o 24 horas previo al bloqueo.

Estabilización por entrapado

Los derivados enzimáticos fueron entrapados de dos formas, a saber: encerrándolos en una membrana tubular de diálisis de tamaño molecular de corte nominal de 1000 Da (fijándose en el reactor sobre las paletas de agitación mecánica), o encapsulándolos en esferas de alginato de calcio, de acuerdo al procedimiento reportado por Yadav y Jadhav (2005) para entrapar enzimas solubles preinmovilizadas en sílica mesoporosa hexagonal, con modificaciones. Se prepararon diversas soluciones acuosas de alginato de sodio al 4% (p/v), a la que se incorporaron bajo agitación vigorosa, cantidades preestablecidas del derivado de manera de formar una serie de suspensiones uniformes. Usando una bomba peristáltica, a cada una de esas suspensiones se las hizo gotear, a través de una aguja hipodérmica, sobre una solución 0,1 M de CaCl₂. El calibre de la aguja hipodérmica y la regulación del caudal de goteo permiten variar el tamaño final de la partícula de biocatalizador entre 2 y 4 mm. A medida que se produce la gelificación, las esferas van perdiendo su apariencia traslúcida para tornarse semiopacas. Las esferas de biocatalizadores, fueron extraídas del baño gelificante después de 1 hora, lavadas con agua destilada y colocadas en agua destilada en la heladera (aproximadamente a 4 °C). La efectividad del proceso de entrapado se verificó por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Se realizó un análisis comparativo del

cambio operado en el biocatalizador, cuando es mantenido en condiciones similares a las de reacción, contrapuesto al de un control mantenido en agua a 4°C, en relación a apariencia y liberación de calcio. La pérdida de calcio al medio de reacción fue seguida a través de un kit colorimétrico para la determinación directa de calcio sérico y urinario (Gindler y King, 1972).

4.5. Propiedades de los derivados insolubles

4.5.1. pH óptimo y estabilidad frente al pH

La influencia del pH sobre la actividad de las enzimas nativas y sus derivados se estudió en el rango de pH 4-9 a 25°C, usando el sustrato correspondiente.

El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima y sus derivados se determinó en el mismo rango por medida de la actividad residual luego de la incubación de los biocatalizadores al pH seleccionado y 25°C por períodos de 1-24 h. Para estos ensayos se utilizaron cantidades de 20-50 mg del derivado escurrido correspondiente.

4.5.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad

La influencia de la temperatura sobre la actividad de las formas solubles y los derivados inmovilizados de las enzimas se determinó en el rango 20-60°C en el correspondiente amortiguador de actividad y con el sustrato respectivo.

4.5.3. Estabilidad térmica

Los ensayos de termoestabilidad se realizaron a diferentes temperaturas en el rango 20-60°C en amortiguador de actividad, incubando las enzimas solubles o los derivados obtenidos en un baño termostático y con agitación por períodos de 1-55 h. Se monitoreó la cinética de inactivación térmica de los biocatalizadores y se determinaron las vidas medias correspondientes de acuerdo al modelo de Sadana y Henley (Sadana y Henley, 1987).

4.5.4. Efecto de cationes sobre la actividad enzimática

Para evaluar el efecto (activador, inhibidor o neutro) sobre la actividad enzimática que produce el agregado de distintos cationes, se analizaron las preparaciones solubles gel filtradas y las inmovilizadas. En el caso de la L-arabinosa isomerasa soluble la preparación purificada debió ser

previamente dializado contra amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,0 conteniendo 10 mM de EDTA, durante un período de 48 horas a 4 °C empleando una membrana de diálisis de 10 KDa de MWCO. A continuación, dicho precipitado se redializó por 24 horas contra amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,0, de manera de eliminar el EDTA incluido en el tratamiento previo. Se efectuaron ensayos enzimáticos en presencia de 1-25 mM de las siguientes sales: MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, BaCl₂, CaCl₂, PdCl₂, SnCl₂ y NH₄Cl. La actividad enzimática obtenida se comparó con la actividad de las mismas muestras en ausencia de estas sales.

4.5.5. Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de las enzimas β -galactosidasa, D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa libre e inmovilizada se determinaron con lactosa, glucosa o galactosa (0-1500 mM), respectivamente, como sustrato en el correspondiente amortiguador de actividad a temperaturas en el rango 30-50°C. Para realizar el cálculo, se asumió una cinética de Michaelis-Menten para las enzimas y se empleó la técnica de linealización de Eadie-Hofstee.

4.6. Aplicaciones.

4.6.1. Desmineralización de lactosuero

Para algunas aplicaciones, el lactosuero debió acondicionarse, eliminando parcialmente el Ca²⁺ debido al efecto inhibitorio de éste sobre la actividad D-xilosa (D-glucosa) isomerasa. La desmineralización se llevó a cabo utilizando una resina de intercambio CM-Sephadex equilibrada en amortiguador fosfato de sodio 0.02 M pH 6.0 (Hoppe y Higgins, 1992) o un gel carboximetil-aspártico (CM-Asp-agarosa) en amortiguador fosfato de sodio 0.02 M pH 6.5. La regeneración de la columna se efectuó empleando el mismo amortiguador suplementado con 1M NaCl. La concentración inicial y final de calcio (que permitan evaluar el grado de desmineralización) se determinaron por reacción con azul de metiltimol (Gindler y King, 1972).

4.6.2. Lactolisis

La enzima β -galactosidasa nativa y sus derivados se utilizaron en procesos de lactolisis en reactores en batch y columna, y se determinó el efecto del empleo de diferentes sustratos, condiciones operativas y configuraciones de bio-reactor. La actividad hidrolítica de los derivados

inmovilizados se determinó bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. Los sustratos utilizados fueron los siguientes: lactosa 4.6 % en amortiguador de actividad, leche descremada bactofugada, lactosueros de queso Mozzarella, Danbo, Pratto, Manchego, Goya, así como permeados y nanofiltrados de lactosueros ajustados a pH 6.0 y sin ajuste de pH. Se separaron alícuotas durante cada proceso, en cada alícuota se detuvo la reacción mediante desnaturalización de la enzima por tratamiento térmico a 100°C durante 5 minutos (biocatalizador soluble) o filtración (biocatalizador en fase sólida), y se analizó su contenido de glucosa. Se verificó que las fracciones solubles no presentaban actividad enzimática.

Procesos en batch

La enzima libre o inmovilizada (20-30 U) se incubó a temperaturas en el rango de 30-60°C con los sustratos mencionados. Los volúmenes de sustrato empleados fueron 10-300 mL y las relaciones enzima-sustrato de 1/10 o 1/100 (v/v).

Procesos en columna

Derivado acrílico

Las columnas se empacaron con derivado (2-4 U) y se utilizaron los mismos sustratos descritos más arriba, los cuales se recircularon a flujos de 0.3 mL/min. Se tomaron muestras a la entrada y salida del reactor durante el proceso de lactolisis. Se determinó la actividad residual del derivado al final del ensayo.

Derivado acrílico entrampado

Lecho fijo

Los biocatalizadores se empacaron en un reactor tubular de 60 mL de volumen total y una relación L/D de 340/14, equipado con camisa calefactora y baño de recirculación. El reactor fue alimentado empleando una bomba peristáltica, en reciclo total con 300 mL de permeado (50 g/L de lactosa) ajustado a pH 6,0, manteniendo un caudal constante de alimentación de 0.5 mL/min y una temperatura de operación de 50 °C.

Lecho expandido

La enzima inmovilizada se empacó en un reactor en columna de volumen total 57.8 mL y relación L/D 340/14, con camisa calefactora y baño de recirculación. El sustrato empleado (lactosa

y permeado) fue termostatzado a 50°C, y bombeado desde un reservorio en la columna a flujos superiores a los 450 mL/h con la ayuda de una bomba peristáltica.

Lecho fluidizado

La enzima inmovilizada se empacó en un reactor en columna de volumen total 120 mL y relación L/D 600/14, con camisa calefactora y baño de recirculación, donde el sustrato termostatzado era bombeado desde un reservorio en la columna con ayuda de una bomba peristáltica.

Reuso

Los derivados aplicados a la hidrólisis de lactosa se lavaron con amortiguador de actividad y se reutilizaron en repetidos ciclos de lactolisis hasta que la actividad residual se redujo por debajo de 50%.

4.6.3. Isomerización de sueros lactosa- hidrolizados (procesos secuenciales)

Los sustratos empleados fueron sueros de queso lactosa-hidrolizados por la acción de β -galactosidasa libre e inmovilizada. Los sueros se trataron con D-xilosa (D-glucosa) isomerasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, y una combinación de ambas enzimas.

Las reacciones de isomerización se llevaron a cabo a 30-50°C empleando sueros de quesería (con y sin ajuste de pH a 7.0), en un volumen de reacción de 10-300 mL. Se tomaron alícuotas durante el proceso, separando el derivado por filtración o inactivando la enzima soluble en las mismas mediante tratamiento térmico a 100°C durante 5 minutos.

Se determinó el efecto del pH y la temperatura sobre la isomerización de distintos sustratos lactosa-hidrolizados en estas condiciones.

4.6.4. Lactolisis e isomerización conjuntas (procesos simultáneos)

Los sustratos empleados fueron sueros de queso y nanofiltrados de sueros. Los sueros se trataron con β -galactosidasa, D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) operando en un único reactor y empleando las formas solubles de estas enzimas, o sus derivados insolubles obtenidos por inmovilización de los biocatalizadores individualmente o por coinmovilización.

Las reacciones de isomerización se llevaron a cabo a 30-50°C empleando sueros de quesería (con y sin ajuste de pH a 7.0), en un volumen de reacción de 10-300 mL. Se tomaron alícuotas durante el proceso, separando el derivado por filtración o inactivando las enzimas solubles en las mismas mediante tratamiento térmico a 100°C durante 5 minutos.

Se determinó el efecto del pH y la temperatura sobre la isomerización de distintos sustratos lactosa-hidrolizados en estas condiciones.

4.7. Métodos analíticos

La Fig. 4.2 muestra una perspectiva de los métodos analíticos utilizados en este trabajo para la determinación de azúcares, actividades enzimáticas y contenido de calcio.

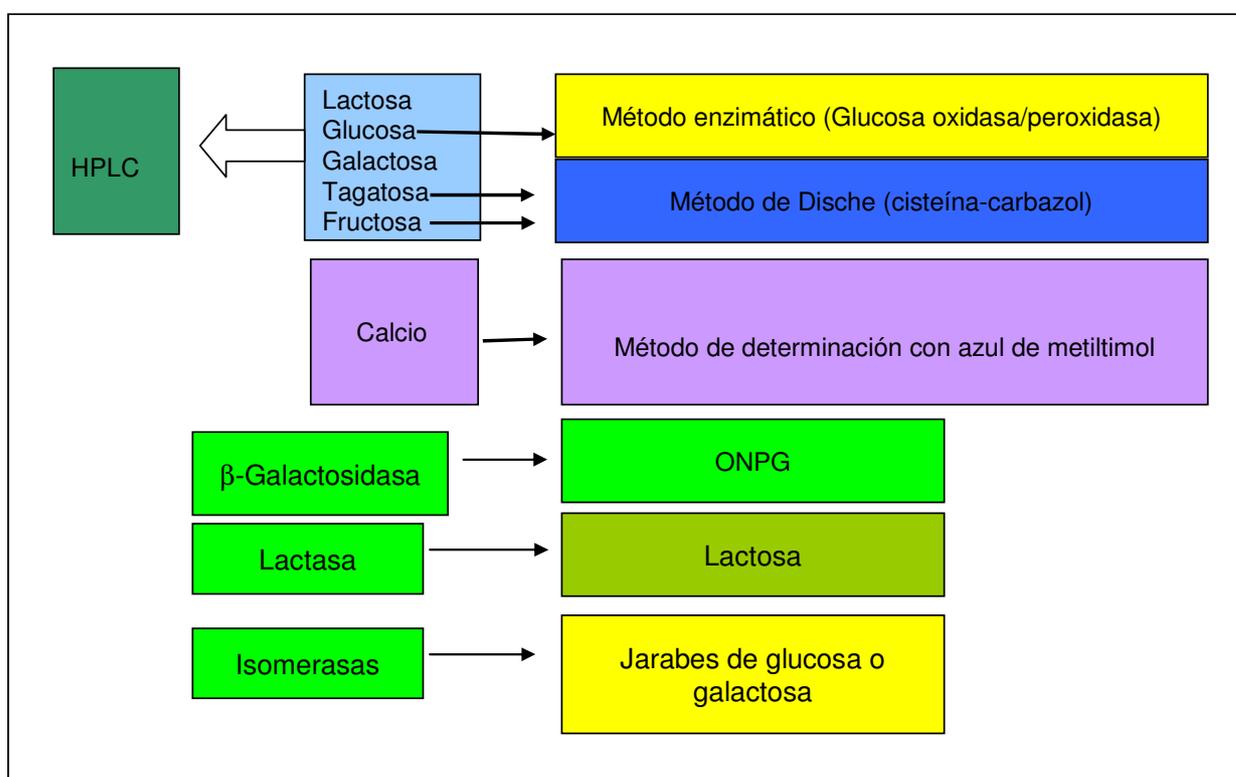


Figura 4.2. Métodos analíticos empleados en este trabajo.

4.7.1. Determinación de calcio

El reactivo azul de metiltilmol (MTB) reacciona con el ión calcio presente en la muestra en medio alcalino, dando un complejo coloreado que se determina espectrofotométricamente a 610 nm. La presencia de hidroxiquinoleína en el reactivo evita la interferencia de Mg^{++} (Gindler y King, 1972).

4.7.2. Determinación de glucosa

Se utilizó un kit de diagnóstico clínico para determinación de glucosa, que posee dos enzimas, glucosa oxidasa y peroxidasa (Trinder, 1969), que catalizan las siguientes reacciones:



Para cuantificar la glucosa formada durante la hidrólisis de lactosa se empleó este método, agregando 1 mL del reactivo de trabajo del kit a 0.1 mL de muestra e incubando la mezcla reactiva durante 30 minutos a temperatura ambiente, midiéndose luego la absorbancia del rojo quinona (quinona-imina formada) a 500 nm.

Se expresó la glucosa formada como porcentaje de hidrólisis con respecto a la cantidad de glucosa formada si se hubiese dado un 100% de hidrólisis.

4.7.3. Determinación de cetohechosas totales (fructosa, tagatosa)

Para la determinación de la cantidad de fructosa y/o tagatosa formadas se empleó el método de Dische (Dische y Borenfreund, 1951): A 1 mL de muestra, se agregan 2 mL de ácido sulfúrico 70% (v/v), 0.2 mL de clorhidrato de cisteína (1.5%), y 0.2 mL de carbazol en etanol (0.12 %), midiendo la absorbancia a 560 nm luego de un período de incubación para el desarrollo de color de 15 minutos.

La producción relativa de fructosa, tagatosa o cetohechosas totales se definió en relación a la conversión máxima teórica del sustrato respectivo.

4.7.4. Análisis de carbohidratos por HPLC

Se utilizó un sistema cromatográfico de Waters-Millipore (Burlington, USA) con bomba 510, inyector Reodyne 7125 con loop de 20 μ l, detector de variación de índice de refracción R401 y controlador de temperatura, con el objetivo de determinar los carbohidratos presentes en las distintas etapas del procesamiento enzimático de lactosuero. La separación se realizó en una columna Rezex RCM-carbohidratos (300 x 7.80 mm) con precolumna Rezex 4 mm x 3 mm (Phenomenex, Manchester, UK), utilizando agua bidestilada como fase móvil a velocidad de flujo 0.6 mL/min, y a una temperatura de 80°C. La selección de estas condiciones tomó como base aquellas empleadas por Givry et al. (2007)

para la separación de glucosa, fructosa, ribulosa, xilulosa, arabinosa y xilosa, y se realizaron modificaciones en base a la resolución obtenida para los carbohidratos considerados en este trabajo (lactosa, glucosa, galactosa, fructosa y tagatosa). Previo a ser inyectadas, las muestras conteniendo calcio fueron desmineralizadas empleando una columna de carboximetil-aspártico-agarosa, y en aquellas conteniendo proteínas las mismas se precipitaron con acetonitrilo y se separaron por centrifugación y posterior filtración.

4.7.5. Cálculo de productividad

La productividad se expresó en términos de carbohidratos (cetohechosas totales, fructosa, tagatosa, glucosa y galactosa) en g/Lh.

4.7.6. Determinación de proteínas.

La concentración proteica en las muestras solubles se determinó utilizando el reactivo BCA de Pierce. El método combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por las proteínas en medio alcalino, con la detección colorimétrica de Cu^+ mediante el ácido bicinonínico (Smith et al., 1985; Walker, 2002). La interacción de dos moléculas de BCA con un ion Cu^+ genera un producto púrpura hidrosoluble que absorbe fuertemente a 562 nm (Bainor et al., 2011). La determinación directa de la proteína unida presente en los derivados enzimáticos en fase sólida también se realizó por este método (Stich et al., 1990).

4.7.7. Ensayos de actividad

β -Galactosidasa y lactasa

La actividad de la β -galactosidasa soluble se determinó en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0 a 25°C utilizando ONPG 10 mM como sustrato, en una cubeta de 1 cm de paso óptico. La velocidad inicial de liberación de ONP se determinó espectrofotométricamente a 405 nm, expresándose como ONP formado por minuto y por mL. La actividad de la enzima inmovilizada se determinó por el mismo método, incubando 100 μL de suspensión de derivado con 3 mL de ONPG 22 mM en el correspondiente amortiguador de actividad, con agitación magnética. Una unidad de enzima (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μmol de ONPG por minuto en las condiciones antes descritas. La actividad específica se definió como las unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg).

El ensayo de actividad lactásica se realizó incubando la enzima con lactosa 4.6 % en amortiguador de actividad a 25°C. La cantidad de glucosa formada se determinó por el método de Trinder utilizando un kit de diagnóstico clínico.

L-Arabinosa (D-galactosa) isomerasa

El ensayo de actividad se realizó con D-galactosa (10 g/L) como sustrato, a 40°C, en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.0 suplementado con $MnCl_2$ 0.025 mg/mL y determinando la cantidad de tagatosa formada mediante el método de Dische (Dische y Borenfreund, 1951).

La actividad de la enzima inmovilizada se determinó por el mismo método, empleando galactosa 50 g/L como sustrato (Yamanaka, 1966a). Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de tagatosa por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad específica se definió como las unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg).

D-Xilosa (D-glucosa) isomerasa

El ensayo se realizó con jarabe de glucosa 40% suplementado con $MgCl_2$ 0.025 mg/mL como sustrato, a 25°C en amortiguador fosfato de sodio 0.1M pH 7.5 (Yamanaka, 1969). Se emplea el mismo método para la enzima nativa y sus derivados en fase sólida. La desaparición de glucosa y la aparición de fructosa se determinan espectrofotométricamente como se ha descrito previamente. La actividad específica se definió como las unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg).

4.7.8. Determinación del contenido de grupos epóxido

La reacción entre los grupos epóxido y el tiosulfato de sodio libera iones OH^- , que pueden valorarse con HCl. Para determinar el contenido de grupos epóxido del gel, 4 g de soporte epoxi-activado se suspendieron en 10 mL de agua desionizada y el pH se ajustó a 7.0 con HCl 60 mM. Luego, se agregaron 15 mL de $Na_2S_2O_3$ 1 M y se incubó la mezcla durante 1 h con agitación continua. Esta suspensión se tituló con HCl 60 mM empleando fenolftaleína como indicador. Tomando en cuenta el gasto de valorante, se calculó el contenido de grupos oxirano por gramo de gel seco.

4.7.9. Electroforesis

PAGE

Se utilizaron Phast Gels (GE Healthcare) de poliacrilamida 12.5 % en un equipo PhastSystem (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia).

SDS PAGE

El tratamiento de las muestras previo a la electroforesis en condiciones desnaturizantes, se realizó en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.8 conteniendo SDS 2% (p/v), glicerol 30% (p/v) y β -mercaptoetanol 1.0% (p/v), con tratamiento térmico de 15 minutos a 100°C. La electroforesis se corrió en Phast Gels 12.5 % (GE Healthcare) de poliacrilamida 12.5% usando el equipo PhastSystem. El procedimiento de revelado fue por tinción con plata (Rabilloud, 1990).

IEF

El isoelectroenfoque se realizó en Phast Gels de poliacrilamida de gradiente de pH 3-10 (GE Healthcare) utilizando el equipo PhastSystem.

4.7.10. Espectrometría de masas

El espectro de la molécula entera se obtuvo en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Abi Sciex) en el modo de adquisición lineal (lineal High), utilizando ácido sinapínico como matriz. Se midió la muestra en un rango de $m/z = 10000$ a 150000 .

El mapeo peptídico se realizó por un tratamiento con tripsina in-gel (Sequencing-grade Promega) durante 10 horas a 37°C. Los péptidos se extrajeron del gel usando acetonitrilo 60% en TFA 0.2%, se concentraron por filtración bajo vacío y se desalinizaron usando microcolumnas C18 de fase reversa (OMIX Pippete tips, Varian). La elución de los péptidos de la microcolumna se llevó adelante directamente en la placa del espectrómetro de masas con 3 μ L de solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo/agua 60:40 conteniendo 0.2 % TFA).

El espectro de masas en este caso se obtuvo en el mismo equipo en modo reflectivo y la calibración se realizó usando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems). El análisis se realizó empleando la disociación inducida por colisiones en experimentos MS/MS. El perfil se

analizó utilizando la base de datos NCBIInr y el programa MASCOT y usando una tolerancia de masa monoisotópica de 0.05 Da, una tolerancia para la masa de los fragmentos de 0.25 Da y teniendo en cuenta la posibilidad de la oxidación de metioninas como posible causa que puede llevar a la pérdida de algunos fragmentos.

La Figura 4.3 muestra una perspectiva de las actividades específicas desarrolladas en el marco de esta Tesis.

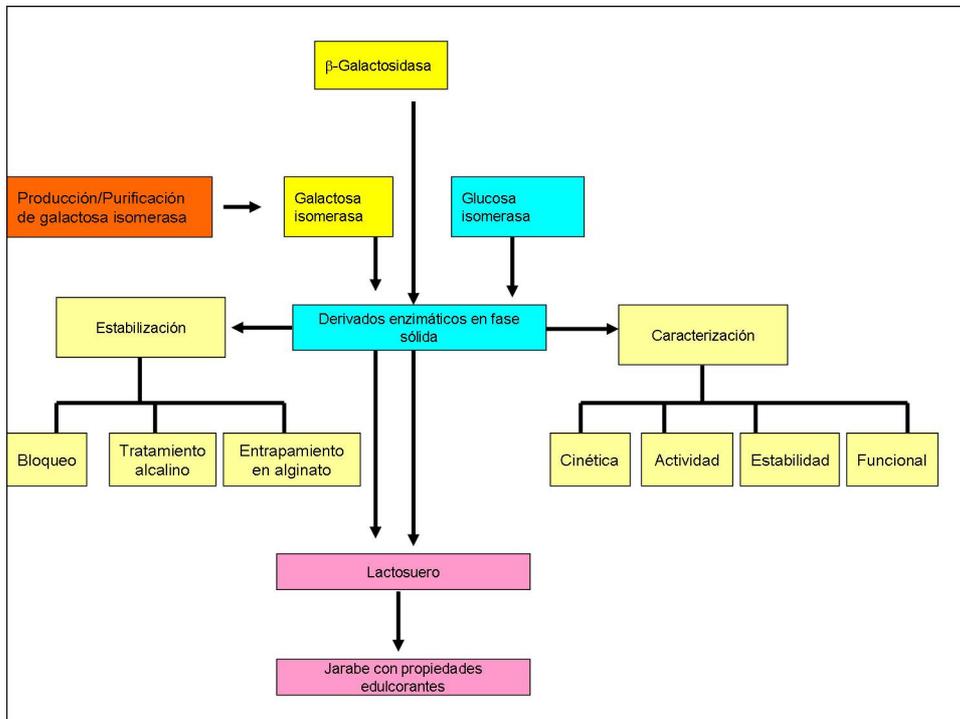


Figura 4.3. Actividades específicas en el marco de este trabajo.

5. Resultados y Discusión

Durante la primera fase de este trabajo de Tesis se realizó la caracterización de la enzima β -galactosidasa de *Bacillus circulans*, se desarrolló su inmovilización covalente en Eupergit C, Eupergit C 250 L, Sepabeads EP (soportes epóxido) y Sepabeads HFA (soporte epoxi-amino). Se estudiaron algunos de los puntos críticos en el proceso de inmovilización y se caracterizaron los derivados obtenidos. Asimismo se recurrió a estrategias de estabilización post-inmovilización, basadas en incubación a pH 8.5 (para favorecer la formación de uniones multipuntuales enzima-soporte), bloqueo de los grupos epóxido remanentes y entrapamiento en partículas de alginato de calcio. Estos derivados fueron aplicados a la hidrólisis de lactosa en diversos lactosueros y en distintas configuraciones de reactor.

En primer lugar se caracterizó la preparación de β -galactosidasa soluble (Biolacta N-5) con la que se trabajó. Se determinó el contenido de proteínas y las actividades β -galactosidasa y lactasa de la enzima. La actividad específica de la preparación fue de 3.2 U/mg cuando se trabajó con el sustrato artificial ONPG. A su vez, se determinaron las constantes cinéticas a distintas temperaturas, el rango de pH óptimo (la máxima actividad se obtuvo a pH 6.0) y la estabilidad en función del pH (la enzima resultó muy estable en el rango 5.5-7.0). Se ensayaron varios amortiguadores, a saber: fosfato 0.1M pH 6.0, citrato 0.1M pH 6.0, citrato-fosfato 0.05 M pH 5.0, Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 y pH 6.5, los tres primeros reportados en la literatura (Bakken et al., 1990; Bakken et al., 1992; Mozaffar et al., 1984; Hernaiz y Crout, 2000). Los ensayos se llevaron a cabo empleando enzima soluble y lactosa 4.6% como sustrato, siguiendo la reacción durante 3.5 horas. El amortiguador que mostró mejor resultado fue el fosfato, siguiéndole el citrato y citrato-fosfato.

En relación al efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, la enzima mostró mayores actividades en el rango de 45-55°C. La enzima expuesta a temperaturas en el rango de 20-50°C durante 2 horas mantuvo una actividad residual superior al 60%. El tiempo de vida media calculado de acuerdo a la ecuación de Arrhenius se redujo 4 veces al comparar una incubación a 40°C con una a 30°C. La actividad se redujo al 50% en presencia de 25 mM de galactosa, en tanto que una incubación durante 4h a 4°C con 0.2 M de 2-mercaptoetanol o DTT (agentes reductores) provocó una caída de la actividad al 88% y 64%, respectivamente.

5.1. Inmovilización/estabilización de β -galactosidasa

5.1.1. Inmovilización de β -galactosidasa

Se estudió la inmovilización de β -galactosidasa en las resinas acrílicas comerciales Eupergit C, Eupergit C 250 L, Sepabeads EP y Sepabeads HFA, analizando el efecto de distintos parámetros. Se seleccionó para la inmovilización el amortiguador fosfato, que mostró mejores resultados en los estudios previos con la enzima soluble. Se evaluaron los efectos de pH, fuerza iónica y el tiempo de incubación a 25°C. Esta temperatura se seleccionó porque estudios preliminares indicaron que la enzima soluble y los derivados sin bloquear eran inestables cuando se incubaban a temperaturas entre 35-60°C durante 24 horas. Las temperaturas más bajas se evitaron porque algunos de los componentes del amortiguador de inmovilización presentan problemas de solubilidad cuando se requieren fuerzas iónicas altas, además de que el proceso insumiría más tiempo en estas condiciones. La Tabla 5.1 muestra el efecto combinado de pH y fuerza iónica sobre el proceso de inmovilización en Eupergit C y Sepabeads EP, cuando se aplican cargas de 30 mg/ g de gel. Los resultados se analizaron teniendo en cuenta el valor de los parámetros rendimiento de inmovilización (porcentaje de proteína hallada en el gel respecto a la cantidad de proteína aplicada) y eficiencia de inmovilización (porcentaje de actividad expresada en el derivado respecto a la cantidad de enzima total ligada al gel).

Las condiciones óptimas de pH para la inmovilización varían de acuerdo al tipo de matriz (pH 7.5 para Eupergit C y 8.5 para Sepabeads EP). Sepabeads EP y Eupergit C son soportes epoxi-activados convencionales y requieren condiciones de alta fuerza iónica para llevar a cabo el proceso de inmovilización de proteínas. Múltiples estudios previos reportan que la inmovilización de proteínas en soportes acrílicos epoxi-activados convencionales se ve favorecida a alta fuerza iónica (Mateo et al., 2002; Mateo et al., 2007a; Mateo et al., 2007b). No obstante, el óptimo de fuerza iónica para ambos resultó diferente (1.0 M para Eupergit C y 1.4 M para Sepabeads EP). La Tabla 5.2 muestra en forma comparativa el efecto de pH y fuerza iónica a distintas cargas. Se observa que la carga que hemos denominado media (30 mg de proteína/ g de gel) es la que permite obtener los mejores resultados en términos de rendimiento y eficiencia de inmovilización.

Tabla 5.1. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa a carga aplicada de 30 mg/g de gel.

Soporte	pH	Fuerza iónica (M)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
Eupergit C	6.0	0.75	18 ± 3	92 ± 1
		1.0	31 ± 2	78 ± 1
		1.2	23 ± 3	81 ± 1
		1.4	24 ± 3	91 ± 1
	6.5	0.75	12 ± 3	95 ± 1
		1.0	26 ± 1	86 ± 1
		1.2	28 ± 1	87 ± 1
		1.4	27 ± 3	83 ± 1
	7.0	0.75	20 ± 2	98 ± 1
		1.0	47 ± 3	89 ± 1
		1.2	60 ± 1	83 ± 1
		1.4	83 ± 3	85 ± 1
	7.5	0.75	40 ± 3	82 ± 1
		1.0	100 ± 1	91 ± 1
		1.2	100 ± 1	80 ± 1
		1.4	100 ± 1	69 ± 1
	8.0	0.75	51 ± 1	88 ± 1
		1.0	100 ± 1	76 ± 1
		1.2	100 ± 1	73 ± 1
		1.4	100 ± 1	71 ± 1
	8.5	0.75	91 ± 1	73 ± 1
		1.0	100 ± 1	29 ± 1
		1.2	100 ± 1	40 ± 1
		1.4	100 ± 1	42 ± 1
	9.0	0.75	100 ± 1	13 ± 1
		1.0	100 ± 1	8 ± 1
		1.2	100 ± 1	3 ± 1
		1.4	100 ± 1	1 ± 1
Sepabeads EP	6.0	0.75	9 ± 1	93 ± 3
		1.0	13 ± 1	73 ± 3
		1.2	10 ± 2	85 ± 3
		1.4	18 ± 3	88 ± 3
	6.5	0.75	9 ± 3	97 ± 1
		1.0	16 ± 3	87 ± 3
		1.2	17 ± 3	96 ± 3
		1.4	19 ± 3	91 ± 3
	7.0	0.75	17 ± 3	91 ± 1
		1.0	14 ± 3	82 ± 3
		1.2	16 ± 1	97 ± 3
		1.4	17 ± 2	80 ± 3
	7.5	0.75	15 ± 6	77 ± 1
		1.0	13 ± 6	89 ± 1
		1.2	14 ± 3	84 ± 3
		1.4	18 ± 3	79 ± 6
	8.0	0.75	58 ± 3	81 ± 3
		1.0	61 ± 3	70 ± 3
		1.2	85 ± 3	75 ± 3
		1.4	100 ± 3	74 ± 3
	8.5	0.75	60 ± 6	72 ± 3
		1.0	69 ± 1	78 ± 6
		1.2	90 ± 1	80 ± 3
		1.4	98 ± 6	95 ± 7
	9.0	0.75	5 ± 3	15 ± 3
		1.0	10 ± 3	5 ± 3
		1.2	6 ± 3	3 ± 3
		1.4	2 ± 3	4 ± 3

La incubación se llevó a cabo en amortiguador fosfato de potasio a 25°C por 24 horas (Eupergit C) o 48 horas (Sepabeads EP). Los resultados son la media de triplicados ± SD.

Tabla 5.2. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa a distintas cargas aplicadas.

Soporte	Carga*	pH	Fuerza iónica (M)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
Eupergit C	Baja	7.5	1.0	100 ± 3	88 ± 1
			1.4	100 ± 3	79 ± 1
		8.5	1.0	100 ± 1	78 ± 1
			1.4	100 ± 1	66 ± 1
	Media	7.5	1.0	100 ± 1	96 ± 1
			1.4	100 ± 1	69 ± 1
		8.5	1.0	100 ± 1	29 ± 1
			1.4	100 ± 1	42 ± 1
	Alta	7.5	1.0	31 ± 1	89 ± 1
			1.4	39 ± 2	79 ± 1
		8.5	1.0	39 ± 1	69 ± 1
			1.4	49 ± 1	59 ± 1
Sepabeads EP	Baja	7.5	1.0	100 ± 1	79 ± 1
			1.4	100 ± 1	76 ± 1
		8.5	1.0	100 ± 5	71 ± 1
			1.4	100 ± 1	93 ± 1
	Media	7.5	1.0	13 ± 1	89 ± 1
			1.4	18 ± 1	79 ± 1
		8.5	1.0	79 ± 1	68 ± 1
			1.4	100 ± 1	98 ± 1
	Alta	7.5	1.0	1 ± 1	89 ± 1
			1.4	9 ± 1	71 ± 1
		8.5	1.0	12 ± 1	69 ± 1
			1.4	18 ± 1	81 ± 1

* Las cargas aplicadas fueron 3 mg/g de gel (baja), 30 mg/g de gel (media) y 120 mg/g de gel (alta). Los resultados son la media de triplicados ± SD.

Por su parte, el soporte heterobifuncional epoxi-amino, Sepabeads HFA, requiere fuerzas iónicas bajas para el proceso de inmovilización (con óptimo en 0.02 M) y un pH de 8.5 (Tabla 5.3). Los rendimientos de inmovilización alcanzaron un 52% con eficiencias de inmovilización en el orden del 90% en estas condiciones.

Tabla 5.3. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads HFA a carga aplicada de 15 mg/g de gel.

pH	Fuerza iónica (mM)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
7.0	5	9 ± 3	69 ± 1
	20	9 ± 1	89 ± 1
	50	9 ± 3	89 ± 1
7.5	5	9 ± 1	69 ± 6
	20	11 ± 1	89 ± 7
	50	12 ± 1	88 ± 6
8.0	5	9 ± 1	71 ± 1
	20	21 ± 8	92 ± 1
	50	29 ± 1	89 ± 1
8.5	5	10 ± 6	70 ± 8
	20	52 ± 3	91 ± 6
	50	49 ± 6	85 ± 6
9.0	5	19 ± 1	25 ± 1
	20	59 ± 1	30 ± 1
	50	51 ± 1	21 ± 1

La incubación se llevó a cabo en amortiguador fosfato de potasio a 25°C por 24 h. Los resultados son la media de triplicados \pm SD.

Los tiempos de inmovilización necesarios para una unión cuantitativa de la enzima son de 24 h para Eupergit C y Sepabeads HFA, y 48 h para Sepabeads EP. Los resultados obtenidos con Eupergit C 250 L para el caso de esta enzima son similares a los obtenidos con Eupergit C (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la inmovilización de β -galactosidasa en Eupergit C 250 L a carga aplicada de 30 mg/g de gel.

pH	Fuerza iónica (M)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
7.0	0.75	19 ± 3	99 ± 3
	1.0	39 ± 3	92 ± 3
	1.2	59 ± 3	89 ± 1
7.5	0.75	34 ± 1	89 ± 3
	1.0	100 ± 3	92 ± 3
	1.2	100 ± 3	89 ± 3
8.0	0.75	49 ± 1	91 ± 3
	1.0	99 ± 3	79 ± 1
	1.2	99 ± 3	79 ± 3
8.5	0.75	90 ± 1	79 ± 3
	1.0	99 ± 3	31 ± 3
	1.2	99 ± 3	42 ± 3
9.0	0.75	99 ± 3	19 ± 3
	1.0	101 ± 1	9 ± 3
	1.2	100 ± 3	9 ± 3

La incubación se realizó en amortiguador fosfato de potasio a 25°C por 24 h. Los resultados son la media de triplicados ± SD.

El análisis del rendimiento en actividad inmovilizada (eficiencia de inmovilización) mostró que más del 69% de la actividad aplicada se mantuvo en el gel cuando el proceso de inmovilización se realizó a pH 7.5-8.0 y fuerza iónica entre 1.0-1.4 M (Eupergit C), y más del 74% a pH 8.0-8.5 y 1.2-1.4 M (Sepabeads EP). Este parámetro de inmovilización refleja la eficiencia del proceso de inmovilización en términos de actividad enzimática expresada con respecto a la actividad aplicada. Para el soporte Eupergit C 250 L los valores de eficiencia de inmovilización son superiores a los obtenidos con Eupergit C, reflejando probablemente el menor nivel de activación de este soporte, que genera una menor distorsión de la estructura tridimensional de la enzima como resultado de la unión covalente. Resultados similares han sido reportados para el caso de esta enzima inmovilizada en Eupergit C y Eupergit C 250 L (Hernaiz y Crout, 2000).

Para el caso de estas resinas, el rendimiento de inmovilización se incrementa con la concentración del amortiguador (Tabla 5.1). No obstante, la actividad inmovilizada se incrementa hasta un valor máximo (91% a 1.0 M y pH 7.5 para Eupergit C y a 1.4 M y pH 8.5 para Sepabeads EP). Por lo tanto, para alcanzar los máximos valores en ambos parámetros de inmovilización, se requiere una combinación adecuada de fuerza iónica y pH.

En el caso de Sepabeads EP, el rendimiento de inmovilización fue inferior en todos los ensayos, a pesar de estar sometido a condiciones más drásticas en lo que refiere a fuerza iónica y pH, y requerir tiempos de incubación mayores (Tabla 5.1). Por otra parte, la principal ventaja de la matriz heterobifuncional es, en teoría, que se puede inmovilizar covalentemente empleando bajas concentraciones salinas en el amortiguador de inmovilización, pues la presencia de grupos amino facilita una primera interacción de tipo iónica entre gel y proteína (Mateo et al., 2003). La presencia de este primer paso de atracción iónica es una característica común entre este tipo de soporte y los soportes activados con glutaraldehído, como el glutaraldehído-agarosa (Mielgo et al., 2003). El empleo de bajas fuerzas iónicas es de fundamental importancia teniendo en cuenta la labilidad de muchas enzimas frente a condiciones extremas, que genera gran pérdida de la actividad aplicada en el proceso de unión (Torres y Batista-Viera, 2012a). Adicionalmente es posible pensar que la unión no covalente entre enzima y soporte pueda proteger a la proteína de procesos adversos estando en cierta forma aislada del entorno (Mateo et al., 2003; Rodrigues et al., 2008; Miranda et al., 2011). Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado se intentó realizar la inmovilización covalente de la enzima empleando Sepabeads HFA. Los resultados empleando un protocolo similar al usado con los otros soportes epóxido monofuncionales (protocolo 1), revelaron que sólo el 12% de la proteína aplicada se ligó covalentemente al gel. No obstante, a pH 8.5 el rendimiento se incrementa a 58%.

Carga aplicada

La Tabla 5.5 muestra la incidencia de la carga enzimática aplicada sobre el proceso de inmovilización en las condiciones óptimas de pH y fuerza iónica determinadas para cada soporte.

El máximo rendimiento (100%) se obtuvo a cargas proteicas de 3-30 mg/g de gel. La eficiencia de inmovilización alcanzó un máximo en 30 mg/g de gel en los soportes convencionales, en tanto que para Sepabeads HFA (soporte heterofuncional epoxi-amino) el máximo se alcanzó en el rango 1.5-15 mg/g de gel. La eficiencia de inmovilización se mantiene en su máximo por encima de 15 mg/g de gel para este caso.

Tabla 5.5. Influencia de la carga enzimática sobre la inmovilización de β -galactosidasa.

SopORTE	Carga aplicada (mg de proteína/g de gel)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
Sepabeads EP	3	100 ± 1	65 ± 3
	15	98 ± 1	85 ± 2
	30	100 ± 1	91 ± 3
	60	70 ± 1	79 ± 3
	120	40 ± 1	64 ± 3
Sepabeads HFA	1.5	58 ± 1	61 ± 2
	6	53 ± 1	77 ± 6
	15	58 ± 1	95 ± 1
	30	53 ± 1	93 ± 2
	60	20 ± 1	97 ± 7
Eupergit C	0.5	99 ± 1	14 ± 8
	3	98 ± 1	56 ± 1
	15	96 ± 1	83 ± 3
	30	99 ± 1	94 ± 3
	60	74 ± 3	88 ± 3
	120	35 ± 1	75 ± 3

La masa de gel utilizada fue de 300 mg en un volumen total de 10 mL de amortiguador fosfato de potasio 1.0 M pH 7.5 (Eupergit C), 1.4 M pH 8.5 (Sepabeads EP) o 0.02 M pH 8.5 (Sepabeads HFA). Los resultados son la media de triplicados \pm SD.

El descenso en los rendimientos de inmovilización a mayores cargas aplicadas evidencia que los derivados se aproximan a niveles de saturación. El máximo de eficiencia de inmovilización se obtiene a 30 mg/g de gel (Sepabeads EP y Eupergit C). Cargas proteicas mayores o menores dan como resultado un descenso de la eficiencia de inmovilización. De esto se desprende que la relación enzima/sopORTE óptima es de 1:30 (mg de proteína:mg de sopORTE) en los sopORTES convencionales. La eficiencia de inmovilización es menor a baja carga para los derivados en Sepabeads HFA. Sin embargo, este parámetro se incrementa cuando se aplican mayores cargas. El Sepabeads HFA posee un contenido de grupos epóxido menor que los demás sopORTES (50 μ mol de grupos epóxido/g de gel húmedo), y esto puede reducir la probabilidad de formación de enlaces covalentes adicionales entre la enzima y el sopORTE cuando se aplican mayores cargas. El medio de inmovilización (fosfato de potasio 1.4 M) resultó el principal responsable de la inactivación de la enzima a alta carga aplicada en aquellos derivados obtenidos en sopORTES convencionales, mientras que las pérdidas de actividad no son significativas en el caso de emplearse condiciones más moderadas (fosfato de potasio 0.02 M), como las empleadas para la inmovilización en Sepabeads HFA. El efecto del amortiguador no puede entonces dar cuenta de la inactivación observada a baja carga, un fenómeno que ocurre en ambos tipos de sopORTES. La generación de uniones múltiples entre enzima y sopORTE (conocida como unión multipuntual) usualmente provoca pérdidas de actividad al distorsionar la estructura tridimensional de la enzima. Este fenómeno es más pronunciado a baja carga aplicada. Hernaiz y Crout (2000) analizaron la inmovilización de esta enzima en Eupergit C y Eupergit C 250 L, reportando para los derivados en Eupergit C, que un incremento en la cantidad de gel ofrecido (que baja la relación proteína/gel) determina un descenso

en la eficiencia de inmovilización. La eficiencia de inmovilización también desciende para el caso de Eupergit C 250 L, aunque en menor grado, posiblemente como reflejo de su menor contenido de grupos reactivos (600 $\mu\text{mol/g}$ de gel seco en Eupergit C y 250 $\mu\text{mol/g}$ de gel seco en Eupergit C 250 L). Wang et al. (2008) reportan resultados similares con una hidrolasa termoestable de *Klebsiella oxytoca* (SNSM-87).

La cinética de la inmovilización en Sepabeads EP a baja y alta carga aplicada revela la existencia de dos modos distintos de inactivación durante el proceso (Fig. 5.1).

A baja carga (Fig 5.1A), la inactivación ocurre mayoritariamente en el gel y se hace evidente luego de las primeras 10 horas de incubación (posiblemente debido a la distorsión de la estructura de la proteína como resultado de la formación de uniones covalentes múltiples con el soporte, hipótesis que es reforzada por la observación de que la inactivación tiene lugar a velocidades moderadas). La inactivación a alta carga aplicada (Fig. 5.1B) ocurre principalmente en las fracciones solubles (sobre todo en el sobrenadante). A baja carga aplicada, existe muy poca cantidad de proteína expuesta a los efectos inactivantes del medio de inmovilización. Bajo estas condiciones, la unión covalente multipuntual está favorecida. Por el contrario, una alta carga aplicada disminuye la probabilidad de unión multipuntual, pero la mayor parte de la proteína aplicada no se encuentra protegida de los efectos inactivantes del medio. Durante la preparación de los derivados en Sepabeads EP a baja carga enzimática, a partir de las 10 h de incubación se observan importantes pérdidas en la eficiencia de inmovilización, lo cual es consistente con la ocurrencia de inactivación debida a unión covalente multipuntual (Tabla 5.6).

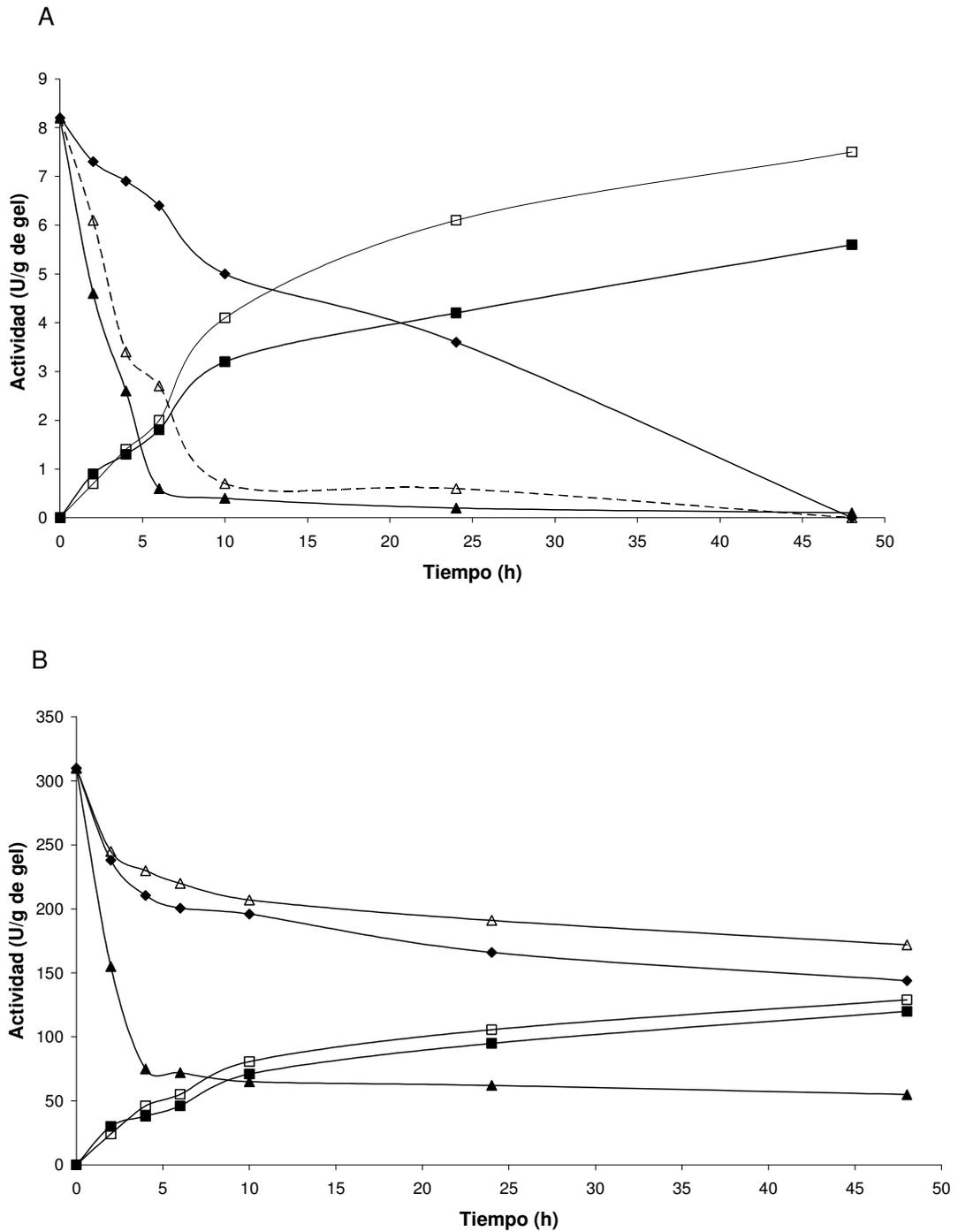


Fig. 5.1. Cinética de inmovilización en Sepabeads EP a carga aplicada de 3 mg/g de gel (A), y 120 mg/g de gel (B). ◆ Actividad en las fracciones solubles (sobrenadante y lavados); ■ Actividad en el gel luego de los lavados; ▲ Actividad en el sobrenadante; △ Actividad teórica en el sobrenadante (suponiendo que el 100% de la proteína de la fracción se mantiene activa); □ Actividad teórica en el gel (suponiendo que el 100% de la proteína de la fracción se mantiene activa).

Tabla 5.6. Cinética de inmovilización de β -galactosidasa en función de la carga enzimática aplicada.

Soporte	Carga aplicada (mg/g de gel)	Incubación (h)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
Sepabeads EP	3	3	8 ± 3	100 ± 2
		6	25 ± 6	90 ± 6
		10	50 ± 3	78 ± 3
		24	75 ± 1	69 ± 3
		48	100 ± 1	57 ± 8
	30	3	8 ± 1	100 ± 6
		6	23 ± 3	95 ± 3
		8	41 ± 3	94 ± 3
		10	58 ± 6	87 ± 6
		24	77 ± 6	89 ± 3
	120	48	100 ± 7	85 ± 1
		3	3 ± 1	100 ± 3
		6	9 ± 3	83 ± 3
		10	18 ± 1	78 ± 3
		24	27 ± 3	60 ± 3
Eupergit C	3	48	40 ± 1	63 ± 8
		3	10 ± 3	96 ± 1
		10	51 ± 6	76 ± 9
		24	100 ± 6	61 ± 5
		48	100 ± 7	51 ± 4
	30	3	8 ± 1	97 ± 7
		6	15 ± 1	96 ± 6
		8	23 ± 6	92 ± 3
		10	61 ± 7	85 ± 8
		24	98 ± 5	95 ± 1
	120	48	100 ± 5	90 ± 3
		3	7 ± 5	100 ± 1
		10	25 ± 1	69 ± 7
		24	45 ± 7	59 ± 5
		48	49 ± 5	13 ± 5
Sepabeads HFA	3	3	9 ± 5	92 ± 5
		10	13 ± 7	89 ± 3
		24	96 ± 1	79 ± 1
		48	96 ± 1	79 ± 1
		3	6 ± 1	99 ± 3
	30	6	7 ± 3	98 ± 3
		8	12 ± 3	96 ± 3
		10	25 ± 7	98 ± 3
		24	53 ± 5	93 ± 3
		48	54 ± 1	89 ± 1
	120	3	2 ± 1	99 ± 2
		10	9 ± 3	98 ± 6
		24	52 ± 3	97 ± 6
		48	54 ± 1	89 ± 1

La masa de gel utilizada fue 300 mg en un volumen total de 10 mL de amortiguador fosfato de potasio 1.4 M o 1.0 M pH 8.5 (Sepabeads EP y Sepabeads HFA, respectivamente) o 1.0 M pH 7.5 (Eupergit C). Los resultados son la media de triplicados ± SD.

Por el contrario, a alta carga aplicada, se puede apreciar un descenso gradual en la actividad expresada en el gel, consistente con la inactivación debida al medio de inmovilización y la unión covalente de una cantidad moderada de moléculas inactivas. Por su parte, a carga media (30 mg/g

de gel) la inactivación se reduce al mínimo. En estas condiciones la mayor parte de la proteína se adsorbió al soporte en un proceso rápido, y por otra parte, la unión covalente multipuntual no fue tan intensa, lo cual se refleja en una menor inactivación en las fracciones solubles así como en el gel. Un análisis cinético similar se llevó a cabo para el caso de Sepabeads HFA. En este caso, la cinética de inmovilización reveló que la inactivación ocurre mayormente a causa de la unión covalente. Esto indica claramente que las condiciones de inmovilización en cuanto a pH y fuerza iónica fueron menos agresivas en este caso, no generándose grandes pérdidas de actividad en las fracciones solubles para ninguna de las cargas consideradas. Las mayores pérdidas de actividad se registran entre las 10 y 24 horas (Tabla 5.6). A carga media y alta, las actividades en el gel y en las fracciones solubles fueron muy similares a las esperadas teóricamente. Además, para estas cargas el gel y el sobrenadante mostraron niveles similares de inactivación. Por el contrario, el nivel de inactivación en el gel aumenta cuando la carga aplicada disminuye (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Influencia de la carga enzimática aplicada sobre la inmovilización de β -galactosidasa en Sepabeads HFA.

Carga enzimática (mg/g de gel)	Proteína unida (mg)	Rendimiento de inmovilización (%)	Actividad expresada (U/g de gel)	Eficiencia de inmovilización (%)	Actividad específica (U/mg)
1.5	0.3	58	1.8	61	2.0
6	1.1	53	8.4	77	2.5
15	2.8	55	26.3	95	3.1
30	3.5	35	32.2	93	3.1
60	4.0	20	38.4	97	3.2

La inmovilización se llevó a cabo por incubación de la enzima con el soporte durante 24 horas en todos los casos. La masa de gel utilizada fue 300 mg en un volumen total de 10 mL de amortiguador fosfato de potasio 0.02M pH 8.5.

Mejoras en el proceso de inmovilización en Sepabeads HFA

La β -galactosidasa de *Bacillus circulans* tiene un pI de 4.5 y está negativamente cargada en el rango de pH utilizado para su inmovilización (7.5-8.5), lo que lleva a una interacción iónica con el soporte. La fracción de grupos amino cargados en el soporte disminuye a pH más altos. Los estudios cinéticos de la interacción entre la enzima y el soporte revelaron que la unión no covalente tiene lugar más rápido a pH 7.5 que a pH 8.5, en tanto que la unión covalente es más lenta a pH 7.5, como resultado de la menor reactividad de los grupos involucrados en la unión bajo estas condiciones (Fig. 5.2).