

Figura 5.2. Cinética de inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa en Sepabeads HFA a pH 7.5 (A) y 8.5 (B). ♦ Proteína en el sobrenadante ■ Proteína total en el gel ▲ Proteína covalentemente unida

En teoría, la adsorción iónica inicial de las proteínas al soporte debería tener un efecto protector contra los factores inactivantes del medio (por ejemplo el alto pH). La inmovilización covalente de la proteína adsorbida se lleva a cabo más rápidamente que si se hallara en solución, debido a la mayor proximidad de los grupos reaccionantes (Arroyo, 1998). Sumado a esto, la adsorción más rápida a pH 7.5 favorece la estabilidad de la enzima durante los estadios iniciales del proceso, cuando la proteína está todavía en la fase soluble. Basados en estas consideraciones, se diseñó un método alternativo para llevar a cabo la inmovilización en Sepabeads HFA y de esta manera lograr mayores rendimientos de inmovilización. La enzima se adsorbió a pH 7.5 y se inmovilizó covalentemente a pH 8.5 (protocolo 2). El resultado fue un incremento dramático en el rendimiento de inmovilización desde 52 a 100% (Tabla 5.8).

**Tabla 5.8. Dos protocolos alternativos para la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa en Sepabeads HFA.**

Protocolo	pH de adsorción	pH de unión covalente	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)
1-Adsorción y unión covalente al mismo pH <sup>a</sup>	8.5	8.5	52±6	89±1
2-Adsorción y unión covalente a distinto pH <sup>b</sup>	7.5	8.5	100±5	83±7

a- 24 h de incubación.

b- 6 h de incubación a pH 7.5 y 18 horas de incubación a pH 8.5.

Los resultados son la media de 9 ensayos  $\pm$ SD.

En línea con estas observaciones, la cinética del proceso de inmovilización (tanto en términos de proteínas o actividad) reveló que la adsorción inicial a pH 7.5 es un proceso rápido, mientras que la velocidad de unión covalente se incrementó significativamente a pH 8.5 (Fig. 5.3).

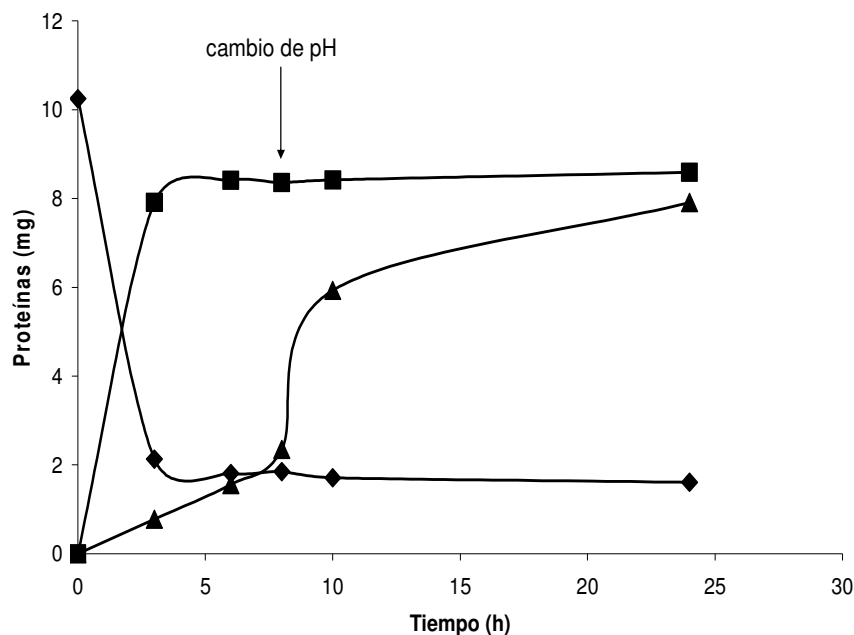


Figura 5.3. Cinética de inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa en Sepabeads HFA (Protocolo 2). La enzima se incubó con el soporte a pH 7.5 durante 6 horas; luego, el pH de la suspensión se incrementó a 8.5 y la incubación se continuó por 18 horas adicionales. ◆ Proteína en el sobrenadante ■ Total de proteínas en el gel ▲ Proteína covalentemente unida.

Este hallazgo demostró que pueden obtenerse rendimientos cercanos al 100% con todos los soportes estudiados, mediante la aplicación de protocolos adecuados. Las mejores condiciones para la inmovilización en estos soportes se resumen en la Tabla 5.9. En todos los casos los rendimientos y eficiencias de inmovilización alcanzados son muy altos.

Tabla 5.9. Condiciones óptimas para la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa a 25°C.

Soporte	pH	Fuerza iónica (M)	Rendimiento de inmovilización (%) <sup>a</sup>	Eficiencia de inmovilización (%)
Eupergit C	7.5	1.0	100±1	89±6
Eupergit C 250 L	7.5	1.0	100±4	100±4
Sepabeads EP	8.5	1.4	98±6	85±4
Sepabeads HFA <sup>b</sup>	8.5	0.02	100±5	90±5

a- Proteínas determinadas por el método de BC A. La incubación se llevó a cabo en amortiguador fosfato de potasio a 25°C durante 24 h (Sepabeads HFA, Eupergit C, Eupergit C 250 L) o 48 h (Sepabeads EP).

b- Protocolo 2. La carga enzimática aplicada fue de 30 mg/g de gel (Sepabeads EP, Eupergit C y Eupergit C 250 L) y 15 mg/g de gel (Sepabeads HFA).

Los resultados son la media de 20 ensayos de inmovilización en cada caso.

### 5.1.2. Caracterización de los derivados obtenidos

#### *pH óptimo y estabilidad frente al pH*

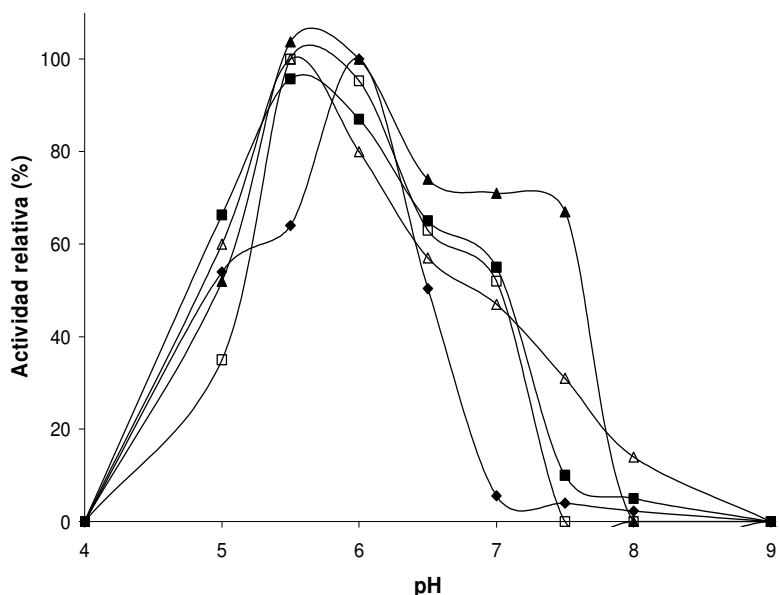
Los efectos del pH sobre la actividad y estabilidad fueron analizados en forma comparativa entre la enzima soluble y los derivados. Los derivados usados con este propósito se prepararon a cargas aplicadas medias de 30 mg/g, bajo las condiciones óptimas descritas con anterioridad. En el caso de la enzima en solución se evidenció una curva típica en la relación actividad-pH, con un óptimo en pH 6.0. Los derivados en Sepabeads EP mostraron el mismo pH óptimo que la enzima soluble. En concordancia con lo reportado anteriormente para el derivado en Eupergit C (Hernaiz y Crout, 2000), éste presentó un pH óptimo en 5.5, evidenciando la influencia del microentorno en la determinación de las propiedades funcionales del catalizador. No obstante, el cambio o no de las condiciones óptimas depende de la combinación particular de enzima y soporte considerada. Entre muchos ejemplos, los biocatalizadores obtenidos por inmovilización de la dextranasa de *Penicillium lilacinum* en Eupergit C poseen las mismas condiciones óptimas que la enzima soluble (Aslan y Tanriseven, 2007b). A su vez en este trabajo de Tesis, como se verá más adelante, no hubo variación significativa de las condiciones óptimas de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa cuando se las inmovilizó en Eupergit C y Eupergit C 250 L.

Los derivados en Sepabeads HFA exhiben su máximo de actividad a pH 5.5, al igual que los derivados en Eupergit C. La actividad de los derivados en el rango de pH 6.0-6.5 fue superior al 70% de la actividad en el pH óptimo.

Para todos los derivados considerados se observó un perfil similar de actividad con el pH cuando se trabajó con ONPG o lactosa. Tanto la enzima libre como sus derivados presentaron un nivel de actividad aceptable en el rango de pH de leche descremada y otros productos lácteos, el cual varía entre 6.0 y 6.5 (Bakken et al., 1992), así como de suero dulce (5.5-6.5).

Los perfiles de estabilidad para la enzima soluble y los derivados en Sepabeads EP fueron similares en el rango de pH 4.0-6.0, con un máximo de estabilidad a pH 6.0. La comparación de los perfiles evidencia que cualquiera de los derivados presentan una estabilidad mayor frente al pH que la enzima libre, aunque es notable la diferencia existente entre los distintos derivados. Considerada la enzima soluble, esta presenta un pico estrecho de estabilidad en pH 6.0, coincidente con el máximo de actividad. Hacia ambos lados de la escala la caída es pronunciada, pero es más notoria a pH básico, destacándose que en 7.5 ya no presenta actividad apreciable. Sin embargo, la estabilidad de los derivados en Sepabeads EP se mantiene incluso por encima de este pH. Los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L exhiben mejores estabilidades que los derivados en Sepabeads EP

en el rango 5.0-6.5, con un máximo de estabilidad en pH 5.5 y un pequeño descenso por encima de pH 7.0 (Fig. 5.4). Los derivados en Sepabeads HFA presentan un perfil de estabilidad similar a los derivados en Sepabeads EP. Sin embargo, en el rango 6.5-7.5 éstos últimos son más estables. Para los derivados en Eupergit C y en Sepabeads HFA la mayor estabilización se logra a pH ácido, en tanto que para aquellos en Sepabeads EP la estabilización es mayor a pH ligeramente alcalino, manteniendo importantes niveles de actividad luego de 24 horas de incubación a pH 7.5 (Fig. 5.4).



**Figura 5.4.** Efecto del pH sobre la estabilidad de  $\beta$ -galactosidasa y sus derivados (24 h de exposición). ◆ Enzima nativa △ Derivado en Eupergit C ▲ Derivado en Sepabeads EP ■ Derivado en Eupergit C 250 L □ Derivado en Sepabeads HFA.

### *Temperatura óptima*

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad de las formas nativa e inmovilizada. La enzima libre y todos sus derivados exhiben un incremento exponencial de la actividad en el rango 20-45°C. Se ha reportado para ciertos biocatalizadores el incremento en la temperatura óptima como consecuencia de la inmovilización (Filho et al., 2008; Cerdobbel et al., 2010). No obstante su mayor estabilidad térmica, los derivados de  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* presentados en este trabajo mantuvieron el mismo valor de temperatura óptima (45°C) que su contraparte soluble.

## Estabilidad térmica y estabilización

### *Estabilidad térmica*

La enzima soluble mantuvo aproximadamente 15% de su actividad cuando fue incubada durante 32 horas a 50°C, actividad residual levemente inferior a la que exhiben los derivados sin bloquear incubados en las mismas condiciones.

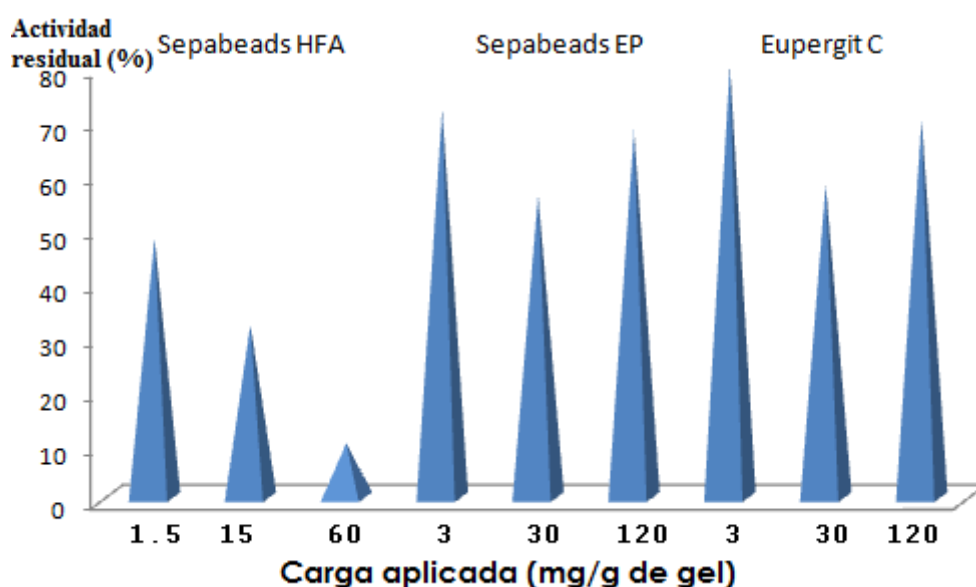
### *Estabilización por bloqueo*

La modificación química de la enzima o el soporte es una estrategia muy empleada para conseguir altas eficiencias de inmovilización, sobre todo cuando se trata de enzimas inestables, y/o se busca incrementar la termoestabilidad del biocatalizador inmovilizado (Rodrigues et al., 2009b). Un tipo de modificación química del soporte es el bloqueo de grupos reactivos remanentes, el cual puede ser considerado a la vez como una modificación química del soporte y una herramienta potencial para modificar el microentorno de la enzima inmovilizada con fines diversos, entre ellos la estabilización térmica. En este trabajo, luego de la inmovilización, los grupos reactivos remanentes del gel se bloquearon con glicina 3 M durante 24 horas a temperatura ambiente o 2-mercaptoetanol 0.2 M durante 4 horas a 4°C. Los derivados bloqueados retuvieron el 100% de la actividad inmovilizada (Tabla 5.10). No obstante, la actividad de la enzima soluble se reduce 12% cuando se la incuba con 2-mercaptoetanol en las mismas condiciones. Estos resultados sugieren que la inmovilización tiene un efecto protector y minimiza la inactivación de la enzima durante el proceso de bloqueo (Mateo et al., 2007b; Rodrigues et al., 2008; Miranda et al., 2011).

**Tabla 5.10. Efecto de tioles y glicina sobre la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.**

Biocatalizador	Condiciones	Actividad residual (%)
$\beta$ -Galactosidasa nativa	Fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	100
	0.2 M 2-mercaptoetanol en fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	88
	20 mM DTT en fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	64
	Glicina 3 M pH 8.5, 25°C, 24 h	100
	Fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	100
Derivados insolubles	0.2 M 2-mercaptoetanol en fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	100
	20mM DTT en fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	100
	Glicina 3 M pH 8.5, 25°C, 24 h	100
	Fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	100
	0.2 M 2-mercaptoetanol en fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, 4°C, 4h	100

Se determinaron las estabilidades térmicas de derivados obtenidos a distinta carga aplicada en soportes Eupergit C, Sepabeads EP, y Sepabeads HFA (Fig. 5.5).



**Figura 5.5. Estabilidad térmica a 50°C (32 horas de exposición) de derivados bloqueados en función de la carga aplicada.**

El bloqueo incrementa significativamente la estabilidad térmica de todos los derivados (Fig. 5.6). En efecto, luego de 24 h de incubación a 50°C la actividad residual de los derivados en Eupergit C bloqueados con glicina fue alrededor de 60% comparada con el 20% del correspondiente derivado sin bloquear. Los derivados bloqueados con glicina exhiben mayor termoestabilidad que aquellos bloqueados con  $\beta$ -mercaptoetanol (Fig. 5.7).

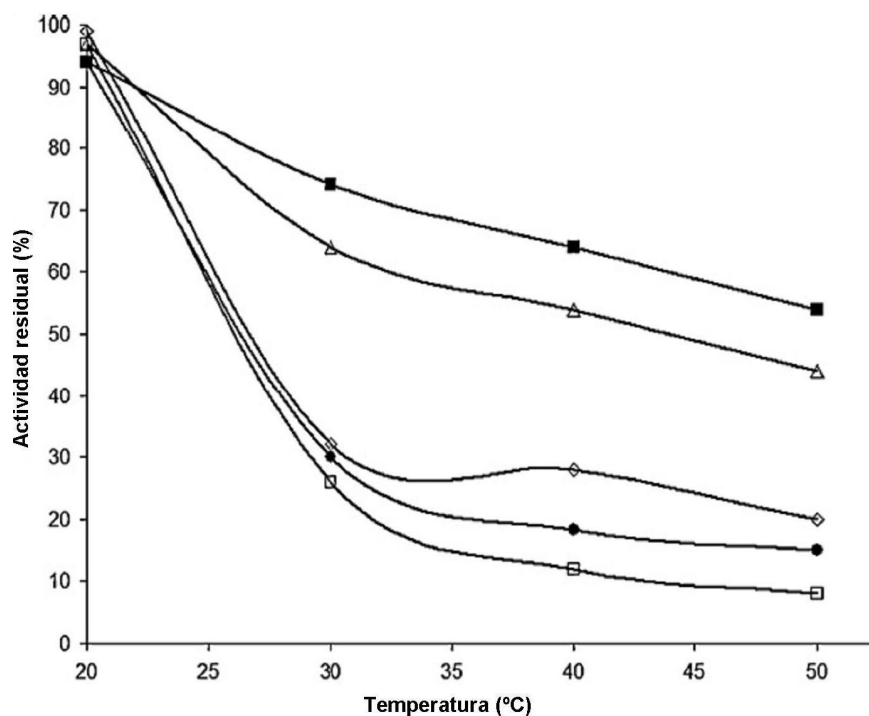


Figura 5.6. Influencia del bloqueo en la estabilidad térmica de los derivados  $\beta$ -galactosidasa-Sepabeads EP y  $\beta$ -galactosidasa-Sepabeads HFA. □ Enzima nativa ● Derivado en Sepabeads HFA no bloqueado ◇ Derivado en Sepabeads EP no bloqueado △ Derivado en Sepabeads EP bloqueado con glicina ■ Derivado en Sepabeads HFA bloqueado con glicina.

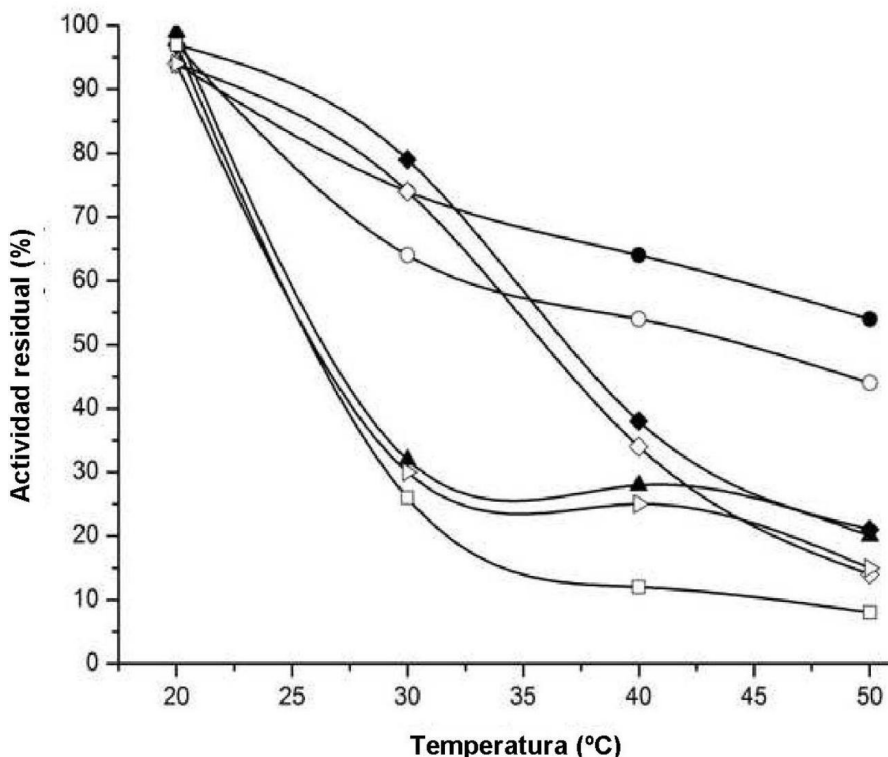


Figura 5.7. Influencia del bloqueo y naturaleza del agente bloqueante en la estabilidad térmica de los derivados  $\beta$ -galactosidasa-Sepabeads EP y  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C. □ Enzima nativa △ Derivado en Sepabeads EP no bloqueado ▲ Derivado en Eupergit C no bloqueado ◇ Derivado en Sepabeads EP bloqueado con  $\beta$ -mercaptoetanol ◆ Derivado en Eupergit C bloqueado con  $\beta$ -mercaptoetanol ○ Derivado en Sepabeads EP bloqueado con glicina ● Derivado en Eupergit C bloqueado con glicina.



Las vidas medias a 50°C en función de la carga aplicada se muestran en la Tabla 5.11. La enzima soluble tiene una vida media de 12 h, levemente inferior a la que exhiben los derivados sin bloquear incubados en las mismas condiciones. Las vidas medias de los derivados  $\beta$ -galactosidasa-Sepabeads EP bloqueados directamente con glicina, sin tratamiento alcalino alguno (0 h) oscilaron entre 18 y 80 h, en función de la carga aplicada. Las estabilidades de los derivados  $\beta$ -galactosidasa-Sepabeads HFA bloqueados con glicina fueron también elevadas; estos derivados muestran vidas medias en el rango 18-100 h. El moderado carácter hidrofóbico de los soportes acrílicos convencionales determina la ocurrencia de interacciones hidrofóbicas entre el soporte y la superficie de la proteína y esto puede afectar sus propiedades. Se ha sugerido que el bloqueo con glicina genera un microambiente hidrofílico que favorece la estabilidad de la enzima evitando las interacciones hidrofóbicas entre proteína y soporte (Mateo et al., 2007a; Alptekin et al., 2010).

Los derivados bloqueados  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C y  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C 250 L obtenidos a carga media poseen vidas medias muy superiores a las encontradas para los derivados bloqueados  $\beta$ -galactosidasa-Sepabeads EP (195, 197 y 21 h, respectivamente). Por otro lado, los derivados bloqueados obtenidos a baja carga exhiben vidas medias más altas (289 y 80 h para Eupergit C y Sepabeads EP, respectivamente), que aquellos obtenidos a cargas media y alta. Este efecto podría explicarse por la mayor intensidad de unión covalente multipuntual en estos biocatalizadores (Mateo et al., 2007b; Torres y Batista-Viera, 2012a).

Todos los derivados bloqueados permanecen completamente activos luego de 6 meses de almacenamiento a 4°C en amortiguador de actividad. El procedimiento de bloqueo no afectó significativamente la estabilidad frente al pH.

Tabla 5.11. Termoestabilidad de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa a 50°C en función de la carga enzimática aplicada, extensión del tratamiento alcalino post-inmovilización y bloqueo con glicina.

<i>Soporte</i>	<i>Carga aplicada (mg/g de gel)<sup>a</sup></i>	<i>Tratamiento alcalino<sup>b</sup> (h)</i>	<i>Rendimiento de inmovilización (%)</i>	<i>Eficiencia de inmovilización (%)</i>	<i>Vida media<sup>c</sup> (h)</i>
Sepabeads EP	3	0 <sup>d</sup>	100 ± 1	93 ± 1	80
		8	---	84 ± 1	63
		24	---	61 ± 2	63
	30	0	100 ± 1	98 ± 3	21
		8	---	83 ± 1	24
		24	---	74 ± 2	37
	120	0	18 ± 1	81 ± 1	18
		8	---	78 ± 1	18
		24	---	63 ± 3	20
Sepabeads HFA	1.5	0	100 ± 1	95 ± 1	100
		8	---	81 ± 7	80
		24	---	68 ± 1	67
	15	0	98 ± 4	94 ± 1	40
		8	---	93 ± 3	49
		24	---	91 ± 1	51
	60	0		88 ± 1	18
		8	14 ± 1	74 ± 1	18
		24		66 ± 1	19
Eupergit C	3	0	100 ± 9	88 ± 1	289
		8	---	85 ± 9	291
		24	---	80 ± 1	301
	30	0	100 ± 1	96 ± 1	197
		8	---	84 ± 3	271
		24	---	74 ± 1	387
	120	0	31 ± 9	89 ± 1	90
		8	---	64 ± 2	207
		24	---	57 ± 1	291
Eupergit C 250 L	30	0	100 ± 4	100 ± 8	195
		8	---	88 ± 5	268
		24	---	81 ± 8	385

*a-* La masa de gel utilizada fue 300 mg por ensayo en un volumen total de 10 mL.

*b-* La  $\beta$ -galactosidasa se inmovilizó en Sepabeads EP, Sepabeads HFA, Eupergit C o Eupergit C 250 L bajo las condiciones óptimas. Los derivados obtenidos se incubaron en amortiguador fosfato de potasio 1 M (Eupergit C y Eupergit C 250 L), 1.4 M (Sepabeads EP) o 0.02 M pH 8.5 durante 0-24 horas antes de bloquear con glicina 3 M.

*c-* La cinética de inactivación de los derivados en batch a 50°C se siguió por 1-54 h. La vida media de la enzima nativa (en concentración equivalente a los derivados obtenidos a carga aplicada media) fue de 12 horas bajo estas condiciones.

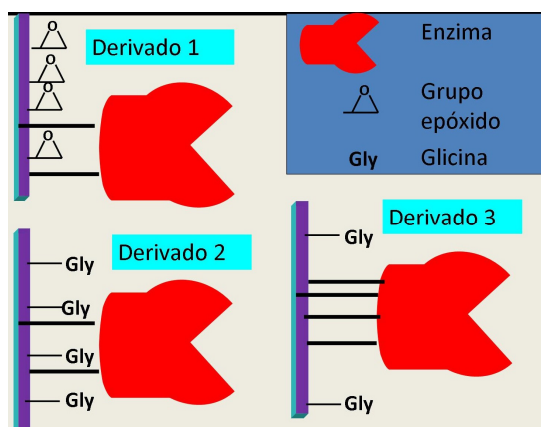
*d-* Derivados sólo bloqueados.

#### *Estabilización por tratamiento alcalino*

Se ha sugerido que la unión covalente multipuntual incrementa la estabilidad conformacional y la rigidez de la estructura proteica, reduciendo la distorsión estructural por efecto de diversos agentes como el calor (Kuroiwa et al., 2005; Knezevic et al., 2006; Tardioli et al., 2006; Long et al., 2007; Li et al., 2008; Rodrigues et al., 2008). La correlación entre unión multipuntual y

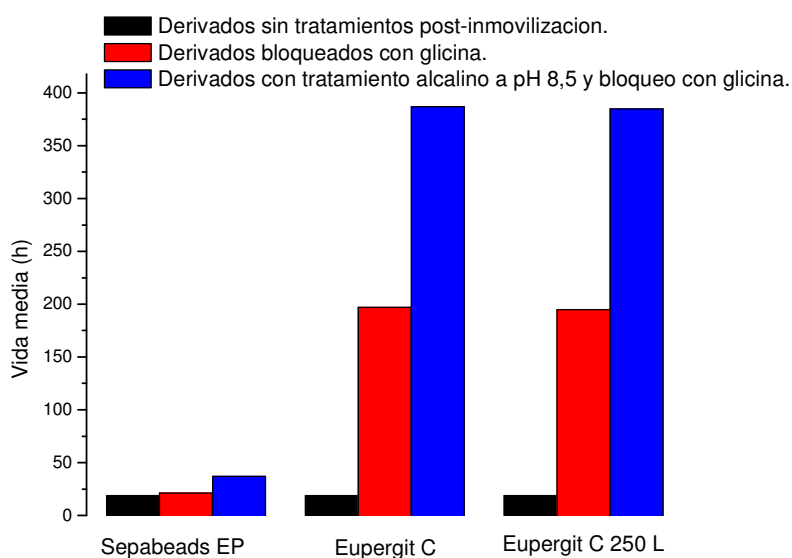
estabilidad térmica ha sido estudiada en base al análisis del número de lisinas que participan en enlaces covalentes con el soporte para el caso de la inmovilización de proteasas en glioxil-agarosa (Pedroche et al., 2007). La mayor intensidad en la interacción covalente entre enzima y soporte podría no sólo incrementar la estabilidad del biocatalizador, sino además su propensión a la reactivación. Este fenómeno ha sido estudiado para las proteasas inmovilizadas en relación a sus aplicaciones en la purificación de enzimas de interés farmacéutico (Suh et al., 2005), pero también ha sido detalladamente estudiado en recientes reportes en la literatura (Rodrigues et al., 2009a; Rodrigues et al., 2009c; Miranda et al., 2011; Romero et al., 2012). La unión covalente multipuntual se ha explorado también para la inmovilización/estabilización de enzimas en soportes nanoestructurados y nanogeles (Kim et al., 2006b; Hong et al., 2007a).

De hecho, uno de los factores que afectan la unión covalente multipuntual es la carga enzimática, ya que las cargas bajas permiten la formación de más enlaces covalentes por molécula. Muchos investigadores han estudiado la inmovilización de enzimas en soportes epoxi-activados, remarcando la mejora en estabilidad de los derivados frente a factores como pH, medios orgánicos, temperatura y condiciones de almacenamiento (Torres et al., 2008; Pramparo et al., 2010). El contenido relativamente alto de grupos reactivos en Sepabeads EP y Eupergit C frecuentemente brinda la posibilidad de que la unión covalente multipuntual sea intensa, si se trabaja en las condiciones de inmovilización apropiadas. Agregado a esto, se ha reportado que la incubación alcalina previa al bloqueo de los derivados enzimáticos usualmente incrementa la estabilidad térmica (Mateo et al., 2007a; Grazú et al., 2010; Bolívar et al., 2010; Cowan y Fernández-Lafuente, 2011). Con el objetivo de estudiar el efecto de la unión multipuntual sobre la estabilidad de la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* (enzima monomérica), los derivados se expusieron a condiciones alcalinas (pH 8.5) durante períodos de 8 o 24 horas (Fig. 5.8).



**Figura 5.8. Estrategias de estabilización post-inmovilización. Derivado 1: no bloqueado; Derivado 2: estabilización por bloqueo con glicina; Derivado 3: estabilización por tratamiento alcalino a pH 8.5 y bloqueo con glicina.**

La estabilización en este caso también depende de la carga enzimática y de la duración de la incubación alcalina. Mientras que el tratamiento estabilizante resultó muy efectivo en el caso de los soportes Eupergit C y Eupergit C 250 L en todos los casos, los derivados en Sepabeads EP y HFA exhibieron una débil estabilización sólo a cargas medias. La comparación de vidas medias mostró que los derivados en Eupergit C obtenidos a carga media resultaron los más estabilizados, con un incremento de 10 veces en sus vidas medias con respecto a los correspondientes derivados en Sepabeads EP. Los derivados obtenidos luego del tratamiento alcalino seguido por bloqueo se mostraron dos a tres veces más estables que los correspondientes controles (derivados sólo bloqueados), con un incremento total de 33 veces con respecto a la vida media de la enzima libre (Fig. 5.9). Para cargas aplicadas altas (120 mg/g de gel), los biocatalizadores inmovilizados en Eupergit C pudieron ser también estabilizados significativamente (vidas medias de 207 h y 291 h tras 8 y 24 h de tratamiento alcalino, respectivamente) [Tabla 5.11].



**Figura 5.9. Estabilidad térmica de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa a 50°C.**

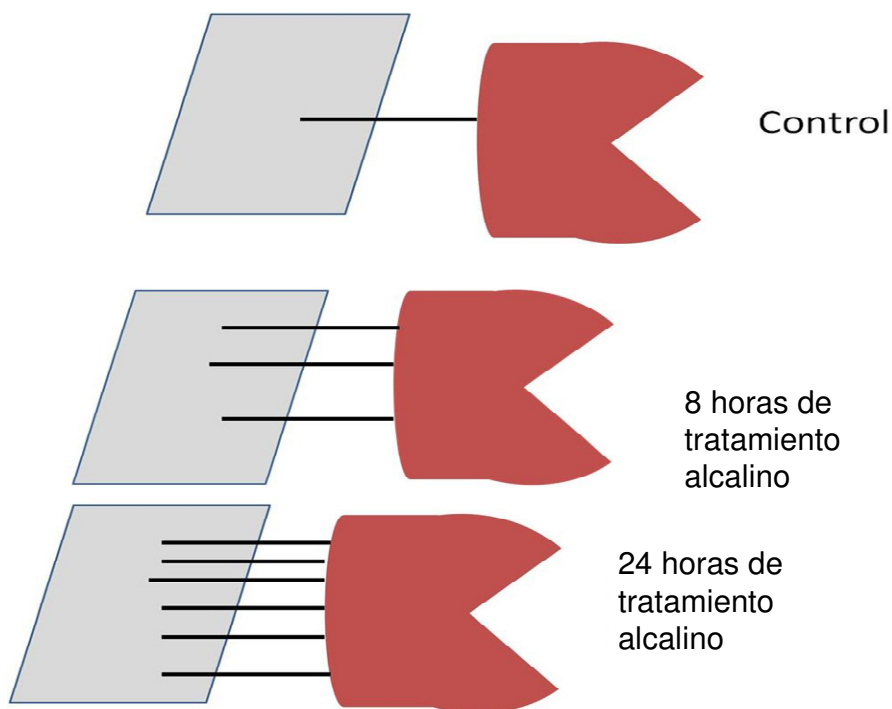
No obstante, los derivados obtenidos a baja carga (inicialmente los más estables), exhibieron pobres niveles de estabilización al aplicar esta estrategia. Los derivados en Eupergit C 250 L obtenidos a cargas medias tuvieron factores de estabilización similares a los encontrados para el caso de Eupergit C (Tabla 5.11). El grado de estabilización obtenido con este soporte moderadamente activado varía en función de la carga aplicada, como se mostró para Eupergit C. Para los derivados a alta carga en Eupergit C 250 L podría esperarse un comportamiento subóptimo en términos de estabilidad térmica. La menor intensidad de unión covalente multipuntual a alta

carga podría a su vez afectar negativamente la estabilidad térmica en comparación con los derivados a carga media. Por otro lado, podría esperarse una menor inactivación debida a la formación de uniones múltiples en el caso de este soporte menos activado (Hernaiz y Crout, 2000; Gómez de Segura, 2004; Bezbradica et al., 2009; Khan et al., 2012).

El Sepabeads EP y el Eupergit C tienen un contenido similar de grupos epóxido (cerca de 100  $\mu\text{mol/g}$  de gel húmedo). Los diferentes grados de estabilización obtenidos durante el proceso de inmovilización/estabilización en Eupergit y Sepabeads podrían deberse a diferencias en el carácter hidrofóbico de estas matrices (Mateo et al., 2002; Mateo et al., 2003; Mateo et al., 2007a). El Sepabeads es levemente más hidrofóbico que el Eupergit. La presencia de una superficie hidrofóbica cercana a la proteína puede disminuir su estabilidad térmica y afectar otras propiedades que dependen de un correcto plegamiento (Mateo et al., 2002; Mateo et al., 2003; Ghazi et al., 2005; Mateo et al., 2007a). La mayor hidrofobicidad determina una interacción más fuerte con la enzima. En la mayoría de los casos, este problema puede resolverse mediante bloqueo con agentes hidrofílicos (como la glicina), pero el éxito de esta estrategia dependerá de la estructura particular de cada enzima. De hecho, la matriz Sepabeads muestra niveles de estabilización muy altos en gran número de casos (Mateo et al., 2007a; Mateo et al., 2007b; Çelem y Onal, 2009). La alta congruencia geométrica entre enzimas y soporte intensifica tanto la unión covalente multipuntual como las interacciones hidrofóbicas con efectos negativos sobre la actividad del biocatalizador. En buena parte de los casos estudiados hasta ahora, el bloqueo con agentes hidrofílicos o la derivatización de la matriz puede superar estas dificultades y resultar en una elevada estabilización térmica de los derivados, incluso cuando se aplica a enzimas multiméricas de termófilos (Fernández-Lafuente, 2009; Barbosa et al., 2011; Cowan y Fernández-Lafuente, 2011). Asimismo, los protocolos de inmovilización pueden determinar diferencias en la estabilidad y otras propiedades de los derivados frente a distintos agentes (Abian et al., 2003; Cabrera et al., 2008; Vieira et al., 2011). En el caso particular de esta enzima, los beneficios de una alta congruencia geométrica que proveen las matrices Sepabeads no logran superar las limitaciones impuestas por los efectos negativos derivados de una mayor hidrofobicidad en comparación con otras resinas acrílicas epoxi-activadas, como Eupergit C. Recientemente se ha reportado un efecto desnaturalizante como consecuencia de la adsorción a resinas epoxi-activadas con base en la copolimerización de alil glicidil éter y etilenglicol dimetacrilato (AGE-EGDM) para el caso de la enzima  $\alpha$ -quimotripsina (Thudi et al., 2012).

La duración del tratamiento alcalino (Fig. 5.10) también afecta la eficiencia de inmovilización, la cual refleja el porcentaje de enzima inmovilizada que permanece activa. Se ha comprobado que esto se relaciona directamente con la intensidad de unión covalente multipuntual

mediante el análisis de la concentración de péptidos producida por digestión controlada con tripsina de los derivados. Mediante este método se pudo observar que al aumentar el tiempo de incubación a pH 8.5, el tratamiento con tripsina de los derivados obtenidos genera menos péptidos libres, mostrando que existe un mayor número de enlaces covalentes entre enzima y soporte, los cuales evitan la separación de algunos de los fragmentos de la digestión proteásica. En base a este análisis se estimó que el número de enlaces proteína-soporte por molécula se multiplica por un factor de 2 y 8 luego de 8 y 24 horas de incubación alcalina respecto al número de enlaces correspondiente a los derivados control sin tratamiento alcalino. La reducción de eficiencia observada luego del tratamiento alcalino indica un incremento de la inactivación debida a la formación de enlaces adicionales entre enzima y soporte (con el potencial de alterar la conformación de la proteína y en particular del sitio activo). Sumado a esto, el descenso en eficiencia luego del tratamiento alcalino es más pronunciado para aquellos derivados obtenidos a cargas aplicadas media y alta, para los cuales la chance de formación de más uniones covalentes es más alta (Tabla 5.11). Estos resultados refuerzan nuevamente la hipótesis de la existencia en este caso de unión covalente multipuntual.



**Figura 5.10. Efecto esperado de la duración del tratamiento alcalino sobre el proceso de unión multipuntual.**

Para el caso de los derivados en Sepabeads EP a cargas baja e intermedia, la presencia de uniones covalentes multipuntuales es sugerida por la reducción en la eficiencia de inmovilización de los derivados luego del tratamiento alcalino post-inmovilización. La gran estabilidad térmica de los derivados a baja carga refuerza esta hipótesis de estabilización, debido a la probable

intensificación de la unión covalente multipuntual en estas condiciones. Esto condice con el hallazgo de que los derivados a cargas media y alta están menos estabilizados, pero el tratamiento alcalino incrementa en mayor grado la estabilidad térmica de estos derivados. Los derivados en Sepabeads HFA, por su parte, exhiben mayores termoestabilidades que los derivados en Sepabeads EP. La adsorción inicial previa a la unión covalente en soportes heterobifuncionales de este tipo se da vía interacciones iónicas y no hidrofóbicas, y posiblemente en orientaciones distintas a las que ocurren en los soportes convencionales, lo cual puede explicar las diferencias observadas (Mateo et al., 2007a).

La estabilización térmica alcanzada para los biocatalizadores  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C a través de la unión covalente multipuntual fue al menos comparable a la reportada para la formato deshidrogenada de *Candida boidinii* y la alcohol deshidrogenasa de hígado equino inmovilizadas en soportes glioxil-agarosa (Bolívar et al., 2006; Bolívar et al., 2007), y para la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* inmovilizada en sílica macro-mesoporosa químicamente modificada (Bernal et al., 2012). Sin embargo, el factor de estabilización logrado en este trabajo es menor que la estabilización de 260 veces a 55°C obtenida por inmovilización de carboxipeptidasa A en glioxil-agarosa y al obtenido para otras proteasas en el mismo soporte (Tardioli et al., 2003; Cabrera-Padilla et al., 2009; Galvão et al., 2009) y a su vez inferior a la estabilización de entre 300 y 600 veces obtenida para la celobiasa inmovilizada en amino-epoxi-agarosa (Vieira et al., 2011), la glucoamilasa previamente aminada con etilendiamina e inmovilizada en soportes glioxil-agarosa altamente activados (Tardioli et al., 2011), la D-aminoácido oxidasa de *Trigonopsis variabilis* inmovilizada en Sepabeads EA mediante entrecruzamiento con glutaraldehído, y la glutaril acilasa en soportes amino-epoxi-Sepabeads activados con glutaraldehído (López-Gallego et al., 2004; López-Gallego et al., 2005), respectivamente.

#### *Parámetros cinéticos*

La  $K_m$  de la enzima libre y la  $K_m$  aparente de los derivados de carga media en Eupergit C y Sepabeads EP fueron determinados a 30°C, 40°C y 50°C, utilizando lactosa como sustrato, asumiendo una cinética de Michaelis-Menten y empleando para el cálculo la linealización de Eadie-Hofstee (Tabla 5.12). Los valores de  $K_m$  son más altos para los derivados que para la enzima soluble (71 mM para derivado en Eupergit C y 60 mM para derivado en Sepabeads EP, frente a 25 mM para la enzima soluble a 30°C), y decrecen con el incremento de temperatura. Se han reportado resultados en la literatura, reafirmando el hecho de que la afinidad de la enzima por su sustrato es afectada por el tipo de soporte y la accesibilidad del sustrato al sitio activo, de modo que la

eficiencia de inmovilización en general disminuye, tanto en ambientes acuosos como en solventes orgánicos (Arica y Hasirci, 1993; Hernaiz y Crout, 2000; Karboune et al., 2005; Petkar et al., 2006). Como se esperaba,  $K_m$  disminuyó con el incremento de temperatura. Cuando la temperatura se incrementa de 30°C a 50°C,  $K_m$  decrece aproximadamente 3 veces para los derivados en Eupergit C, mejorando por tanto la afinidad por lactosa de los mismos. Los derivados en Eupergit C fueron estabilizados, lo cual permite realizar lactolisis a 50°C, y este hecho representa una ventaja considerando la aplicación de estos biocatalizadores. Se ha reportado que la inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* en Eupergit C 250 L produce un cambio en la especificidad respecto a ONPG y lactosa, aumentando la actividad frente al sustrato natural (Pessela et al., 2007).

No se encontró diferencia significativa en los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  a 30°C, si bien las  $V_{m\acute{a}x}$  para los derivados en Eupergit C a 40°C y 50°C son aproximadamente 1.3-1.4 veces más bajas que para la enzima soluble. Los derivados en Sepabeads mostraron valores de  $V_{m\acute{a}x}$  regularmente más bajos que los hallados en el caso de los derivados en Eupergit C. Tanto  $K_m$  como  $V_{m\acute{a}x}$  presentan valores en el mismo orden de magnitud para la enzima libre e inmovilizada, con independencia del soporte utilizado, comportamiento que ha sido reportado en el caso de esta enzima inmovilizada en Eupergit C (Hernaiz y Crout, 2000), así como de la actividad fructosiltransferasa de la preparación Pectinex Ultra SP-L en el mismo soporte (Tanriseven y Aslan, 2005; Aslan y Tanriseven, 2007a), y más recientemente para las enzimas lipooxigenasa e hidroperóxido liasa coinmovilizadas en Eupergit C y Eupergit C 250 L-IDA (Hall et al., 2008), y la L-aminoacilasa de *Aspergillus melleus* inmovilizada en esferas macroporosas de la resina hidrofílica poli (glicidilmetacrilato-co-etilenglicol dimetacrilato) [poli (GMA-co-EGDMA)] (Vaidya et al., 2012).

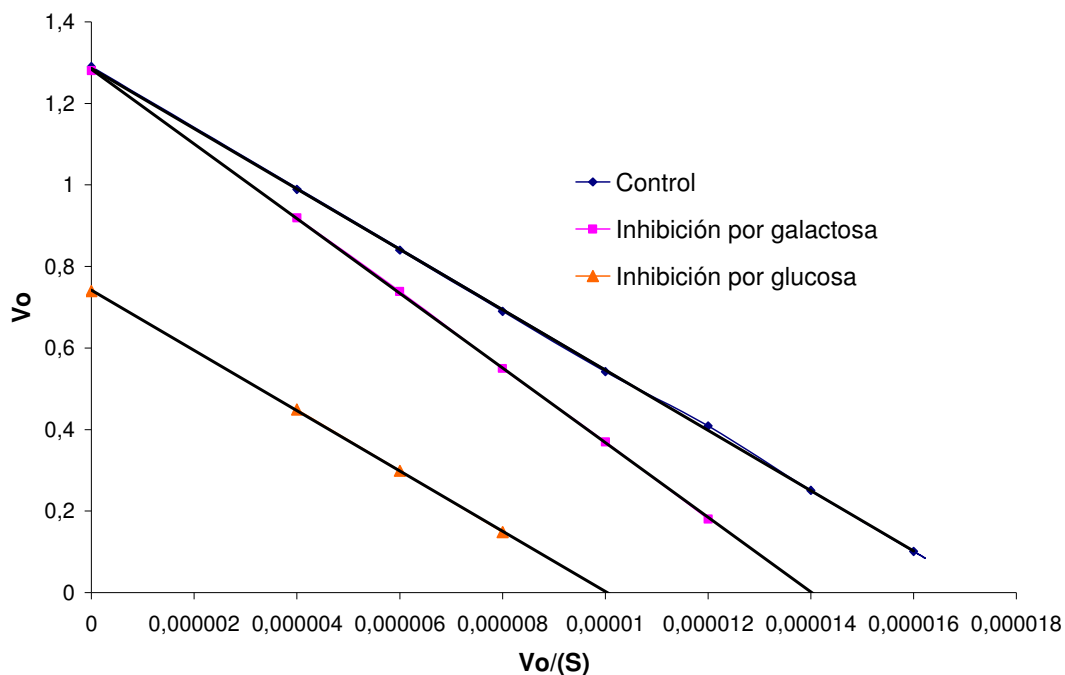
**Tabla 5.12. Parámetros cinéticos de  $\beta$ -galactosidasa soluble y sus derivados en Eupergit C y Sepabeads EP para lactosa como sustrato.**

<i>Biocatalizador</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i><math>K_m</math> (mM)</i>	<i><math>V_{max}</math> (<math>\mu</math>M/min)</i>
Enzima nativa	30	25	0.48
	40	16	0.82
	50	12	1.68
Derivado en Eupergit C	30	71	0.42
	40	45	0.57
	50	24	1.28
Derivado en Sepabeads EP	30	60	0.31
	40	43	0.42
	50	29	1.11

Tanto la enzima libre como sus derivados son inhibidos por D-galactosa cuando se trabaja con mezclas conteniendo niveles variables de lactosa y galactosa iniciales (0-500 mM). La D-galactosa se ha descrito como inhibidor competitivo de la enzima (Mozaffar et al., 1984). Por su



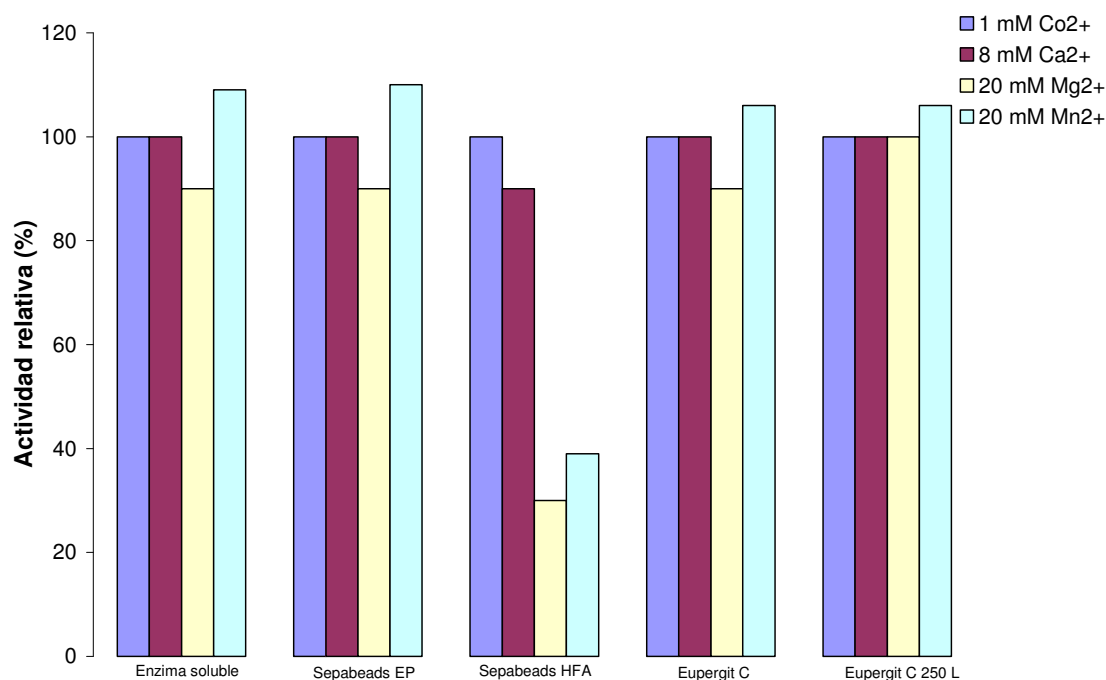
parte, en este trabajo se constató que la glucosa se comportó como inhibidor no competitivo. Los  $K_i$  calculados para galactosa y glucosa fueron 24 mM y 74 mM a 50°C, respectivamente, en el caso de los derivados en Eupergit C (Figura 5.11). Se ha reportado que la  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus* sp. T2 inmovilizada en boronato-epoxi-Sepabeads y quelato-epoxi-Sepabeads muestra un aumento significativo de sus  $K_i$  para galactosa y glucosa (Pessela et al., 2003). La comparación de las  $K_i$  de la enzima soluble (36 mM) y los derivados  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C (74 mM) y  $\beta$ -galactosidasa-Sepabeads EP (86 mM) muestra un efecto similar únicamente en relación a la glucosa.



**Figura 5.11.** Efecto de galactosa y glucosa sobre la actividad de derivados  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C.

#### *Efecto de iones divalentes sobre la actividad de los derivados*

Se determinó el efecto de iones divalentes seleccionados ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ ) sobre la actividad lactasa de la enzima soluble y sus derivados (Fig. 5.12). En ninguno de los casos la actividad se ve afectada a la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  empleada (1 mM), en tanto que la misma aumenta ligeramente en presencia de una concentración de  $\text{Mn}^{2+}$  de 20 mM. Asimismo se verificó un leve descenso de la actividad en presencia de 20 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , excepto en el caso de los derivados en Eupergit C 250 L. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (8 mM),  $\text{Mg}^{2+}$  (20 mM) y  $\text{Mn}^{2+}$  (20 mM) reducen la actividad de los derivados en Sepabeads HFA. Este efecto puede atribuirse a que, debido a su naturaleza, la matriz Sepabeads HFA se comporta como un intercambiador iónico.

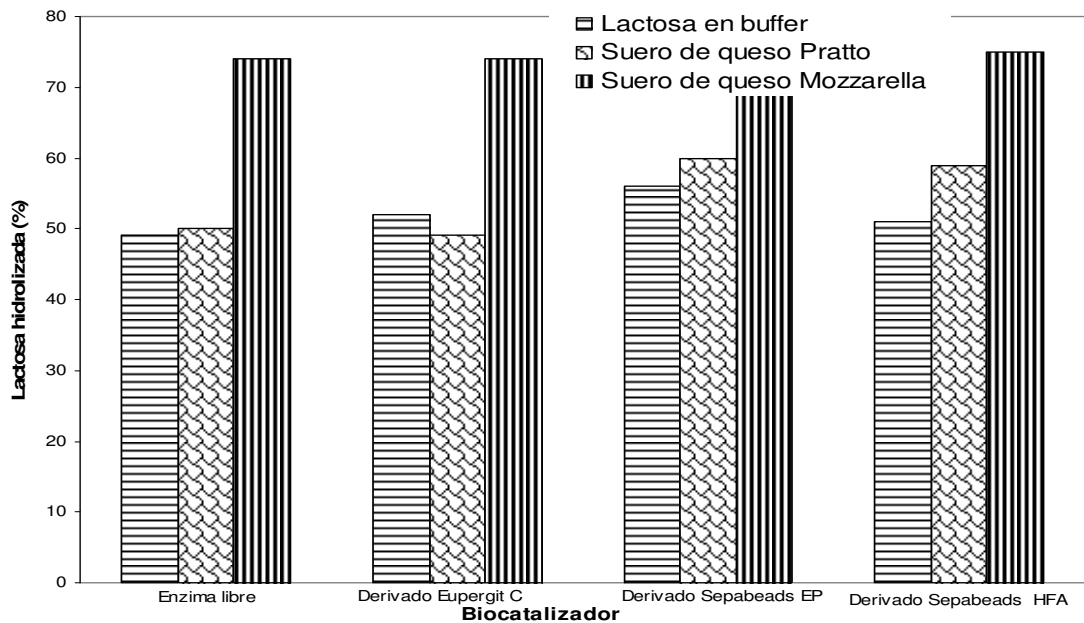


**Figura 5.12. Efecto de iones metálicos sobre la actividad lactasa de la enzima soluble y de sus derivados.**

### **5.1.3. Aplicaciones**

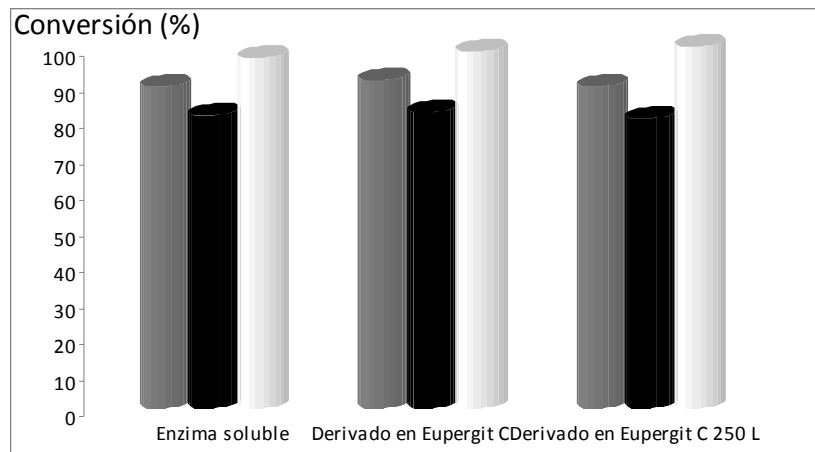
#### **Hidrólisis de lactosa**

Las reacciones se llevaron a cabo en bio-reactores en batch con lactosa 4.6% en amortiguador de actividad y lactosueros ajustados a pH 6.0 como sustratos y a una temperatura de 25°C. Los porcentajes de lactólisis alcanzados a 25°C dependieron del sustrato empleado. Los mayores niveles de conversión se obtuvieron cuando se utilizaron lactosueros de queso Mozzarella, los que a su vez presentaron cinéticas más rápidas que los otros sustratos ensayados (Fig. 5.13). En este caso, los máximos grados de conversión se obtuvieron empleando la enzima soluble, y sus derivados en Eupergit C y Sepabeads HFA. Tras seis ciclos sucesivos, los grados de hidrólisis permanecieron por encima del 70% para todos los derivados.



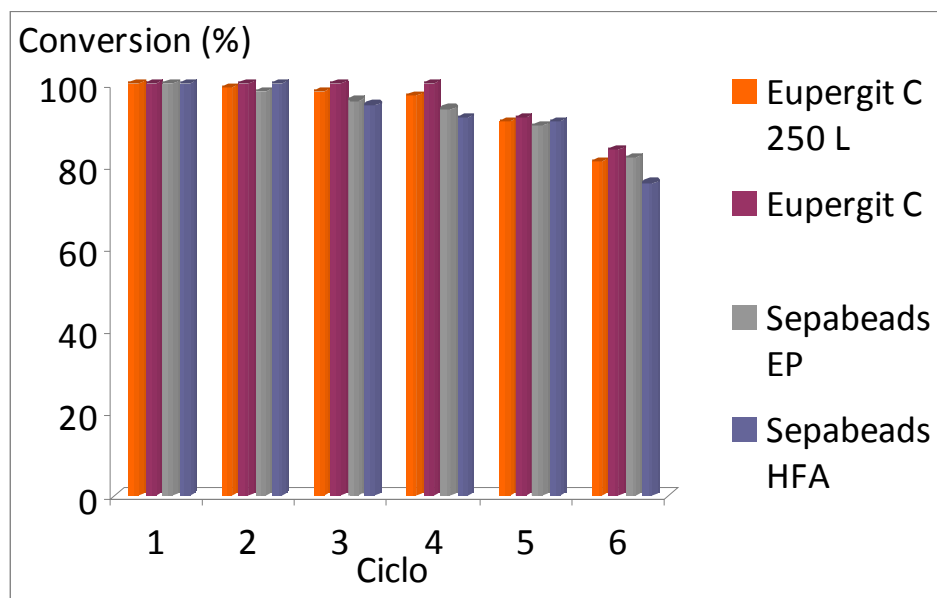
**Figura 5.13. Grados de lactolisis alcanzados en 3 h en procesos en batch a 25°C, con cantidades equivalentes de  $\beta$ -galactosidasa soluble e inmovilizada.**

Los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L fueron los que exhibieron las mayores estabildades térmicas. Esta mayor termoestabilidad permitió estudiar su comportamiento durante su aplicación en procesos de lactolisis de sueros de quesería a mayores temperaturas. Las reacciones se llevaron a cabo en bio-reactores en batch con lactosa 4.6% en amortiguador de actividad y lactosueros ajustados a pH 6.0 como sustratos y a una temperatura de 50°C. Los porcentajes de lactolisis alcanzados dependieron del sustrato empleado (Fig. 5.14), y se encontraron entre 77-97%. Las conversiones más altas se obtuvieron empleando sueros de Mozzarella, para los cuales los derivados también exhibieron cinéticas más rápidas que con otros sustratos.



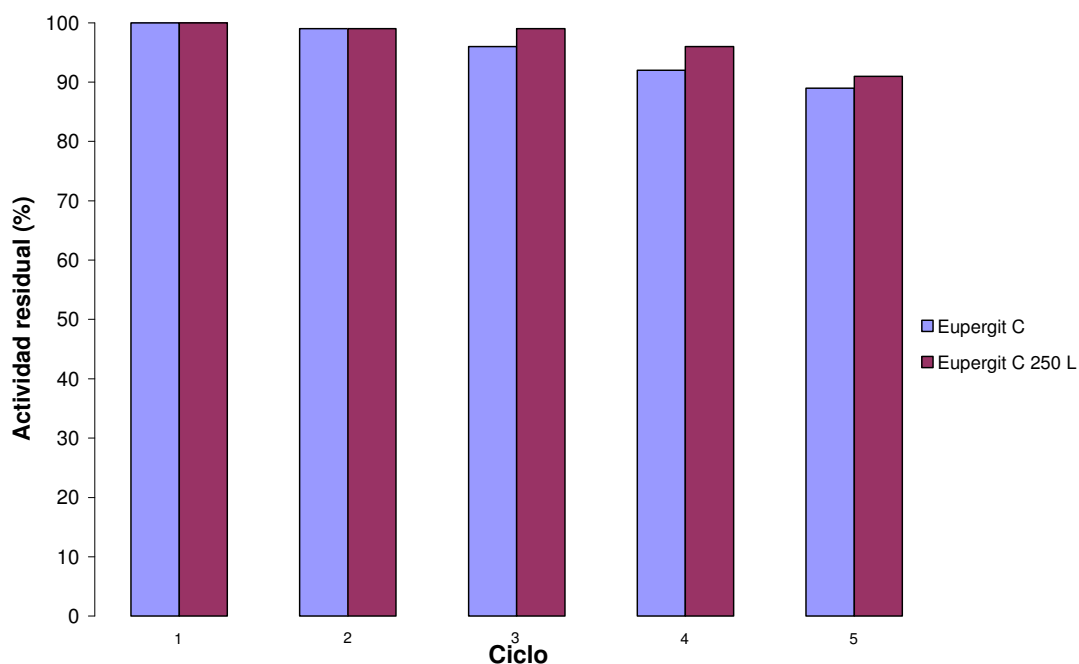
**Figura 5.14.** Lactolisis en batch a 50°C con  $\beta$ -galactosidasa soluble e inmovilizada. Sustratos: ■ lactosa 4.6% ■ suero de queso Pratto □ Suero de queso Mozzarella. El tiempo de incubación fue de 90 minutos.

Los derivados insolubles de  $\beta$ -galactosidasa en los cuatro soportes estudiados (Eupergit C, Eupergit C 250 L, Sepabeads EP y Sepabeads HFA) fueron reusados en procesos en batch sobre suero de queso Mozzarella a 50°C. Luego de 6 ciclos, la hidrólisis de lactosa permaneció por encima del 75% para todos los derivados (Fig. 5.15).



**Figura 5.15.** Reuso de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa en procesos en batch a 50°C con suero de Mozzarella.

Los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L exhibieron actividades residuales de más del 89% luego de cinco ciclos (Fig. 5.16).



**Figura 5.16.** Actividades residuales de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L al cabo de sucesivos usos.

Los valores de conversión alcanzados con los derivados desarrollados en este trabajo fueron más altos que los reportados empleando la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, tanto en forma soluble como adsorbida en ZnO y nanopartículas de ZnO, para los cuales se obtuvieron grados de hidrólisis de 61%, 68% y 81% luego de 9 horas en procesos en batch (Husain et al., 2011); y similares a los obtenidos con la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada en tiolsulfonato-agarosa (Ovsejevi et al., 2004).

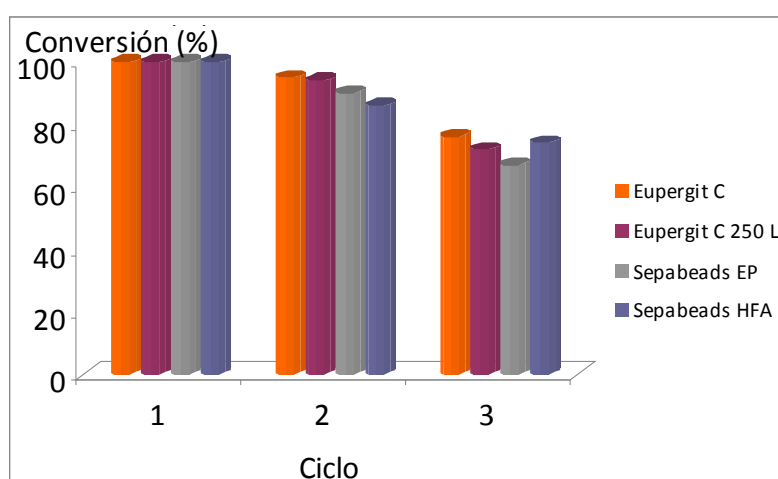
Otra alternativa considerada en el desarrollo de reactores con  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada fue la hidrólisis de lactosa en suero en reactores operando en modo continuo. Con este propósito, los derivados se empacaron en reactores en columna, los cuales se alimentaron en modo continuo con una variedad de sueros de quesería (Goya, Danbo, Mozzarella, Pratto, Manchego) a diferentes temperaturas (30°C, 40°C y 50°C). La hidrólisis de lactosa se incrementó desde 59% a 30°C hasta más de 80% a 50°C con los derivados en Eupergit C (Tabla 5.13).

**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.**

<i>Biocatalizador</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Sustrato</i>				
		<b>Lactosa</b>	<b>Goya</b>	<b>Danbo</b>	<b>Mozzarella</b>	<b>Pratto</b>
<b>Derivado en Eupergit C</b>	30	59	59	61	79	61
	40	79	81	79	91	81
	50	90	89	91	98	93
<b>Derivado en Eupergit C 250 L</b>	30	49	51	50	60	59
	40	71	79	69	80	78
	50	81	80	82	91	90

Porcentajes de lactolisis alcanzados a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. El sustrato correspondiente se recirculó durante 3 horas.

El bio-reactor empacado con el derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C también fue reusado; los niveles de conversión alcanzados luego del segundo y tercer ciclo fueron 95% y 76%, respectivamente (Fig. 5.17). Los mismos son independientes del sustrato empleado.



**Figura 5.17. Reuso de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa en procesos en columna con suero de Mozzarella como sustrato.**

Estos resultados son comparables con reportes previos de la literatura. La  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* inmovilizada en Duolite ES-762 llevó a cabo la hidrólisis de lactosa con niveles de conversión del 70% en reactores del tipo tanque agitado en modo continuo (Nakanishi et al., 1983; Mozzafar et al., 1985). La  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* inmovilizada en un reactor de lecho empacado mostró valores de hidrólisis de 80% en suero, en tanto que la  $\beta$ -galactosidasa de *Saccharomyces fragilis* inmovilizada produjo una hidrólisis de lactosa del 50% en 3 horas en un reactor de lecho empacado con recirculación (Panesar et al., 2010). Por su parte la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada en CPC-silica (silanizada y activada con glutaraldehído) y agarosa activada con agentes cianilantes mostró una conversión de lactosa del 90% en minireactores de lecho empacado (Giacomini et al., 1998). Una hidrólisis del 86-90% en permeado de suero se obtuvo al

trabajar con la  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis* inmovilizada en vidrio poroso silanizado modificado con glutaraldehído, tanto en batch como en un reactor de lecho empacado con recirculación de sustrato (Panesar et al., 2010).

#### Influencia de la relación derivado/sustrato sobre la lactolisis

Se estudió el efecto de la relación derivado/sustrato para el derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C, manteniendo constante la concentración de sustrato y empleando cantidades variables de derivado (50-250 mg). En el rango ensayado el comportamiento es lineal, correspondiendo mayores velocidades de reacción a mayores cantidades de derivado (Fig. 5.18).

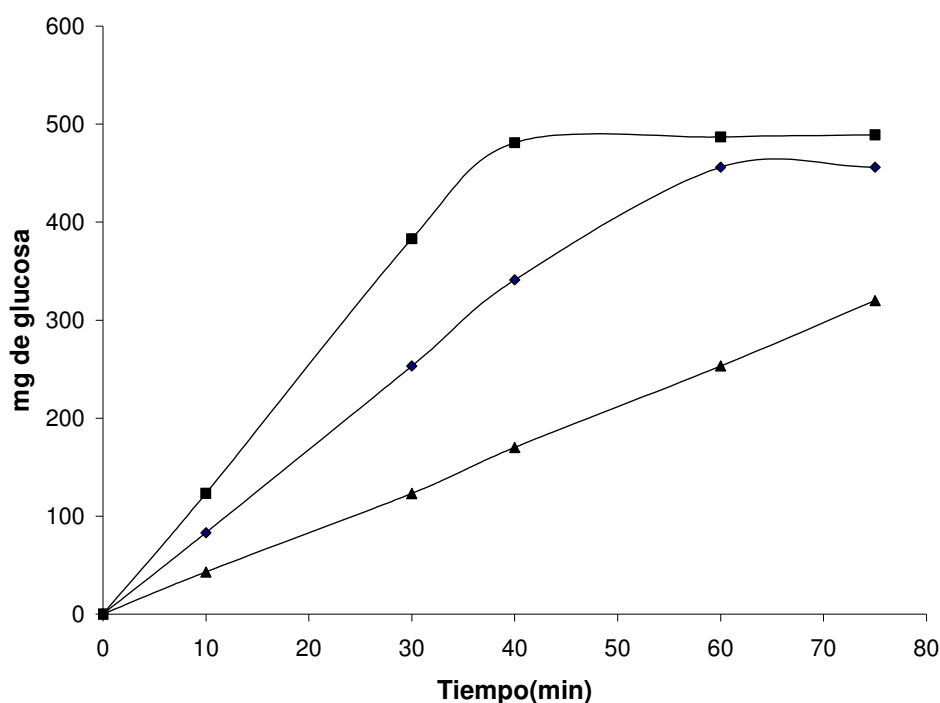


Figura 5.18. Lactolisis de suero de queso Mozzarella con derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C para distintas relaciones derivado/sustrato. El volumen de sustrato ofrecido se mantuvo en 10 mL. Las masas de derivado empleado fueron ■ 250 mg ◆ 100 mg ▲ 50 mg.

#### Efecto de agentes sanitizantes

Se estudió la estabilidad de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa en Sepabeads EP, Eupergit C y C 250 L frente a distintos agentes sanitizantes de uso industrial. Se emplearon derivados que fueron utilizados en numerosos ciclos de reuso a 50°C con lactosuero de queso Mozzarella, con actividades remanentes en el entorno del 50% respecto a la inicial. Ambos tipos de derivados

mostraron perfiles similares en los ensayos. A continuación se describen los resultados para los derivados en Eupergit C.

Empleando peróxido de hidrógeno a concentraciones entre 0.05% y 0.1% se observa una recuperación de actividad en el entorno de 10%, rindiendo el derivado 3 usos adicionales sin descenso significativo de su actividad (Tabla 5.14).

**Tabla 5.14. Efecto de agentes sanitizantes sobre la actividad de los derivados en Eupergit C.**

Usos post-sanitización	Tego Diocto 0.1%	Tego Diocto 0.3%	Tego Diocto 0.5%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.05%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.1%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.1% y Tego Diocto 0.3%
Presanitizado	49	49	49	49	49	49
Primer ciclo	69	72	76	56	61	69
Segundo ciclo	61	69	72	59	53	66
Tercer ciclo	64	68	62	49	46	60

Empleando Tego-Diocto a concentraciones entre 0.1% y 0.5 % se observa una recuperación de actividad en el entorno de 20%, rindiendo el derivado cuatro usos adicionales antes de que la actividad caiga de manera apreciable. Con una concentración de 0.5% del detergente se consigue la recuperación de actividad mayor, de 26% (Tabla 5.14).

El empleo secuencial de ambos agentes (peróxido 0.1% y Tego-Diocto 0.5%) conduce a una recuperación de actividad menor que la obtenida con el detergente, evidenciando un posible efecto de inactivación del derivado por el peróxido (Tabla 5.14).

Se ensayó un tratamiento alternativo, empleando NaOH 0.05 M a 30 °C por 15 minutos, resultando un tratamiento demasiado agresivo para el derivado, que exhibió menor actividad luego del mismo.

#### Estudios preliminares de escalado de procesos de lactolisis

Empleado en condiciones de operación en procesos en batch a escala de laboratorio, el derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C se usó en la hidrólisis de lactosa (50 g/L) en soluciones amortiguadoras y permeados de lactosuero, alcanzando altos grados de conversión. Empleando una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 2,5 U para producir la hidrólisis en 300 mL de una solución de lactosa (50 g/L) en amortiguador fosfato de sodio 0,1 M a pH 6,0 y a 50°C, al cabo de 72 horas se alcanzó una conversión del 92%.

Por otra parte, en un ensayo de similares características usando permeado de suero de quesería, se ensayó una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 2,5 U para producir la



hidrólisis en 300 mL de permeado (50 g/L de lactosa), ajustado a pH 6,0 y a una temperatura de 50°C, alcanzándose luego de 72 horas de operación una conversión del 77%. Al cabo de dicho tiempo de operación, la actividad residual se ubicó en aproximadamente el 40% de la actividad inicial.

Como pudo observarse, bajo las condiciones de operación ensayadas, el derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C mostró un promisorio comportamiento, resultando por tanto interesante poder evaluar su aplicabilidad a escala industrial. En una primera instancia, el mayor inconveniente para esta utilización radica en el tamaño de partícula del soporte. Por tal motivo, buscando mejorar su adaptabilidad a diferentes escalas y configuraciones de trabajo, sin disminuir su estabilidad operacional, se analizaron dos posibles estrategias para emplear el derivado: atrapar las partículas del derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C dentro de una membrana de diálisis adecuada para permitir la realización de la reacción de hidrólisis, o entrapar las partículas de derivados  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C en esferas de alginato de calcio.

La estrategia del confinamiento por una membrana se desarrolló encerrando una determinada cantidad del derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C (entre 9,0 y 14,0 U) en el interior de una membrana tubular de diálisis de 1000 Da de tamaño molecular de corte nominal. Se ensayó la hidrólisis de lactosa en alícuotas de 300 mL de solución de lactosa en amortiguador fosfato de sodio 0,1 M, de permeado de lactosuero y leche descremada, todas convenientemente ajustadas para mantener el tenor inicial de lactosa (50 g/L), el pH en 6,0 y la temperatura en 50 °C (Torres et al., 2009).

Empleando una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 10,0 U para producir la hidrólisis en un sistema batch con 300 mL de una solución de lactosa (50 g/L) en amortiguador fosfato de sodio 0,1M a pH 6,0 y a 50 °C, al cabo de 20 horas se alcanzó una conversión del 90%.

En ensayos similares, empleando una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 9,0 U y 9,3 U para producir la hidrólisis en 300 mL de permeado y leche descremada (5 g/L de lactosa), ambos ajustados a pH 6,0 y a una temperatura de 50 °C, se obtuvieron para 20 horas y 14 horas de operación conversiones del 88% y del 53%, respectivamente.

A su vez, pudo observarse que la presencia de la membrana de diálisis afectó de forma poco significativa los niveles de conversión alcanzados, evidenciando que no existe un efecto de concentración del inhibidor galactosa en un sistema como el descrito, en relación al batch control sin membrana de diálisis.

Por otra parte, la actividad remanente tras el uso del biocatalizador en este sistema estuvo en el entorno del 50-70%. De este modo fue posible realizar un ciclo adicional de reutilización, donde

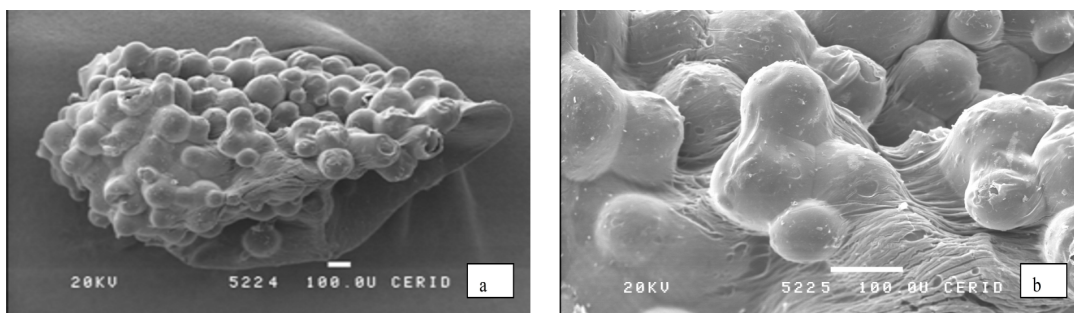
los niveles de conversión alcanzados resultaron comparables al primer uso, a diferencia del batch control sin membrana de diálisis desarrollado en paralelo.

No obstante los buenos resultados obtenidos con el confinamiento del biocatalizador  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C en una membrana de diálisis, su aplicabilidad a escalas mayores depende de las membranas tubulares disponibles comercialmente, las que incrementan considerablemente su costo a medida que aumenta el diámetro de la misma.

#### Entrampado en alginato de calcio y configuraciones de reactor empleadas

Son múltiples las aplicaciones de los hidrocoloides en la industria. Como matrices de inmovilización se han empleado tanto para el entrampamiento directo de enzimas solubles, inmovilización por adsorción física o más recientemente para la inmovilización covalente, mediante el empleo de agentes entrecruzantes que forman puentes entre enzima y soporte (por ejemplo el glutaraldehído). En el caso del alginato, una de las matrices hidrocoloides más utilizadas y estudiadas, sus características permiten combinarlo con muchos otros polímeros de interés como soporte de inmovilización (Silva et al., 2012). No obstante, en general los mayores inconvenientes del alginato se refieren a la pérdida de enzima cuando se trata de métodos no covalentes (entrampamiento o adsorción física), o el descenso de la eficiencia de inmovilización cuando se trabaja con reactivos entrecruzantes que llevan a la inactivación de una fracción más o menos importante de la enzima efectivamente inmovilizada.

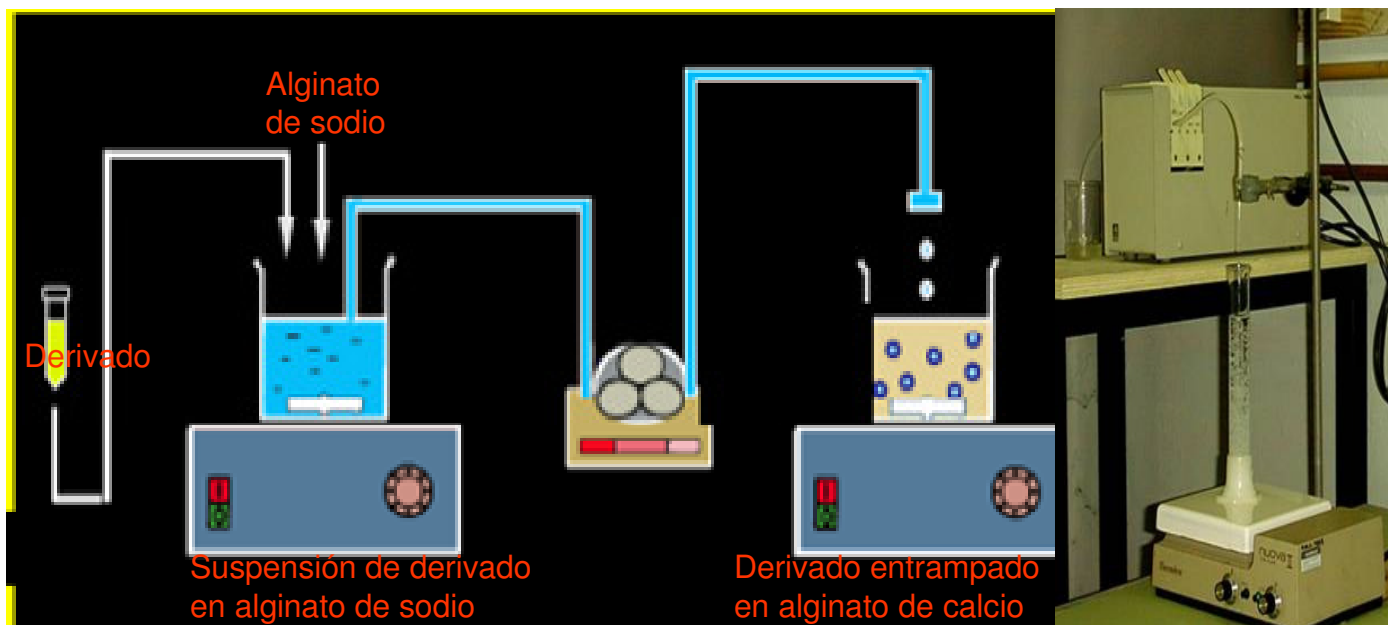
Durante las pasantías realizadas en el marco de esta Tesis en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, Santa Fe, Argentina), se ha desarrollado en colaboración con el Grupo de Tecnología de los Alimentos y Biotecnología de dicho instituto, una nueva estrategia para intentar una estabilización térmica y mecánica adicional de la enzima mediante el entrampado del derivado enzimático  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C en partículas de alginato de calcio (Fig. 5.19). La estrategia de entrampado de la enzima inmovilizada covalentemente, proporciona nuevas aplicaciones para estos derivados enzimáticos, eliminando la pérdida que resulta del entrampamiento directo de la enzima en alginato, y los inconvenientes relacionados con el reducido tamaño de partícula del biocatalizador en resinas acrílicas comerciales (Torres et al., 2007). Una estrategia similar ha sido reportada recientemente en el caso de la dextranasa y dextranasa coinmovilizadas en Eupergit C (Olçer y Tanriseven, 2010).



**Figura 5.19.** Microscopía electrónica de barrido del biocatalizador  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C atrapado en alginato de calcio a 60x (a) y 200x (b).

La estrategia de atrapamiento del derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C en perlas de alginato de calcio se desarrolló realizando algunas modificaciones al procedimiento descrito por Yadav y Jadhav para el atrapamiento de lipasa preinmovilizada en sílica mesoporosa hexagonal (Mammarella y Rubiolo 1996; Yadav y Jadhav 2005). 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  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C 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  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 5.20).



**Figura 5.20.** Entrapamiento de derivados  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C en partículas de alginato de calcio.

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 translúcida para tornarse semiopacas. Las esferas de biocatalizador fueron extraídas del baño gelificante después de 1 hora, lavadas con agua destilada y colocadas en agua destilada en refrigerador a 4 °C (Torres et al., 2009).

Para analizar la efectividad del proceso de entrapamiento, se realizó la observación por microscopía electrónica de barrido de los biocatalizadores obtenidos, sometiéndolos previamente a un proceso de deshidratación por liofilización. Por tratarse de hidrogeles con más del 90% de agua en su composición, el proceso de liofilización afectó sustancialmente la forma y tamaño de las partículas pero permitió realizar la observación microscópica para verificar la incorporación completa y efectiva del derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C en la matriz de alginato, lo que impide su liberación al medio de reacción (Fig. 5.19).

La resistencia mecánica del hidrogel puede variar con las condiciones a que es sometido durante la reacción (tiempo-temperatura) y al contacto del mismo con el medio reaccionante, factores que pueden producir efectos de hinchamiento y debilitamiento de la estructura del soporte con la subsecuente pérdida de la enzima inmovilizada. Por lo cual 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, que no experimenta cambios en su apariencia, ni liberación de calcio. Sobre los mismos se realizó un seguimiento del aspecto macroscópico visual de las partículas, así como un seguimiento de la pérdida de calcio (mediante el uso de un kit colorimétrico), el cual es el agente responsable del mantenimiento de la estructura de la matriz del gel.

En vistas de la posible liberación de calcio desde la partícula de alginato al medio, se realizó un estudio de la cinética de liberación de calcio correspondiente a 200 mg de derivado atrapado incubados en amortiguador fosfato de sodio 0,1 M a una temperatura de 50 °C y pH entre 5,5 y 8,0 y se siguió por un período de 24 horas. No se evidenció liberación de calcio durante las primeras 9 horas para ninguno de los pH ensayados. Tras 24 horas de incubación todas las muestras exhibieron deformaciones de las partículas de alginato, siendo las más afectadas las esferas que se colocaron en pH 7,5 y 8,0, donde se obtuvieron los valores más altos de liberación de calcio. El control (perlas de alginato de calcio en agua destilada) no presentó deformaciones ni liberación de calcio después de 24 horas, evidenciando el efecto de secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del fosfato del amortiguador (Torres et al., 2009).

Se realizó un ensayo similar, pero colocando las partículas en amortiguador suplementado con cloruro de magnesio entre 0,025 y 0,1 M, para pH 6,0 y 7,5. Después de 24 horas las esferas colocadas a pH 6,0 no mostraron deformación ni liberación de calcio para ninguna de las concentraciones de cloruro de magnesio empleadas. Las partículas que se mantuvieron en pH 7,5

mostraron deformación y liberación de calcio; sin embargo, para una concentración de cloruro de magnesio de 0,1M no se evidenció deformación y la liberación de calcio resultó menos importante.

Asimismo, se siguió la liberación de calcio a lo largo de los ensayos de lactólisis llevados a cabo con el biocatalizador en lecho empacado (realizados con permeado a pH 6,0). Después de 48 horas de operación la liberación de calcio se ubicó en menos del 20%, verificándose sólo un ligero incremento del volumen de la partícula, sin cambios significativos en sus propiedades funcionales.

A continuación, se estudió la influencia de la carga de derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C entrampado en las partículas de gel sobre el grado de hidrólisis obtenido. Para tal fin se prepararon biocatalizadores de 3,0 mm de diámetro, con cargas de 10, 20 y 30 mg de derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C por mL de alginato. Los biocatalizadores obtenidos se empacaron en un reactor tubular de 57,8 mL de volumen total y una relación L/D de 340/14, equipado con camisa calefactora y baño de recirculación. Empleando una bomba peristáltica, el reactor fue alimentado 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 30 mL/h y una temperatura de operación de 50 °C.

Para cargas de 10 mg/mL, después de 80 horas de operación se alcanzó una conversión del 85%, mientras que para cargas de 20 mg/mL y 30 mg/mL la conversión final alcanzada fue de 84%, al cabo de 50 y 32 horas de operación, respectivamente.

Como pudo observarse, no se evidenciaron diferencias significativas respecto al grado de conversión alcanzado, por tanto se concluyó que el entrampamiento no produjo un efecto de concentración del inhibidor galactosa en las cercanías de la enzima. Asimismo, analizando el tiempo de operación necesario para alcanzar el máximo grado de hidrólisis puede observarse que existe una relación prácticamente lineal entre este parámetro y la carga de derivado, lo que evidencia que la incorporación de cargas diferentes al entrampado no involucra una modificación en la resistencia a la difusión del sustrato.

Por otra parte, a medida que aumenta la carga del derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C en el biocatalizador, para alcanzar un mismo nivel de conversión se los debe mantener en condiciones de reacción por menos tiempo. Esta relación prácticamente lineal entre la actividad recuperada y la carga de derivado, evidencia que el modelo de desactivación térmica adoptado representa adecuadamente este proceso en las condiciones de operación escogidas (Torres et al., 2009).

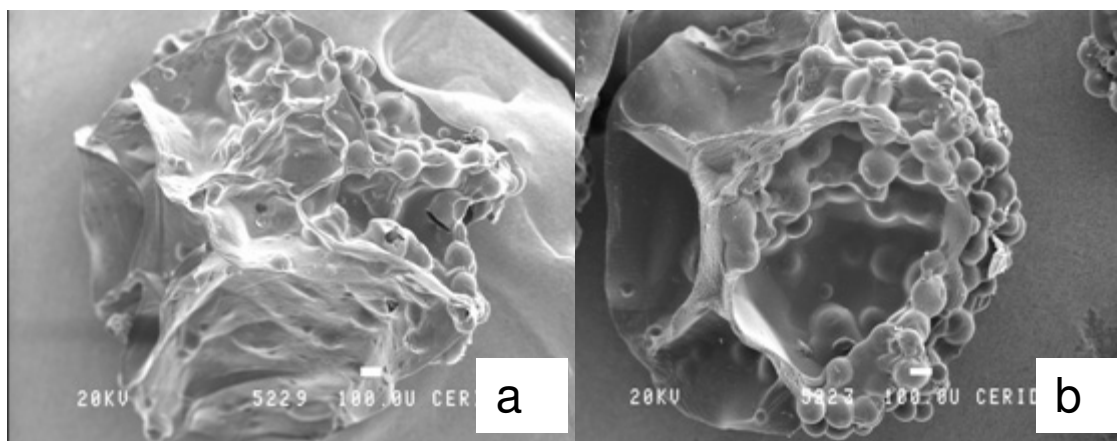
Asimismo, para analizar el grado de resistencia a la difusión que experimenta el sustrato cuando el derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C es entrampado en una matriz de 4% de alginato, se realizaron ensayos de hidrólisis en el mismo reactor que se usó anteriormente, con biocatalizadores de diferentes tamaños. Para tal fin se prepararon biocatalizadores de 2,0, 3,0 y 3,5 mm de diámetro, todos con cargas de 30 mg de derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C por mL de alginato. Para todos

los tamaños de biocatalizador ensayados se alcanzó el mismo grado de conversión (84%), variando en todos los casos el tiempo necesario para ello y la actividad remanente del biocatalizador. Este nivel de conversión obtenido en permeado es comparable al alcanzado con la  $\beta$ -galactosidasa de *Penicillium notatum* inmovilizada en vidrio poroso silanizado modificado con glutaraldehído en reactores de tipo batch y lecho fijo (Szczodrak, 1999). Por su parte, Rhimi et al. (2010b) han reportado la utilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Streptococcus lactis* LMD9 inmovilizada en alginato en la hidrólisis de lactosa en leche y sueros de quesería.

Analizando el tiempo de operación necesario para alcanzar el máximo grado de hidrólisis puede observarse que existe una relación prácticamente lineal entre este parámetro y el tamaño de la partícula de biocatalizador, lo que evidencia la uniformidad del proceso difusivo y de la distribución del derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C en el interior de la partícula de biocatalizador, pudiéndose por tanto suponer que el proceso se realiza en estado estacionario.

Por otra parte, comparando los tiempos de operación necesarios para alcanzar un mismo grado de hidrólisis, usando una misma carga de derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C entrampado en alginato de calcio y sin entrampar, se observa que el entrampamiento introduce una resistencia adicional al proceso difusivo que representa un incremento de alrededor del 20% en dichos tiempos.

A fin de analizar las condiciones de reutilización de los biocatalizadores producidos por entrampamiento, se procedió a comparar la calidad de la superficie externa de los mismos antes y después de utilizarlos en ensayos de hidrólisis hasta alcanzar el máximo de conversión posible con solución de lactosa (50 g/L) en amortiguador fosfato de sodio 0,1M y permeado diluido (50 g/L de lactosa), ambos ajustados a pH 6,0 y sometidos a una temperatura constante de 50 °C. Este análisis se realizó a través de la observación por microscopía electrónica de barrido de muestras de biocatalizadores sometidos previamente a un proceso de deshidratación por liofilización. Por tratarse de hidrogeles con más del 90% de agua en su composición, el proceso de liofilización afectó sustancialmente la forma y tamaño de las partículas pero posibilitó realizar la observación microscópica para verificar que el aspecto superficial del biocatalizador no cambia durante el proceso de operación, ni se verifican depósitos importantes de sustancias extrañas cuando se emplea solución de lactosa o permeado de suero de quesería (Figura 5.21).



**Figura 5.21.** Microscopía electrónica de barrido del biocatalizador  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C entrampado en alginato de calcio luego del uso con lactosa (a) y permeado de lactosuero (b).

Esta verificación permite evitar la necesidad de la implementación de un proceso profundo de limpieza o reactivación de la superficie del biocatalizador previo a su reutilización, con la consecuente disminución de tiempos muertos y costos extras que conspirarían con su aplicabilidad industrial (Torres et al., 2009).

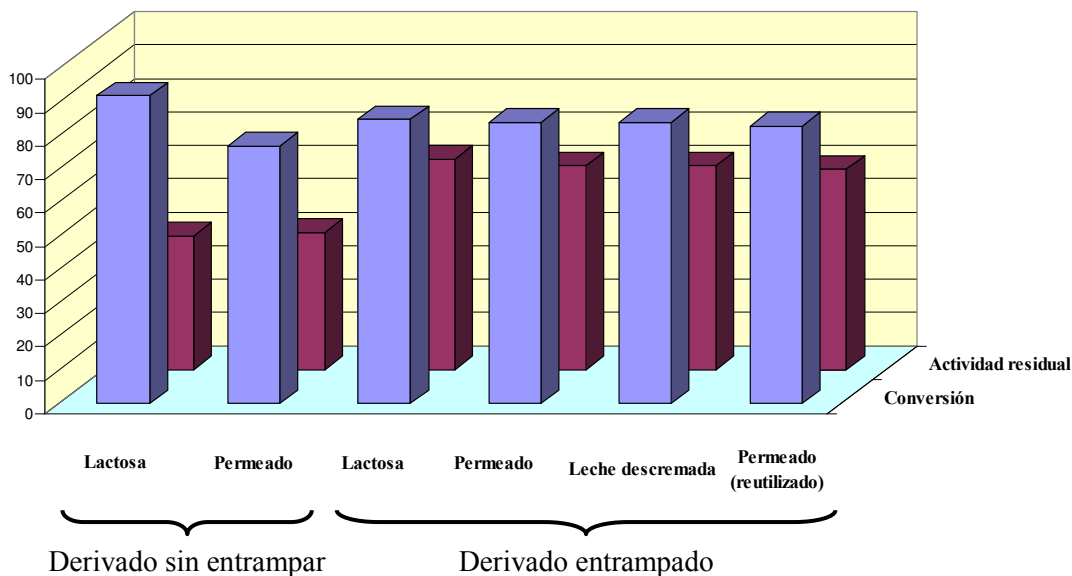
En función de estos resultados, se sometió el derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C entrampado en una matriz de alginato al 4% a un ciclo de reutilización hasta alcanzar el máximo grado de hidrólisis posible, usando permeado diluido (50 g/L de lactosa), ajustado a pH 6,0 y a una temperatura de operación de 50 °C. En dicho ensayo se alcanzó una conversión máxima del 83%, comparable al 84% obtenido durante la primera utilización, pero necesitando para ello un mayor tiempo de operación del reactor (50 horas). La desactivación ocurrida en esta nueva aplicación fue similar a la sufrida en la primera oportunidad.

Por tanto, dado el buen desempeño que mostraron los biocatalizadores producidos por el entrampamiento del derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C en una matriz de alginato de calcio, sumado a la posibilidad de producir con el equipamiento disponible en el laboratorio, un escalamiento casi continuo del mismo para tamaños entre 1,1 y 5,5 mm, se planificaron diferentes ensayos usando como sustrato solución de lactosa, permeado y leche descremada y variando los caudales de alimentación del reactor.

Se desarrollaron nuevos ensayos con el derivado entrampado en un reactor de lecho empacado a 50°C, empleando caudales de alimentación de 20 mL/h y 30mL/h y usando solución de lactosa, permeado y leche descremada como sustratos, ajustados a pH 6,0 y con el mismo tenor inicial de lactosa (50 g/L). Empleando el menor caudal de alimentación se obtuvieron conversiones máximas de 86% para lactosa y 84% para permeado y leche descremada luego de 24 h de operación, mientras que para un caudal de alimentación mayor se obtuvieron conversiones

máximas similares (alrededor del 84%) para todos los casos luego de 32 h de operación. Además de la diferencia en el grado máximo de hidrólisis obtenido con distintos sustratos alimentando el reactor con el caudal más bajo ensayado (20 mL/h), se observó en todos los casos una menor actividad residual del biocatalizador (alrededor del 50%) en comparación con la obtenida en todos los casos para el proceso a mayor caudal (alrededor del 60%).

La comparación del desempeño alcanzado con el derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C sin entrapar y entrapado en una matriz de alginato al 4% se puede observar en la Figura 5.22. Los resultados demuestran una mayor estabilidad operacional de los derivados entrapados, probablemente debido a que la temperatura real en el interior de la partícula sea menor que en el seno del líquido circundante en los reactores de lecho fijo (Torres et al., 2009). Los niveles de conversión obtenidos con lactosa (50 g/L) resultaron comparables a aquellos obtenidos con permeados en el caso de este sistema, incluso durante la reutilización del bio-reactor. Cabe señalar que la inactivación del biocatalizador fue mayor en el caso de la operación con leche descremada y permeados (Fig. 5.22).



**Figura 5.22.** Comparación de los niveles de conversión alcanzados y actividad residual de derivado  $\beta$ -galactosidasa–Eupergit C libre y entrapado utilizado sobre diferentes sustratos.

En el caso de los reactores de lecho expandido y particularmente fluidizado, se observa una reducción en la vida media del biocatalizador, así como una disminución de la velocidad de conversión, que resulta de las condiciones operativas (caudales necesarios para estos diseños, mayor exposición del derivado a condiciones inactivantes). Se ha reportado el uso de la lipasa de



*Candida rugosa* inmovilizada en Sepabeads EP en reactores de tipo batch y lecho fluidizado (Damnjanović et al., 2012). Durante la síntesis de geranilbutirato con esta lipasa, se reporta una mayor productividad en lecho fluidizado, acompañada sin embargo con un menor nivel de conversión (79%), en tanto que en batch el nivel de conversión alcanzado es aproximadamente del 100%.

En los sistemas en batch los niveles de conversión alcanzados con lactosa fueron superiores a aquellos obtenidos con permeado. En el caso del sistema en lecho empacado se obtuvieron conversiones comparables operando con lactosa y permeado.

En condiciones operativas, la vida media aparente de los biocatalizadores entrampados presenta dos zonas claramente diferenciadas. Por encima de 40°C la misma disminuye con el aumento de temperatura. En contraposición, por debajo de 40°C la vida media en condiciones operativas presenta la tendencia opuesta. Esto podría relacionarse con la transición en las propiedades viscoelásticas de la matriz de alginato que se produce en el entorno de los 45°C (Gombotz y Wee, 1998). Por otra parte, a 40°C la vida media del biocatalizador aumenta con el incremento de la carga entrampada y evidencia una disminución con ésta a 50°C.

En cuanto al comportamiento de la velocidad de lactólisis en función de la carga entrampada, se observó que existen dos zonas diferenciadas que corresponden a cargas 5-20 y 20-35 mg/mL de alginato. En la primera la velocidad cae cuando se aumenta la carga. Por su parte, entre 20-35 mg/mL de alginato se verifica el fenómeno inverso (Torres et al., 2009).

En relación a la vida media de los derivados entrampados el comportamiento es dual. En tanto que a temperaturas inferiores a 45°C la vida media aumenta con el incremento de la carga, a 50°C la tendencia es la inversa. Cuando se sometió a esferas de biocatalizador usadas a 40°C y 50°C a un tratamiento de entrecruzamiento con glutaraldehído (0.1%, 36 h), previo a su reutilización a las mismas temperaturas, la vida media aumentó con el incremento de la carga para todos los casos, demostrando una vez más la gran versatilidad del glutaraldehído utilizado como agente estabilizante, como ha sido reportado previamente en el marco de otros procesos de inmovilización (Betancor et al. 2006a; Betancor et al., 2006b; Sisak et al., 2006). A su vez se verificó que el tratamiento no afectó de forma significativa la actividad. Sin embargo, el tratamiento con glutaraldehído de los derivados utilizados a 40°C, modificó la resistencia mecánica y las condiciones de hidratación de la partícula, como pudo verificarse mediante la observación microscópica. Por su parte, este cambio no se observó a 50°C.

Como se ha señalado anteriormente, la vida media aumenta con el incremento de la carga entrampada a 40°C y disminuye con ésta a 50°C en el caso de los derivados entrampados sin entrecruzar. El tratamiento con glutaraldehído, posterior a la exposición a temperaturas de 40°C y

50°C, determina que esta diferencia en el comportamiento de la vida media desaparezca. Sin embargo, el efecto combinado de temperatura y glutaraldehído modifica en algunos casos la resistencia mecánica de la partícula. En tanto que a 40°C hay cambios en textura y resistencia mecánica, este efecto no se observa luego del reuso a 50°C.

La gran versatilidad del alginato de calcio y las variadas geometrías posibles para el biocatalizador entrampado permiten su uso en diversas configuraciones de reactor. A esto se suma que la estabilización térmica del biocatalizador derivada de la unión covalente y entrampamiento puede contribuir al diseño de nuevos procesos o aplicaciones. En este trabajo, el entrampamiento en alginato se ha utilizado para generar biocatalizadores con la estabilidad operativa necesaria para emplearse en reactores a mayor escala que los mini-reactores con que se desarrollaron los estudios a nivel de laboratorio durante las etapas de inmovilización de enzimas y estabilización en soportes acrílicos.

## 5.2. Producción y purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa

Durante la segunda fase de este trabajo, se han llevado a cabo tareas relativas a la producción y purificación de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *E. faecium* DBFIQ E36, permitiendo la obtención de una preparación de dicha enzima, la cual fue posteriormente caracterizada. Posteriormente, tras la producción, purificación y caracterización de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (LAI), los derivados obtenidos por inmovilización en Eupergit C y Eupergit C 250L, se evaluaron teniendo en cuenta sus condiciones óptimas, parámetros cinéticos y estabilidad frente a distintos agentes físicos y químicos. En este marco se desarrollaron estudios funcionales empleando los derivados obtenidos anteriormente en una variedad de condiciones operativas, y combinando su empleo con derivados de  $\beta$ -galactosidasa, ya sea inmovilizando ambas enzimas en diferentes partículas o coinmovilizándolas, para la transformación de lactosa. Se ha evaluado a su vez el efecto de la operación en dos reactores en secuencia, o en un único reactor, para cada una de las combinaciones posibles.

### 5.2.1. Producción de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y preparación del extracto crudo

Las etapas de producción y preparación del extracto enzimático se realizaron en colaboración con el Grupo de Tecnología de los Alimentos y Biotecnología del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, Santa Fe, Argentina) en el marco de una pasantía realizada por este doctorando. En un trabajo previo realizado por este grupo, se

seleccionaron 29 cepas bacterianas con capacidad de metabolizar el azúcar L-arabinosa. Para ello, se diseñaron diversos medios de cultivo convenientemente modificados para la fermentación de L-arabinosa (inductor) por las diferentes cepas, y teniendo en cuenta además que la D-glucosa, D-manosa y D-fructosa pueden actuar como represores en el caso de muchos microorganismos (Heath, 1958; Chakravorty, 1964). De todas ellas, *Enterococcus faecium* DBFIQ E36, una bacteria aislada de leche de vaca, fue la que mostró la mayor capacidad para fermentar dicho azúcar. El cultivo de la misma se realizó de acuerdo con De Mann et al. (1960).

### 5.2.2. Purificación

Para la selección de las estrategias de purificación se tuvieron en cuenta las características de otras L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas y aldo-ceto isomerasas en general, y los métodos referidos en la literatura para la purificación de estas enzimas, en virtud de no existir reportes sobre la purificación/caracterización de la enzima de *E. faecium* en particular. Las L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas reportadas suelen tener estructura homodimérica u homotetramérica (raramente hexamérica) con PM en el entorno de los 100 KDa (dos subunidades de 50-60 KDa) o 360 KDa (cuatro subunidades). El ion manganeso es un activante en la mayoría de los casos y a su vez favorece la estabilidad de la proteína, pero a concentraciones muy altas se transforma en inhibidor. Los iones cobre y hierro en general son inhibidores. En cuanto a los demás iones divalentes los efectos son variables. Los puntos isoeléctricos se ubican en general entre 5.0-5.8, en tanto que los pH óptimos se encuentran en el rango de 7.0-8.0. En relación a la temperatura óptima, las L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas de organismos similares presentan temperaturas óptimas en el rango de 35-55°C, si bien no todas tienen buena estabilidad a estas temperaturas (Rhim y Bejar, 2006).

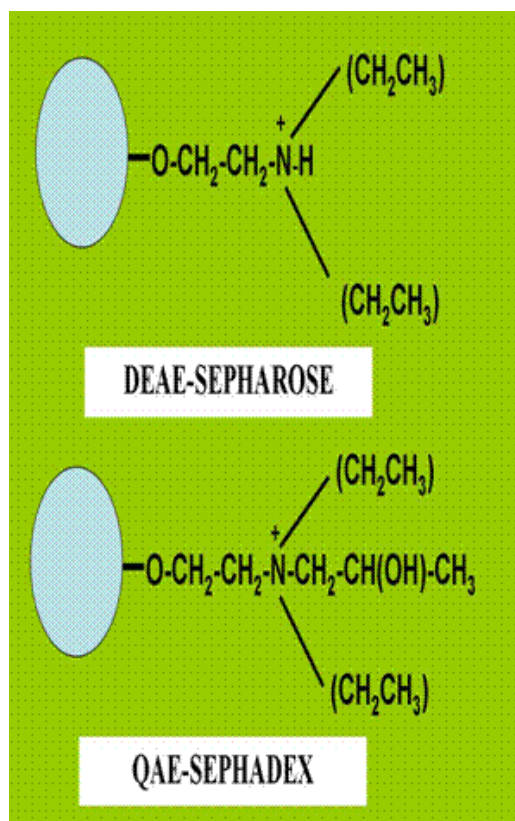
El extracto crudo obtenido a partir de la sonicación, lisis y posterior centrifugación se sometió a una primera etapa de precipitación salina con sulfato de amonio al 85% de saturación, que permitió la recuperación de casi el 93% de las proteínas del extracto, aunque solamente un 70% de la actividad total. El porcentaje de recuperación de actividad se reduce drásticamente al bajar el porcentaje de saturación en sulfato de amonio.

Este comportamiento podría justificarse en el hecho de que las L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas en general son enzimas que presentan gran cantidad de residuos cargados y polares, y una baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos (Manjasetty y Chance, 2006; Prabhu et al., 2010). Esto está en concordancia con el comportamiento de la enzima en estudio durante una

cromatografía de interacción hidrofóbica. Así, a partir del precipitado salino resuspendido en el amortiguador de actividad (fosfato 0.1 M pH 7.0), se realizaron dos cromatografías de interacción hidrofóbica en modo batch, la primera con la resina Phenyl-Sepharose y la segunda con Octyl-Sepharose. En ambos casos, si bien hubo adsorción parcial de las proteínas del extracto, no se observó adsorción cuantitativa de la enzima de interés.

### *Intercambio iónico*

Como resultado de los primeros estudios de purificación, se desarrolló una estrategia preliminar de purificación de la enzima (protocolo 1), consistente en una primera etapa de precipitación salina, seguida de desalado por gel filtración en Sephadex G-25 y dos pasos de intercambio iónico, el primero empleando un intercambiador aniónico débil (DEAE-Sepharose) y el segundo uno fuerte (QAE-Sephadex) [Fig. 5.23].



**Figura 5.23. Estructura de las resinas de intercambio utilizadas.**

Como segundo paso se realizó una cromatografía en DEAE-Sepharose en modo continuo. La fracción con mayor actividad enzimática se obtuvo luego de la elución con NaCl 0.4 M con factor de purificación de 5 frente al precipitado solubilizado (Fig. 5.24 y Tabla 5.15).

**Tabla 5.15. Purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa por intercambio iónico (Protocolo 1) y cromatografía de afinidad (Protocolo 2).**

Protocolo	Fracción	Volumen (mL)	Conc. de proteínas (mg/mL)	Prot. Tot. (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	P	R (%)
1	Extracto original	437	0.775	339	$3.8 \times 10^{-4}$	0.17	$5.0 \times 10^{-4}$	1	100
	S.A. 85%, gel filtrado	100	0.619	62	$1.1 \times 10^{-3}$	0.11	$1.8 \times 10^{-3}$	3.6	65
	DEAE-Sepharose	6	1.4	8.4	$1.2 \times 10^{-2}$	$7.2 \times 10^{-2}$	$8.6 \times 10^{-3}$	18	42
	QAE-Sephadex	6	0.480	2.9	$8.5 \times 10^{-3}$	$5.1 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-2}$	34	30
2	Extracto original	73	0.775	57	$3.8 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-2}$	$4.9 \times 10^{-4}$	1	100
	S.A. 85%, gel filtrado	16	0.619	10	$1.1 \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-3}$	3.6	65
	L-arabitol-agarosa	2	0.0125	0.025	$5.0 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-2}$	0.4	755	36

S.A. Precipitación salina con sulfato de amonio.

Además, se evidenció que a altas concentraciones de NaCl (0,9 M NaCl) ciertas fracciones poseían actividad L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, lo que sugeriría la presencia de agregados poliméricos formados por varias unidades de esta enzima, tal como ha sido reportado por Zhang et al. (2007).

Se aplicaron 5 mL de la fracción con mayor actividad proveniente del intercambio en DEAE-Sepharose previamente desalinizada, a una resina QAE-Sephadex. Debido a que esta resina es muy susceptible a cambios de volumen cuando se varía la fuerza iónica del medio, este nuevo paso cromatográfico se efectuó en modo batch. Al finalizar ambos pasos de purificación, se obtuvieron fracciones entre 30 y 40 veces más puras que el precipitado solubilizado gel-filtrado (Tabla 5.15). Por lo tanto, la combinación de los dos tratamientos cromatográficos de intercambio iónico propuestos, resultaron ser efectivos para la obtención de fracciones parcialmente purificadas de la enzima.

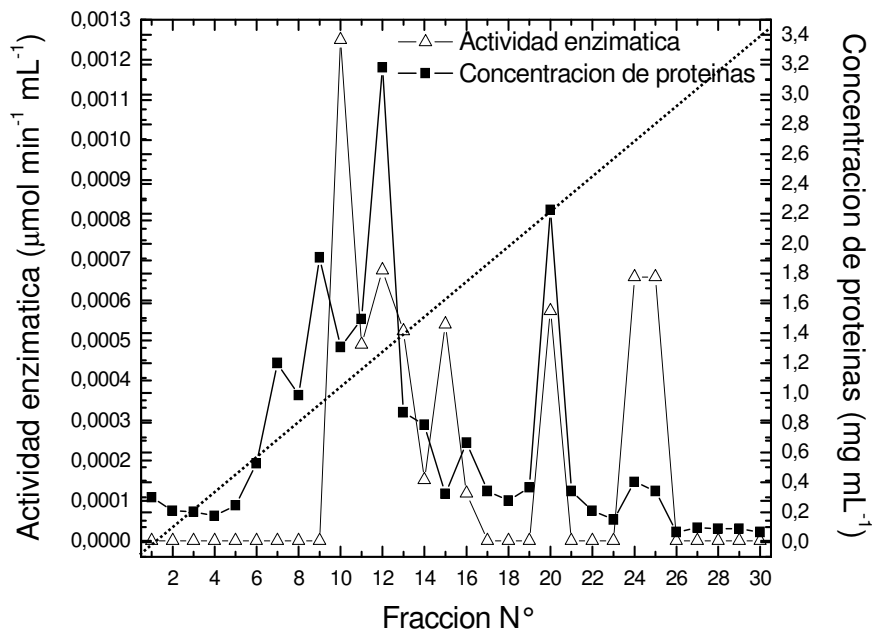


Figura 5.24. Diagrama de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharose en modo continuo. La línea punteada indica el gradiente lineal de NaCl entre 0,1-1,0 M en amortiguador de actividad utilizado para la elución.

Por otro lado, al estudiar la pureza de las diferentes fracciones obtenidas por SDS-PAGE (Fig. 5.25), se observa que a medida que se obtuvieron fracciones más purificadas algunas bandas desaparecen mientras que otras se hacen más intensas. Observando la fracción eluída con 0,4 M NaCl durante la cromatografía en QAE-Sephadex (Carril 6 en Fig 5.25), pudo notarse la presencia de cinco bandas principales, de las cuales, teniendo en cuenta lo reportado por Jørgensen et al. (2004) y Lee et al. (2005a), la banda que se encuentra alrededor de los 50 KDa, correspondería a la proteína de interés. Asimismo, dado que ésta es la única banda que ha aumentado en intensidad, se corroboraría la relación de actividades específicas mostrada en la Tabla 5.15.

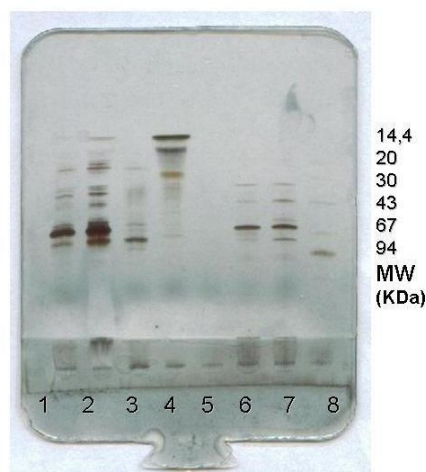


Figura 5.25. PAGE-SDS de diferentes fracciones parcialmente purificadas en base al Protocolo 1 (mediante intercambio iónico en DEAE-Sepharose en modo continuo y posterior intercambio en QAE-Sephadex en batch). Carriles: 1- Extracto original; 2- Precipitado salino al 85%, desalado; 3- Fracción 15 de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose; 4- Fracción 20 de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose; 5- Fracción resultante de la elución con 0.1 M NaCl de la cromatografía en QAE-Sephadex; 6- Fracción resultante de la elución con 0.4 M de NaCl de la cromatografía en QAE-Sephadex; 7- Fracción 10 de la cromatografía en DEAE-Sepharose; 8- Marcadores de peso molecular.

## *Cromatografía de afinidad*

Como segunda estrategia de purificación se han empleado azúcares análogos al sustrato o producto e inhibidores competitivos ya estudiados para estas enzimas, como ligandos de afinidad, con el objetivo de lograr fracciones de mayor pureza en esquemas de purificación menos complejos.

Los geles de agarosa epoxi-activados son muy adecuados como matrices para cromatografía de afinidad debido a la gran estabilidad de los enlaces que se generan entre matriz y ligando. Diversos ligandos pueden ser unidos covalentemente a esta matriz epoxi-activada, entre los cuales se encuentran múltiples azúcares y polioles (Clouet et al., 1986). En este trabajo, los compuestos D-arabinosa (análogo estructural del sustrato), L-ribitol (análogo del producto) o L-arabitol (inhibidor competitivo de la enzima) se inmovilizaron covalentemente en agarosa epoxi-activada. La síntesis del bioadsorbente L-arabitol-agarosa se muestra esquemáticamente en la Fig. 5.26.

Los bioadsorbentes sintetizados en base a D-arabinosa y L-ribitol no arrojaron resultados satisfactorios cuando se aplicaron a la purificación de la enzima. En el caso del bioadsorbente D-arabinosa-agarosa, si bien logró adsorber específicamente ciertas proteínas, no retuvo aquellas proteínas con actividad L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa. Por otra parte, al emplear un gel L-ribitol-agarosa ninguna proteína del extracto resultó adsorbida. Por el contrario, el bioadsorbente L-arabitol-agarosa se utilizó con éxito para la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.

La L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa se purificó a homogeneidad en una estrategia de dos pasos (protocolo 2) empleando una primera etapa de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 85% de saturación seguida por cromatografía de afinidad en L-arabitol-agarosa (Fig. 5.27). Los resultados se muestran en la Tabla 5.15.

Para el caso del L-arabitol la agarosa epoxi-activada utilizada poseía un grado de activación de 43  $\mu\text{mol}$  de grupos epóxido por gramo de gel escurrido, valor obtenido por titulación de acuerdo a la metodología que se describió en Métodos. El nivel de activación se seleccionó para permitir la inmovilización de una cantidad adecuada de ligando con vistas al proceso cromatográfico a llevar a cabo.

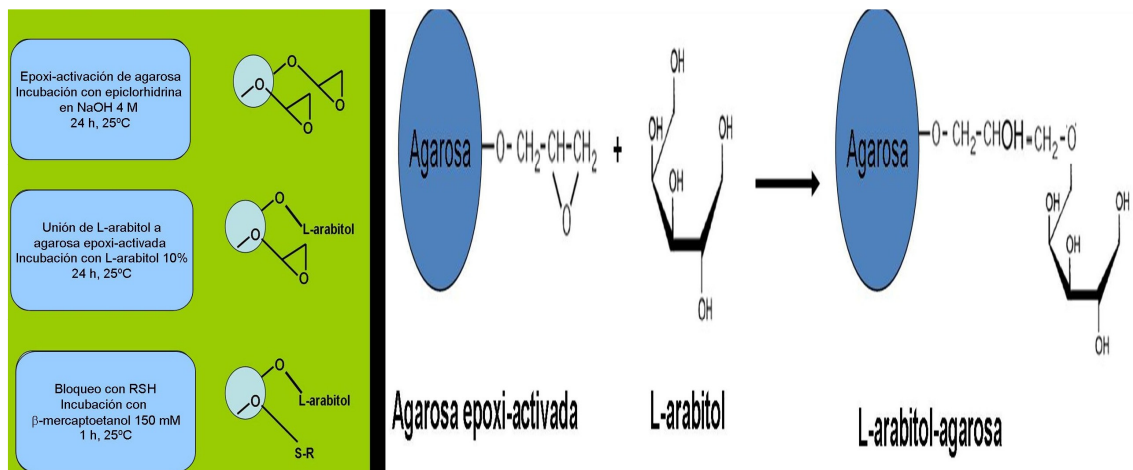


Figura 5.26. Síntesis del bioadsorbente L-arabitol-agarosa. Procedimiento general (izquierda) y representación esquemática de las reacciones (derecha).

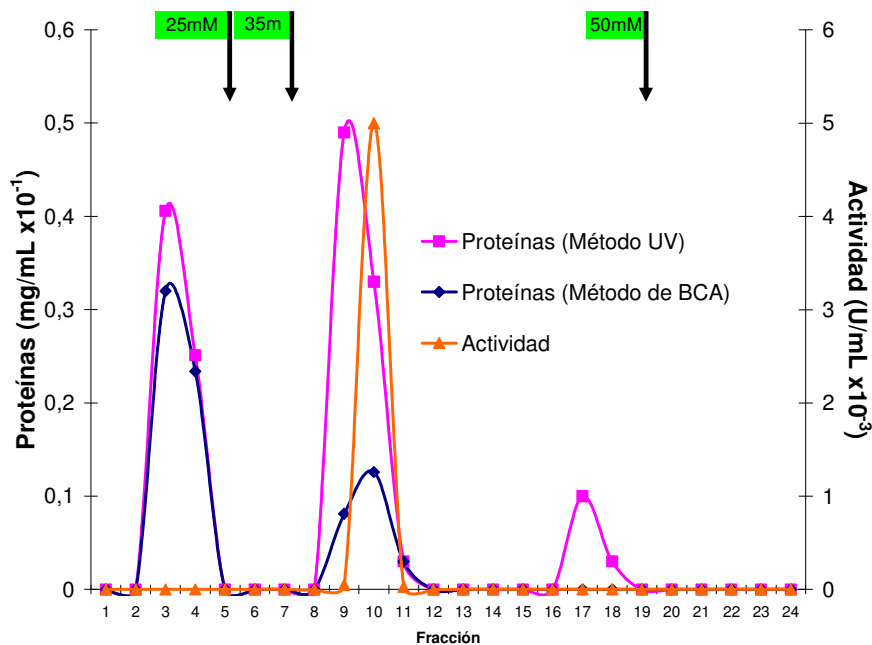


Figura 5.27. Diagrama de elución correspondiente a la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa por cromatografía de afinidad (Protocolo 2). Las flechas indican el agregado de distintas concentraciones de L-arabitol como eluyente.

Luego del paso de cromatografía de afinidad en L-arabitol-agarosa, se recupera el 99% de la actividad de la fracción aplicada, con factores de purificación entre 710 y 755 veces en relación con el extracto libre de células inicial. Se verificó por electroforesis nativa la presencia de una sola banda en la fracción del eluido con actividad L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa. La electroforesis PAGE-SDS realizada a la fracción purificada reveló una única banda correspondiendo a un PM de 55 kDa (Fig. 5.28). A la misma fracción se le efectuó un isoelectroenfoco, resultando un punto isoeléctrico de 3.8 (Fig. 5.28). Este pI es uno de los más



bajos reportados para este tipo de enzimas, incluso considerando las L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas producidas por el género *Lactobacillus*, las cuales en general presentan pI ácidos (Muddada, 2012). Consistente con la aparente presencia de una gran cantidad de residuos ácidos, la enzima requiere altas concentraciones de sulfato de amonio para su efectiva precipitación. La electroforesis 2D verificó que la fracción purificada de acuerdo al protocolo 2 arrojó una sola banda en 55 KDa con un punto isoeléctrico de 3.80, ausente en el percolado.

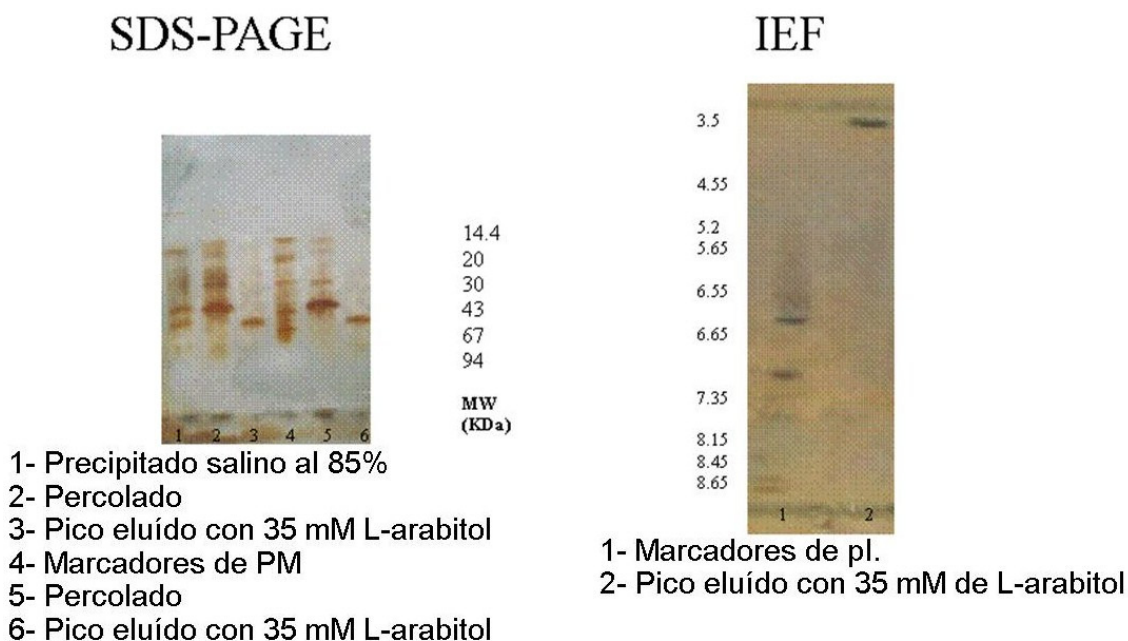


Figura 5.28. Monitoreo de la purificación de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (Protocolo 2) por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) e isoelectroenfoque de la enzima purificada.

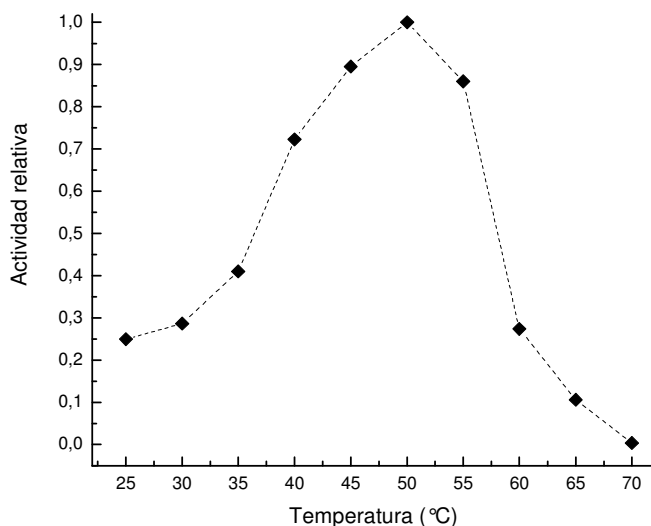
### 5.2.3. Espectrometría de masas

La correspondiente espectrometría de masas MALDI-TOF reveló en el eluído de la cromatografía de afinidad un perfil que podría corresponder a una proteína tetramérica, con monómeros de 56 KDa. El mapeo peptídico con tripsina no permitió la identificación de la proteína. No obstante por análisis de homología en base a los resultados, puede considerarse emparentada con la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa proveniente de *E. faecium* DO (Larimer y Land, 2005).

### 5.2.4. Caracterización de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa nativa

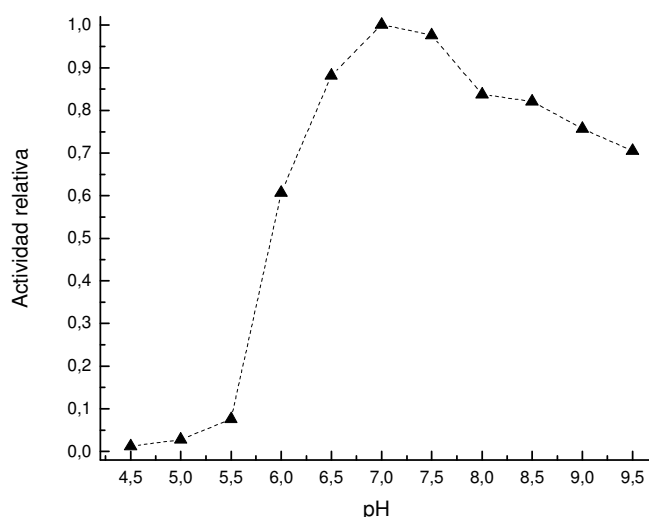
En cuanto a la caracterización bioquímica de la enzima purificada, su temperatura óptima se sitúa en los 50 °C (Figura 5.29). Sin embargo, se obtuvo más del 90 % de la máxima actividad en el

rango 45-55°C. Fuera de ese rango, las actividades decrecen rápidamente. Esta curva con forma de campana es típica de una enzima proveniente de un organismo mesófilo termotolerante (Chouayekh et al., 2007). A su vez, la enzima mantiene una actividad residual superior al 60% luego de 8 horas de incubación a temperaturas en el rango 20-40°C.



**Figura 5.29. Efecto de la temperatura sobre la actividad de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.**

La Figura 5.30 muestra que la actividad enzimática es máxima en el rango de pH 7,0-7,5 y decae suavemente hacia pH más alcalinos, de forma que a 9,5 la enzima mantiene aproximadamente el 70% de su actividad máxima. Sin embargo, a rangos de pH más ácidos, la actividad decae abruptamente. Rhimi et al. (2010b) han reportado un comportamiento inverso, donde la enzima recombinante de *Lactobacillus sakei* 23K, es muy activa (igual o mayor al 80% de la actividad máxima) en el rango de pH 3,0-8,0, presentando un máximo de actividad en el rango 5,0-7,0, lo que demuestra la amplia variedad de organismos productores de la enzima que pueden ser de interés tecnológico. Además, la enzima purificada en este trabajo conserva más del 60% de su actividad luego de 6 horas de incubación en un rango de pH 6.5-8.5, siendo más estable en el intervalo 7.0-8.0.



**Figura 5.30. Efecto del pH sobre la actividad de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.**

De acuerdo a la literatura, diferentes iones metálicos, preferentemente divalentes, ejercen efectos activantes o desactivantes sobre la actividad enzimática y dichos efectos varían dependiendo del origen de la enzima. En virtud de esto, se decidió estudiar la influencia de diferentes cationes a una misma concentración (1 mM) sobre preparaciones purificadas de la enzima. La Tabla 5.16 muestra las actividades relativas en relación al control (consistente en una preparación dializada en presencia de EDTA, por lo que se considera libre de cationes).

De todos los iones divalentes, el  $Mn^{2+}$  resultó ser el más eficiente activador de la enzima seguido del  $Co^{2+}$ . De hecho, ambos cationes suelen ser activadores de las L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas, aunque el  $Mn^{2+}$  suele ser cofactor de las enzimas provenientes preferentemente de organismos mesófilos (Patrick y Lee, 1968), mientras que el  $Co^{2+}$  activa enzimas provenientes de organismos termófilos e hipertermófilos (Kim et al., 2002; Kim y Oh, 2005; Lee et al., 2004). Además, pudo comprobarse un efecto sinérgico entre el  $Mn^{2+}$  y el  $Co^{2+}$  siendo máximo cuando la relación  $Mn^{2+}/Co^{2+}$  es 3/1. Al mismo tiempo, el catión  $Mg^{2+}$ , el cual ha sido reportado como activador (Rhim et al., 2010a), no ejerció el mismo efecto en nuestra preparación enzimática. El  $Ba^{2+}$  inhibió completamente la actividad enzimática, resultados que coinciden con lo reportado por Cheng et al. (2010a). Luego de analizar la bibliografía sobre la temática (Lee et al., 2005a y 2005b) se aprecia que el resto de los cationes se comporta en forma dispar en los distintos casos, no pudiéndose extraer datos concluyentes por comparación.

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.

Suplementado con:	Actividad relativa (%)
Control <sup>a</sup>	100
CoCl <sub>2</sub>	1323
MgCl <sub>2</sub>	31
CaCl <sub>2</sub>	96
SrCl <sub>2</sub>	150
SnCl <sub>2</sub>	154
ZnCl <sub>2</sub>	342
BaCl <sub>2</sub>	0
CuCl <sub>2</sub>	154
NH <sub>4</sub> Cl	96
MnCl <sub>2</sub>	1746
CoCl <sub>2</sub> 0,25 mM + MnCl <sub>2</sub> 0,75 mM	2746
CoCl <sub>2</sub> 0,75 mM + MnCl <sub>2</sub> 0,25 mM	2565
CoCl <sub>2</sub> 0,5 mM + MnCl <sub>2</sub> 0,5 mM	2731

a- La preparación purificada de la enzima fue dializada en presencia de EDTA 10 mM.

Se determinó la concentración de Mn<sup>2+</sup> para la cual la actividad enzimática es máxima (Figura 5.31). La concentración óptima de este catión resultó de 0.3 mM.

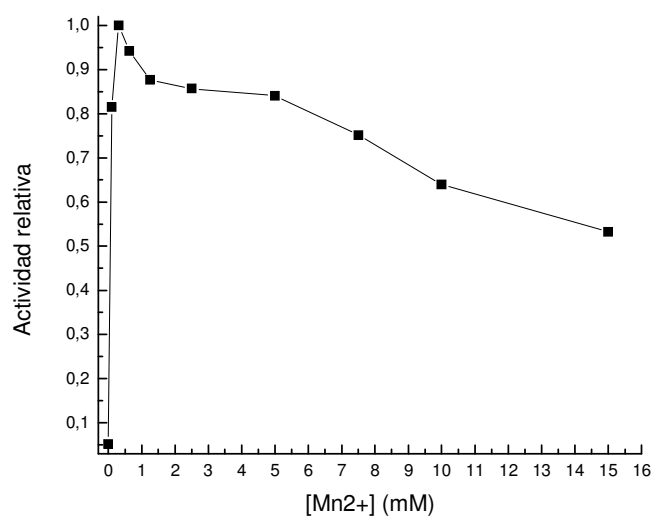


Figura 5.31. Efecto de diferentes concentraciones de Mn<sup>2+</sup> sobre la actividad de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.

Se estudió el efecto de los iones  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  sobre la estabilidad de la enzima, donde sólo el primero tuvo un efecto significativo.

Por último, asumiendo una cinética de Michaelis-Menten, se procedió a la determinación de los parámetros cinéticos. De esta manera, se determinaron velocidades de reacción a diferentes concentraciones iniciales de D-galactosa para las condiciones óptimas del ensayo enzimático. Para realizar dicho cálculo, se empleó la técnica de linealización de Eadie-Hofstee.

De esta manera, luego de la regresión lineal, donde el coeficiente de correlación de Pearson arrojó un valor de 0,9998, los parámetros cinéticos obtenidos a 50°C fueron:  $V_{m\acute{a}x} = 7,92 \times 10^{-4} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y  $K_m = 34,37 \text{ mM}$ . La constante de Michaelis,  $K_m$ , arrojó valores sólo comparables con la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *A. cellulolyticus* ATCC 43068 (Cheng et al., 2010b) que presenta una  $K_m$  de 28,9 mM. En general, el valor de  $K_m$  para la mayoría de las L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas caracterizadas hasta la fecha, se ubica entre 55 y 400 mM para D-galactosa. Estos resultados incrementan aún más la potencialidad tecnológica de la enzima con vistas a ser empleada en la bioconversión de D-galactosa a D-tagatosa. Por último, otros estudios cinéticos indican que esta L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa no resulta inhibida por su producto, la D-tagatosa, lo cual resulta consistente con la baja efectividad del bioadsorbente L-ribulosa-agarosa en la purificación de la enzima.

En cuanto a la estabilidad de la enzima frente al proceso de liofilización, la fracción liofilizada retuvo el 91% de la actividad original.

### 5.3. Inmovilización/estabilización de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa

La L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa purificada por cromatografía de afinidad fue inmovilizada en soportes acrílicos epoxi-activados haciendo uso de la estrategia descrita con anterioridad. Se seleccionaron los soportes Eupergit C y Eupergit C 250 L en base a los estudios previos llevados a cabo con  $\beta$ -galactosidasa. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, las características intrínsecas de cada enzima y las características del soporte pueden modificar de manera importante los parámetros de inmovilización y propiedades de los derivados obtenidos. La carga aplicada fue de 4.1 mg de proteína/g de gel y la inmovilización se realizó durante 24 horas a 25°C en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5, obteniéndose rendimientos de inmovilización máximos (100%) y eficiencias de inmovilización en el entorno de 90%.

Se estudió el efecto de dos técnicas de estabilización post-inmovilización, similares a las aplicadas en los estudios sobre  $\beta$ -galactosidasa, mediante: i) el bloqueo de grupos epóxido

remanentes con glicina 3 M; ii) tratamiento alcalino a pH 8.5, buscando favorecer la unión multipuntual, y posterior bloqueo con glicina. Se determinó la eficiencia de inmovilización y estabilidad térmica de los derivados sometidos a ambos tratamientos (Tabla 5.17).

**Tabla 5.17. Inmovilización y estabilización de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L.**

SopORTE	Incubación a pH 8.5 (h)	Proteína aplicada (mg/g de gel)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)	Vida media (h)
Eupergit C 250 L	0	4.1	100 ± 1	89 ± 3	65
	7	-----	-----	81 ± 3	214
	28	-----	-----	73 ± 6	308
Eupergit C	0	4.1	100 ± 1	71 ± 6	95
	7	-----	-----	59 ± 3	330
	28	-----	-----	51 ± 3	379

La inmovilización de LAI se realizó incubando 1.8 U de la enzima (0.40 U/mg) con 1 g del soporte correspondiente en amortiguador fosfato de potasio pH 7.5 durante 24 h. La cinética de inactivación de los derivados en batch a 50°C se siguió por 1-54 h. La vida media de la enzima nativa (en concentración equivalente a los derivados obtenidos) fue de 6 h bajo estas condiciones. Los resultados son la media de triplicados ± SD.

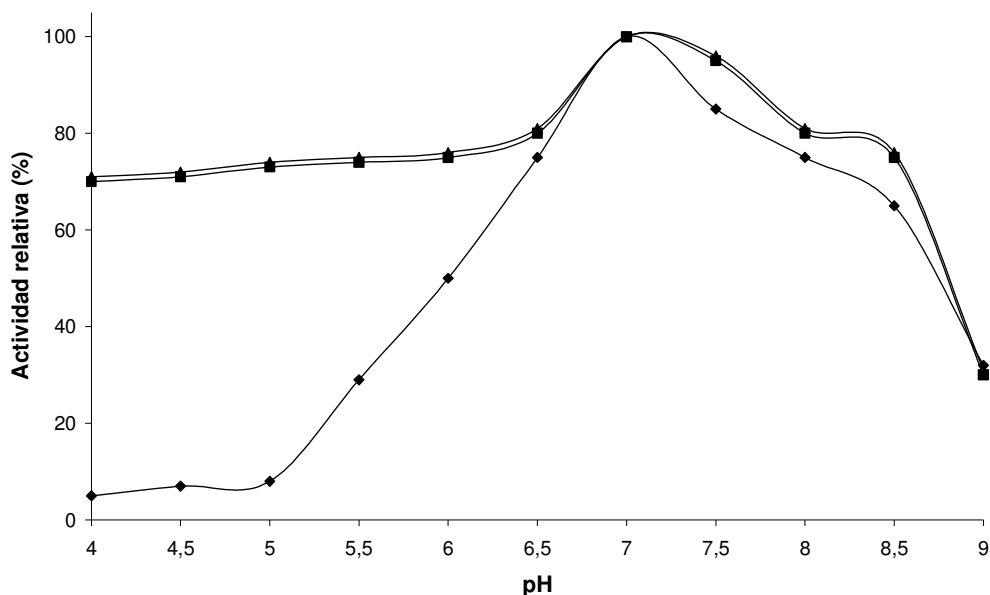
Los derivados bloqueados retuvieron más del 70% (Eupergit C) y casi 90% (Eupergit C 250 L) de su actividad inmovilizada en todos los casos, y sus estabilidades resultaron mayores que las correspondientes a la enzima nativa y sus derivados no bloqueados (Torres y Batista-Viera, 2010). Los derivados con mayor termoestabilidad fueron aquellos sometidos a tratamiento alcalino durante períodos más largos (28 h), y se constató una reducción concomitante de las eficiencias de inmovilización. Se comprobó asimismo una mayor estabilización como resultado del tratamiento alcalino que en el caso de similares derivados de β-galactosidasa. Esta estabilización permitiría a los derivados trabajar incluso a temperaturas mayores, favoreciendo el aumento del cociente tagatosa/galactosa.

### 5.3.1. Caracterización de los derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa

#### *pH óptimo y estabilidad frente al pH*

Los efectos del pH sobre la actividad y estabilidad de los derivados fueron analizados en forma comparativa con la enzima soluble. Los derivados usados con este propósito se prepararon bajo las condiciones descritas con anterioridad. En el caso de la enzima en solución se evidenció

una curva típica en la relación actividad vs. pH, con un óptimo en pH 7.0, como se ha visto (Fig. 5.30). Los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L presentan un pH óptimo en el rango 7.0-7.5, mostrando mayores actividades que la enzima soluble a pH por debajo de 6.5, lo cual puede deberse a efectos del microentorno (Fig. 5.32). Martín et al. (2003) han reportado aumentos de actividad relativa a pH alcalinos para la ciclodextrin glucosiltransferasa de *Thermoanaerobacter* inmovilizada en Eupergit C.



**Figura 5.32.** Efecto del pH sobre la actividad de LAI y sus derivados. ◆ enzima nativa; ▲ derivado LAI-Eupergit C; ■ Derivado LAI-Eupergit C 250 L.

Los perfiles de estabilidad para la enzima soluble y los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L presentan un máximo de estabilidad en el rango de pH 7.0-7.5. La comparación de los perfiles evidencia que ambos derivados presentan una mayor estabilidad que la enzima libre en el rango de pH 6.5-8.5. Asimismo, la estrategia de estabilización basada en tratamiento alcalino mostró ser estabilizante también en este rango. Los derivados en Eupergit C 250 L exhiben estabilidades ligeramente superiores que los derivados en Eupergit C (Fig. 5.33).

No existieron diferencias apreciables en relación al sustrato sobre el que se trabajó, encontrándose similares perfiles tanto para D-galactosa como para L-arabinosa.

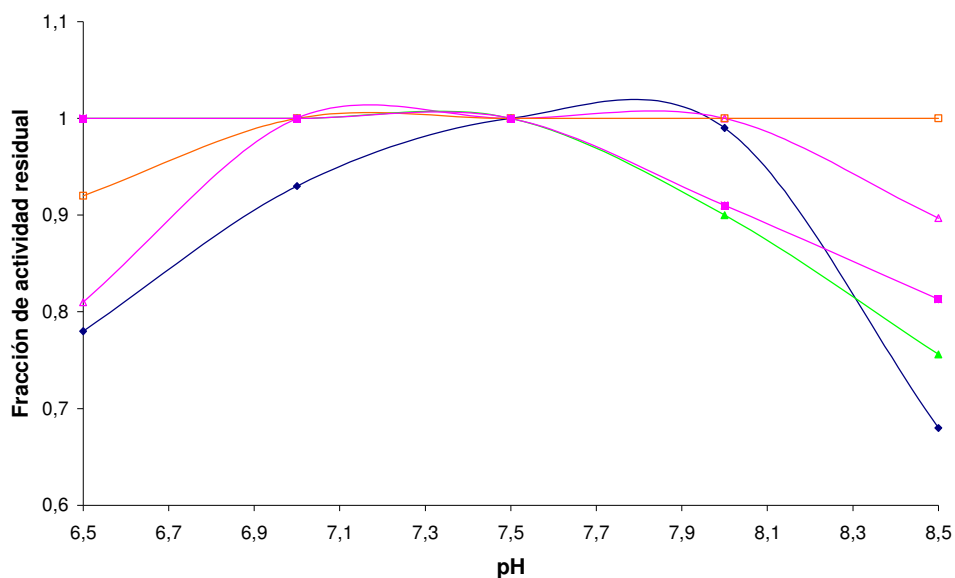


Figura 5.33. Efecto del pH sobre la estabilidad de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y sus derivados (24 horas de exposición). ◆ Enzima soluble ■ Derivado LAI-Eupergit C 250 L sin tratamiento alcalino □ Derivado LAI-Eupergit C 250 L con 24 horas de tratamiento alcalino ▲ Derivado LAI-Eupergit C sin tratamiento alcalino △ Derivado LAI-Eupergit C con 24 horas de tratamiento alcalino.

### Temperatura óptima

Como se ha visto, la temperatura óptima de la enzima se sitúa en los 50 °C (Figura 5.29). Los derivados presentan en general actividades mayores que las de la enzima soluble a temperaturas por encima de 55°C. Para los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L, se obtuvo más del 90 % de la máxima actividad en el rango entre 55°C y 60°C (Fig. 5.34).

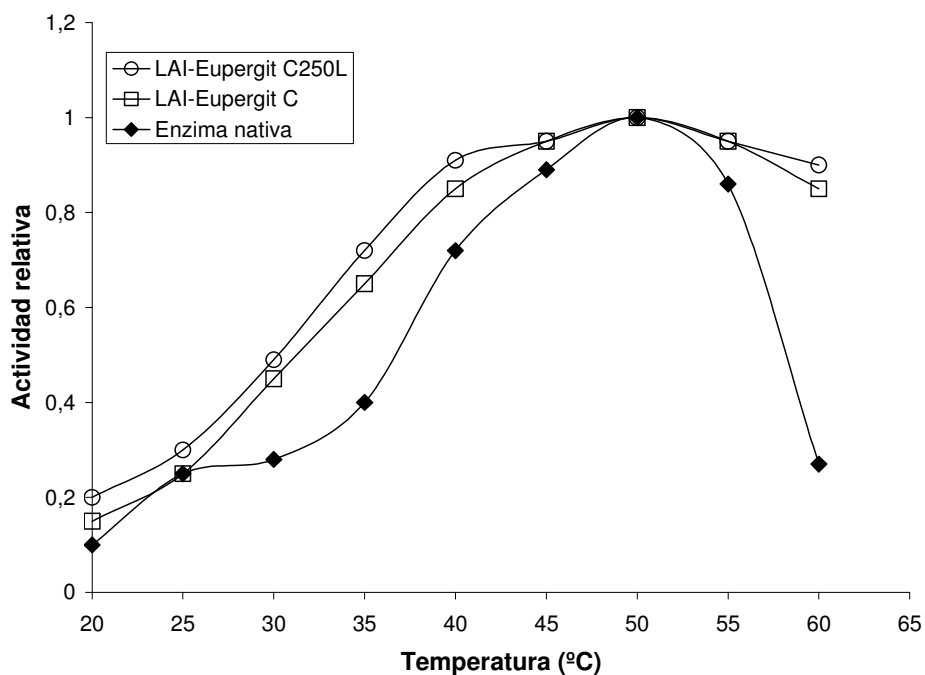


Figura 5.34. Efecto de la temperatura sobre la actividad de derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, en comparación con la enzima nativa (soluble).



### Estabilidad térmica

Los derivados en Eupergit C resultaron los más estables en el intervalo. Las termoestabilidades de los derivados bloqueados con glicina son claramente superiores a las correspondientes a la enzima nativa y los derivados no bloqueados (Tabla 5.17). Las diferencias se hacen más notorias al aumentar de 7 a 24 horas el período de incubación a 50°C.

Una combinación de tratamiento alcalino a pH 8.5 durante 7-28 horas y bloqueo mejora aún más la estabilidad térmica de los derivados. La Figura 5.35 muestra las actividades residuales de los derivados LAI-Eupergit C 250L y LAI-Eupergit C estabilizados en estas condiciones, luego de 30 horas de exposición a 60°C. Se ha reportado la inmovilización de la L-arabinosa isomerasa de *B. licheniformis* en Eupergit C y su aplicación para la conversión de L-arabinosa en L-ribulosa (Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2010a). La vida media de este biocatalizador fue de 212 h a 55°C. No obstante, la enzima de *Bacillus licheniformis* presenta alta especificidad de sustrato para la L-arabinosa, no siendo de elección para realizar la bioconversión de D-galactosa. Recientemente se ha reportado que la inmovilización de la mencionada enzima en vidrio activado con grupos aminopropilo mejora tanto su actividad como su estabilidad (Zhang et al., 2011).

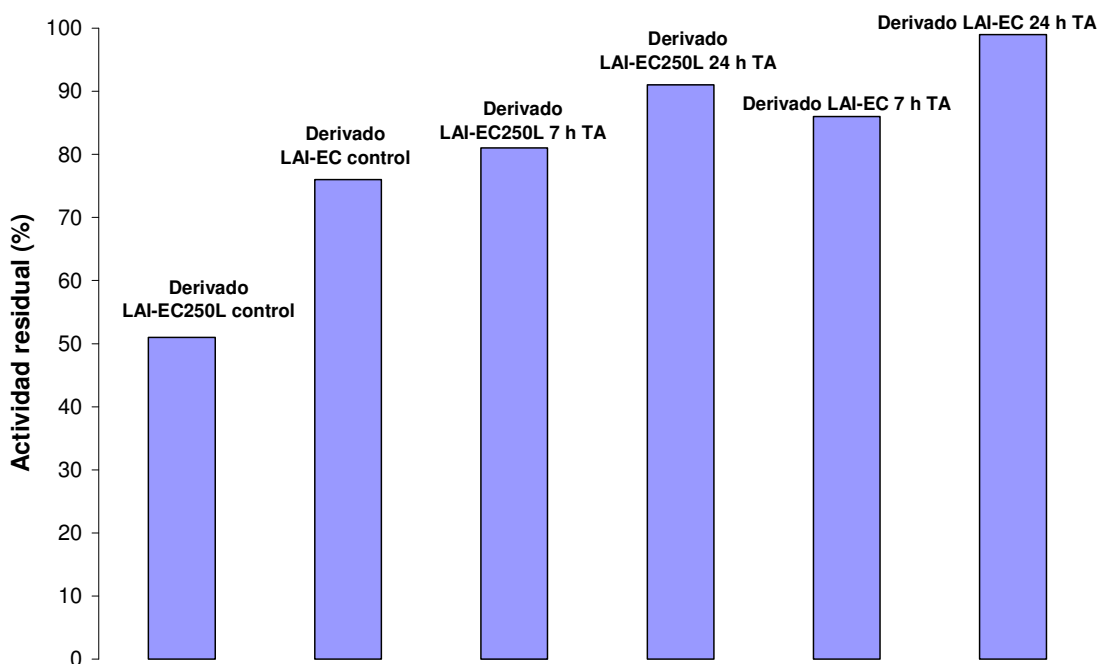


Figura 5.35. Estabilidad térmica (30 h de exposición a 60°C) de los derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (LAI) en Eupergit C (EC) y Eupergit C 250 L (EC250L) sometidos a tratamiento alcalino (TA) y bloqueados con glicina. Los derivados control fueron sometidos a un único tratamiento estabilizante mediante bloqueo con glicina.

Como puede observarse los derivados sometidos a tratamiento alcalino durante más tiempo son aquellos que conservan la mayor actividad, siendo siempre mayor la estabilidad de los derivados obtenidos en Eupergit C. Sin embargo estos derivados son los de menores eficiencias de inmovilización. Los datos de eficiencia de inmovilización y estabilidades térmicas apoyan la hipótesis de la formación de uniones adicionales estabilizantes entre enzima y soporte durante el tratamiento a pH 8.5, las cuales ejercen efectos negativos sobre la actividad expresada en los derivados. Los niveles de estabilización térmica de esta enzima son superiores a los obtenidos con la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans*, lo cual puede tener relación con la naturaleza multimérica de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa. Por ejemplo, la glutamato deshidrogenasa trimérica de *Thermus thermophilus* inmovilizada en glioxil-agarosa y con un tratamiento post-inmovilización a pH 10 presenta estabilidades 1.5-3 veces superiores a la enzima inmovilizada sin tratamiento alcalino (Bolívar et al., 2009a). Este método de estabilización es al menos tan efectivo para enzimas multiméricas como la adsorción física y posterior entrecruzamiento con dextrano funcionalizado con grupos aldehído, método mediante el cual se inmovilizó la timidina fosforilasa de *E. coli* (Serra et al., 2011). En el caso de la referida glutamato deshidrogenasa se ha demostrado el efecto estabilizante adicional, producto de la unión covalente multipuntual de cada subunidad, tanto en soportes epoxi-activados como en soportes epoxi-amino de bajo grado de activación (Bolívar et al., 2009b). Por su parte, las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* y *Thermomyces lanuginosus* inmovilizadas en Toyopearl AF-amino-650M mostraron factores de estabilización en relación a las enzimas solubles de alrededor de 5 y 30 veces, respectivamente (Mendes et al., 2011).

Para algunas enzimas multiméricas, como la catalasa de *Thermus thermophilus*, la estabilización alcanzada por inmovilización depende fuertemente de la concentración de enzima, siendo mayor para altas concentraciones, como consecuencia de una menor posibilidad de disociación de las subunidades en estas condiciones (Hidalgo et al., 2003). El fenómeno de disociación de subunidades se ha descrito a su vez para las formas solubles de muchas L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas, que como se ha visto, pueden formar agregados multiméricos de distinto número de subunidades (Zhang et al., 2007). La ausencia de proteínas en el sobrenadante luego de la inmovilización y durante el uso de los derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa de *E. faecium*, indicaría que las subunidades permanecen unidas al soporte. Sin embargo, esta metodología no revelaría la existencia de disociación cuando la misma se produce en el soporte, ya sea en el momento de la unión (unión covalente de subunidades separadas) o posteriormente, lo cual también podría afectar la estabilidad térmica. No obstante, en nuestro caso, dada la relativamente baja concentración de proteínas presente en las fracciones purificadas, la carga aplicada fue la máxima carga posible con la que pudo trabajarse. Si bien esta enzima no es particularmente sensible

a la liofilización (lo cual es positivo desde el punto de vista de su almacenamiento), y este método permite concentrar el extracto aplicado, el beneficio de este procedimiento en cuanto a aumentar la carga enzimática del mismo podría no traducirse en mayores niveles de estabilización. Por otra parte, como también se ha estudiado en este trabajo para el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, el nivel de estabilización térmica obtenido a baja carga es elevado.

### *Parámetros cinéticos*

La  $K_m$  de la enzima libre y la  $K_m$  aparente de los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L se determinaron a 30°C, 40°C y 50°C, utilizando D-galactosa como sustrato, asumiendo una cinética de Michaelis-Menten y empleando para el cálculo la linealización de Eadie-Hofstee (Tabla 5.18). Los valores de  $K_m$  son más altos para los derivados que para la enzima soluble. Como se esperaba  $K_m$  disminuyó con el incremento de temperatura. Los derivados en Eupergit C mostraron valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  regularmente más altos o bajos, respectivamente, que los hallados en el caso de los derivados en Eupergit C 250 L, lo cual podría explicarse en base al mayor tamaño de poro de este último soporte, facilitando el acceso del sustrato al sitio activo de las moléculas de enzima, en particular a aquellas inmovilizadas en toda la superficie interna del soporte. Resultados similares han sido reportados para la  $\beta$ -glucosidasa *TnBgl IA* de *Thermotoga neapolitana* inmovilizada en Eupergit C y Eupergit C 250 L (Khan et al., 2012). Este efecto ha sido observado también en el caso de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en esferas macroporosas de la resina hidrofílica poli (glicidilmetacrilato-co-etilenglicol dimetacrilato) [poli (GMA-co-EGDMA)] con distintos tamaños de poro (Miletic et al., 2009) y la polifenol oxidasa de *Agaricus bisporus* inmovilizada en esferas macroporosas del copolímero de poli (alilglicidil éter-co-etilenglicol dimetacrilato) [AGE-co-EGDMA] (Vaidya et al., 2007). En polímeros de butilmetacrilato y glicidilmetacrilato funcionalizados se han observado efectos similares (Chen et al., 2009). Sin embargo, al menos en el caso de la mayor parte de las lipasas inmovilizadas en Eupergit C y Eupergit C 250 L y sus variantes amino-Eupergit C y amino-Eupergit C 250 L, no obstante contener niveles similares de enzima inmovilizada, la actividad expresada en derivados en Eupergit C 250 L es menor, lo cual puede estar relacionado con que la mayoría de la superficie del soporte Eupergit C 250 L es interna y genera limitaciones difusionales que llevan a que las moléculas de enzima inmovilizadas en el interior de la partícula sean menos eficientes en su actividad hidrolítica (Knezevic et al., 2006).

El reducido valor de  $K_m$  a 50°C (en el entorno de 35 mM para la enzima nativa y 40 mM para sus derivados en Eupergit C 250L) contrasta con los valores de  $K_m$  reportados en literatura para

la mayoría de las L-arabinosa (D-galactosa) isomerasas caracterizadas hasta la fecha (55 a 400 mM).

**Tabla 5.18. Parámetros cinéticos de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa soluble y sus derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L.**

<i>Biocatalizador</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>K<sub>m</sub> (mM)</i>	<i>V<sub>max</sub> (nM/min)</i>
Enzima nativa	30	100	10
	40	70	40
	50	34	80
Derivado en Eupergit C	30	170	1
	40	120	35
	50	50	60
Derivado en Eupergit C 250 L	30	127	3
	40	100	45
	50	40	70

Tanto la enzima libre como sus derivados no fueron inhibidos por tagatosa cuando se trabajó con mezclas de partida conteniendo niveles variables de este monosacárido (0-500 mM). Por su parte, el L-arabitol se comportó como un inhibidor competitivo de la enzima (K<sub>i</sub> de 6.8 mM).

### 5.3.2. Isomerización de D-galactosa

Los derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L se aplicaron en batch usando D-galactosa 100 g/L en amortiguador de actividad como sustrato en un rango de temperaturas de 30-60°C. A su vez se estudió el efecto del pH sobre la isomerización de D-galactosa en el rango 5.5-8.0.

El porcentaje de conversión en D-tagatosa alcanzado fue de 26% a 30°C y de 45% a 60°C, verificándose escasa variación con el pH de trabajo en el entorno de 7.0 (Tabla 5.19). Se ha reportado un nivel de conversión del 32% a 30°C utilizando la L-arabinosa isomerasa de *E. coli* inmovilizada en agarosa activada con bromuro de cianógeno en un sistema en columna con recirculación (Kim et al., 2001). Por otra parte, se han reportado conversiones de 46-48% a 60°C trabajando con un reactor de lecho empacado con una forma mutante de la L-arabinosa isomerasa de *Geobacillus stearothermophilus* expresada en *E. coli* e inmovilizada en alginato (Kim et al., 2003b; Ryu et al., 2003; Jung et al., 2005). Otras enzimas mutantes del mismo género han sido caracterizadas, destacándose que algunas formas permiten obtener una mayor relación tagatosa/galactosa, una conversión más rápida o un descenso en el pH de trabajo (Kim et al., 2006a; Oh et al., 2006a; Oh et al., 2006b). Una enzima proveniente de *Geobacillus* se ha empleado con éxito tanto para la producción de L-ribulosa como de D-tagatosa (Yeom et al., 2008).

Recientemente se ha reportado que la L-arabinosa isomerasa del extremófilo *Anoxybacillus flavithermus* permite obtener conversiones del 60% a 95°C (Li et al., 2011). El genoma, proteoma y fisiología de este microorganismo se ha descrito previamente (Saw et al., 2008).

**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.**

Temperatura (°C)	Conversión (%) <sup>a</sup>			
	Enzima libre		Enzima inmovilizada <sup>b</sup>	
	pH 7.0	pH 7.5	pH 7.0	pH 7.5
30	26	25	25	24
40	34	34	37	39
45	35	39	41	42
50	41	43	42	45
60	45	45	43	45

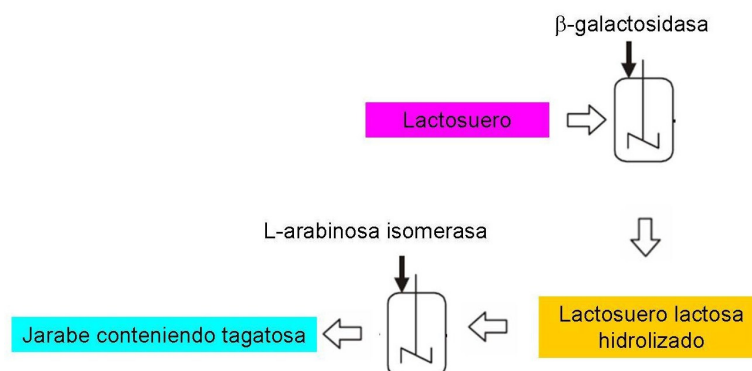
a- Conversión expresada como porcentaje de tagatosa.

b- Derivado en Eupergit C 250 L.

### 5.3.3. Biotransformación de lactosa

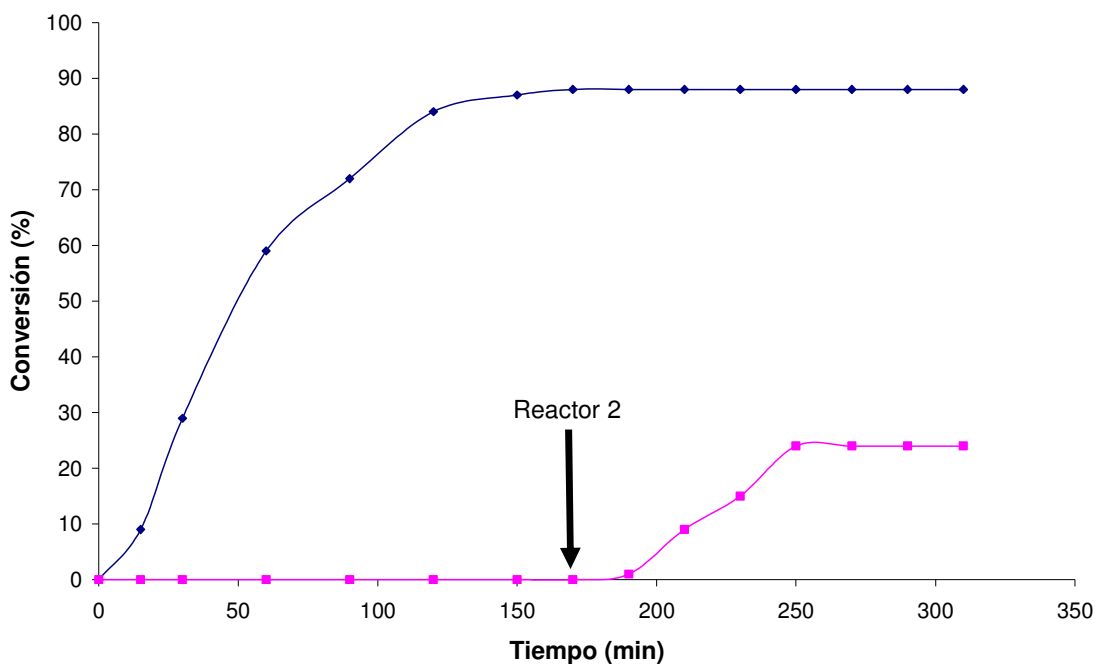
#### *Proceso secuencial*

Se analizaron las posibilidades de desarrollo de un proceso conjunto de bioconversión de lactosa en suero de quesería mediante lactólisis y posterior isomerización de la D-galactosa, combinando el uso de  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa solubles o sus derivados obtenidos mediante inmovilización covalente de ambas enzimas en soportes Eupergit C y Eupergit C 250 L (Fig 5.36).



**Figura 5.36. Uso de derivados de  $\beta$ -galactosidasa y derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en procesos bi-reactor.**

La  $\beta$ -galactosidasa y la L-arabinosa (D-glucosa) isomerasa solubles se utilizaron de manera secuencial haciendo uso de un primer reactor en batch con  $\beta$ -galactosidasa e incorporando el suero lactosa-hidrolizado (con tratamiento térmico previo para inactivar la  $\beta$ -galactosidasa) en un segundo reactor conteniendo L-arabinosa isomerasa (Torres y Batista-Viera, 2011). El proceso efectuado con las enzimas en solución a 50°C arrojó valores de conversión de 89% para la lactólisis y 21% para la isomerización (Fig. 5.37).

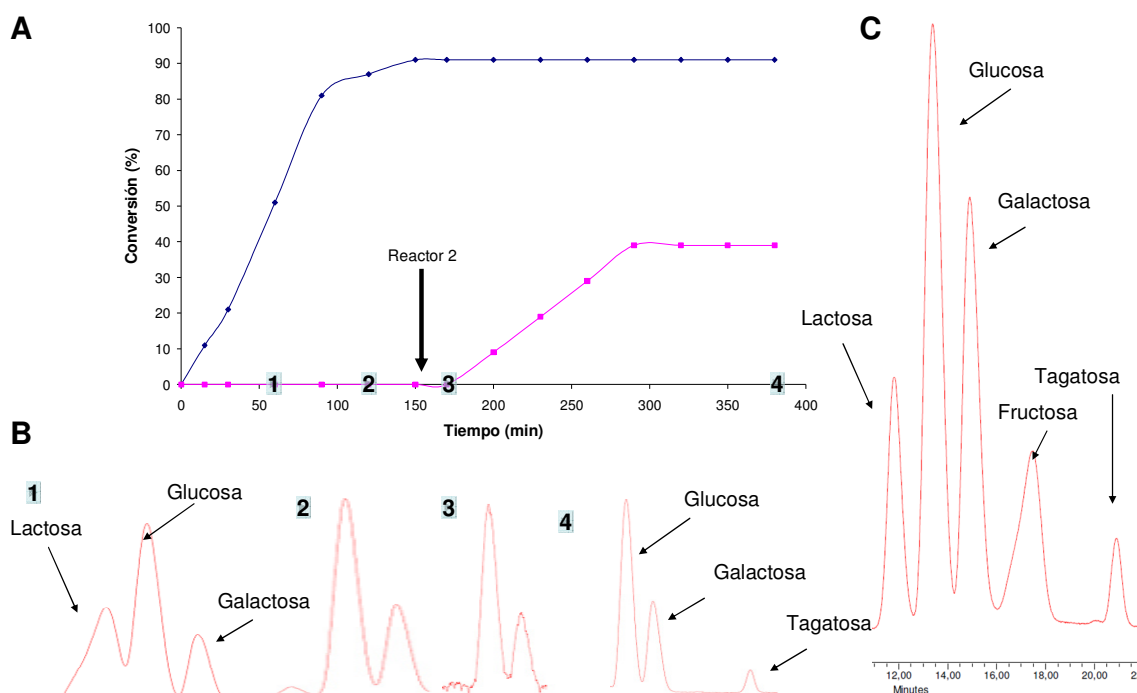


**Figura 5.37.** Hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con  $\beta$ -galactosidasa soluble (Reactor 1) y posterior isomerización de galactosa con L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa soluble (Reactor 2). ♦ glucosa ■ tagatosa. Un tratamiento térmico del producto del primer reactor a 100°C durante 10 minutos aseguró la inactivación de la  $\beta$ -galactosidasa previo a la operación del segundo reactor.

Los derivados de  $\beta$ -galactosidasa en Eupergit C 250 L se aplicaron a la hidrólisis de lactosa en procesos en batch a 50°C usando lactosa 4.6% y lactosuero de queso Mozzarella ajustado a pH 7.0 como sustratos. El producto obtenido se incorporó a un batch conteniendo L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa inmovilizada, el cual operó a la misma temperatura (Fig. 5.38). Dado que previamente se ha determinado que el pH óptimo de las enzimas difiere en una unidad, el pH de trabajo seleccionado (7.0) responde a un compromiso entre la actividad óptima de ambas enzimas, para evitar un ajuste de pH intermedio entre las reacciones de lactólisis e isomerización.

Respecto a los resultados del procesamiento secuencial con ambas enzimas cuando se empleó suero de Mozzarella como sustrato, se obtuvieron grados de lactólisis cercanos al 89% y un cociente tagatosa/galactosa de un 43%, operando los reactores a 50°C. En base a sus características

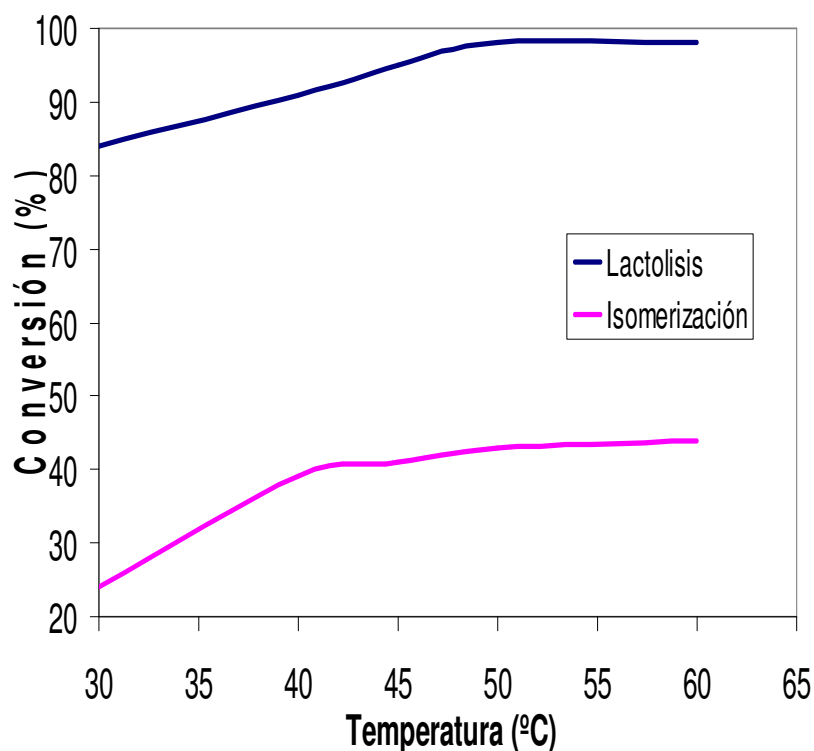
funcionales se seleccionó para posteriores aplicaciones el derivado en Eupergit C 250 L, tomando en cuenta tanto la actividad como la estabilidad de los derivados.



**Figura 5.38.** (A) Hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con  $\beta$ -galactosidasa (Reactor 1) y posterior isomerización de galactosa a la misma temperatura con L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (Reactor 2), inmovilizadas en Eupergit C 250L.  $\blacklozenge$  glucosa  $\blacksquare$  tagatosa (B) Perfiles de HPLC correspondientes a los puntos numerados en (A). (C) Mezcla de estándares y sus correspondientes tiempos de retención.

El porcentaje de conversión en D-tagatosa obtenido fue de 25% a 30°C y de 43% a 50°C (representando 15% y casi 25% en términos de carbohidratos totales), trabajando tanto con lactosa 4.6% como con suero de Mozzarella. Se ha reportado la producción de tagatosa en un sistema continuo con la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa del termófilo *Geobacillus stearothermophilus* (expresada en *E. coli*) inmovilizada en perlas de alginato de calcio (Ryu et al., 2003). La conversión promedio en este sistema llegó al 48 % (p/p) a 60°C cuando se trabajó sobre galactosa 300 g/L.

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de lactosa y la isomerización de D-galactosa. Los resultados muestran que el nivel de lactosa hidrolizada aumenta linealmente con la temperatura hasta 50°C; la temperatura también aumenta el porcentaje de tagatosa obtenido en el equilibrio, verificándose aumentos significativos hasta los 45-50°C (Fig. 5.39). En función de estos resultados, la temperatura de trabajo se fijó en 50°C para los experimentos subsecuentes.



**Figura 5.39.** Porcentajes de conversión alcanzados durante las reacciones de lactolisis e isomerización secuenciales (400 minutos de reacción) a distintas temperaturas.

Hasta el momento se han utilizado sistemas donde cada reactor de trabajo contenía sólo una actividad enzimática, de manera que se aseguró que en el segundo reactor conteniendo L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa la operación se realizó en ausencia de  $\beta$ -galactosidasa (que fue inactivada o retirada por filtración, en el caso de las enzimas soluble e inmovilizada, respectivamente). De la comparación entre estos procesos estrictamente secuenciales realizados en dos reactores separados, y aquellos donde el suero lactosa-hidrolizado se isomeriza por el agregado del derivado de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en el mismo reactor una vez completado el proceso de lactolisis, se obtuvieron indicios de una diferencia en los niveles de conversión de sustrato, favoreciendo al segundo sistema donde la isomerización se realizó en presencia de  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 5.40). Esta fue la base para los posteriores estudios en sistemas mono-reactor.



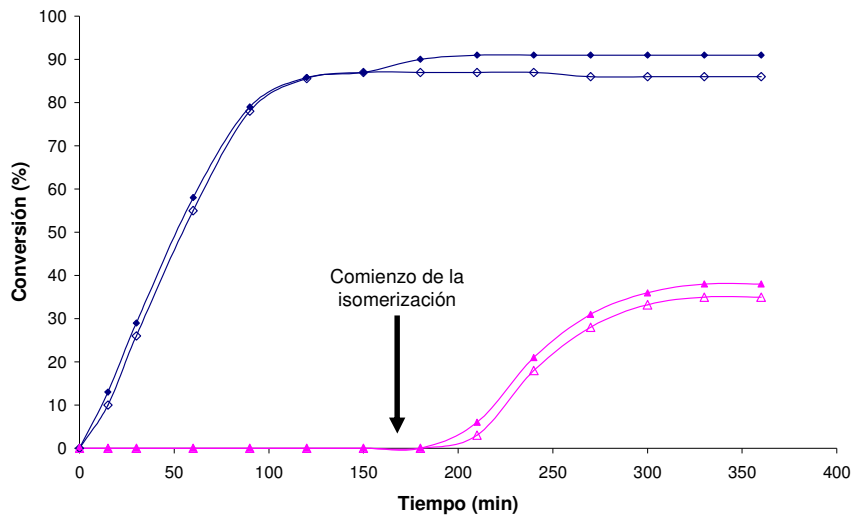


Figura 5.40. Hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada en Eupergit C 250 L (Reactor 1) y posterior isomerización de galactosa con L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa inmovilizada en Eupergit C 250 L, con la etapa de isomerización desarrollada en un segundo reactor y en ausencia de  $\beta$ -galactosidasa (Sistema 1) o en el mismo reactor y en presencia de  $\beta$ -galactosidasa (Sistema 2).  $\diamond$  glucosa (Sistema 1)  $\blacklozenge$  glucosa (Sistema 2)  $\triangle$  tagatosa (Sistema 1)  $\blacktriangle$  tagatosa (Sistema 2).

*Uso simultáneo de los derivados*

Se evaluó el efecto de la operación en un único reactor de las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, inmovilizadas individualmente en Eupergit C 250 L. Estos derivados se emplearon con suero de Mozzarella en procesos de hidrólisis de lactosa e isomerización de D-galactosa a pH 7.0 y 50°C. (Fig. 5.41).

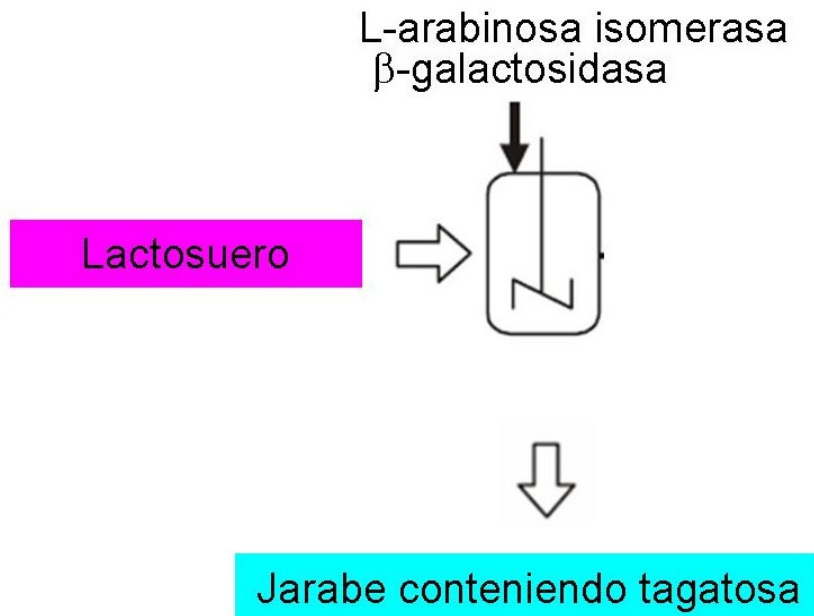
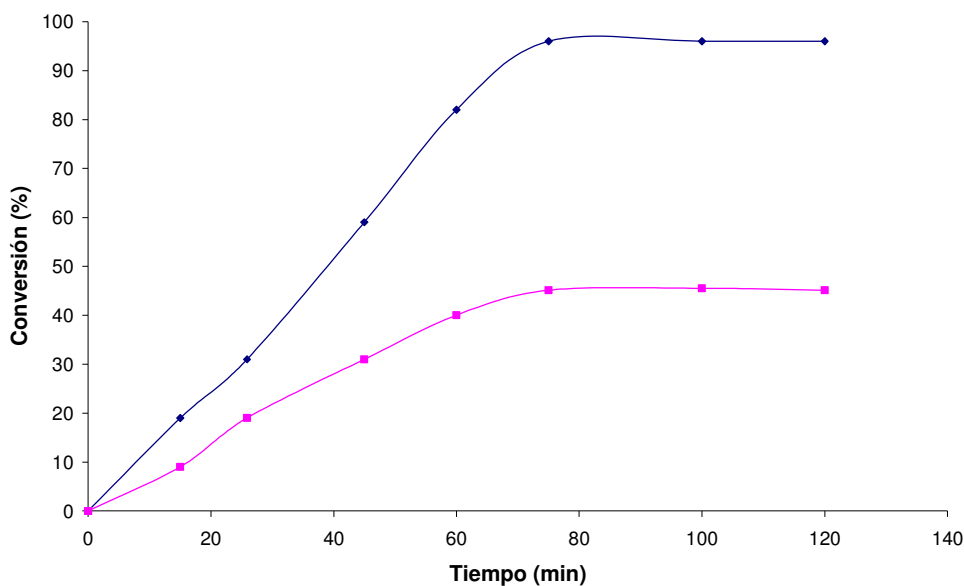


Figura 5.41. Uso de derivados de  $\beta$ -galactosidasa y de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en procesos mono-reactor.

Como resultado del procesamiento simultáneo del suero de Mozzarella con ambas enzimas se obtuvo una lactolisis completa, verificándose una aparente reducción en la inhibición por galactosa, en base al consumo de este sustrato por la actividad de la isomerasa (Fig. 5.42). En contraste, el procesamiento secuencial con ambas enzimas, en un sistema compuesto de dos reactores, arrojó grados de lactolisis cercanos al 89%. El cociente tagatosa/galactosa a 50°C se mantuvo en 43%, para ambos casos.



**Figura 5.42.** Procesos simultáneos mono-reactor de hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con  $\beta$ -galactosidasa e isomerización de galactosa con L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, inmovilizadas individualmente en Eupergit C 250 L. ◆ glucosa ■ tagatosa.

Bajo las mismas condiciones las enzimas solubles operando en un único reactor arrojaron una producción de 23% de tagatosa (Fig. 5.43). Dado que este comportamiento para las enzimas solubles (y en particular para la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, responsable de la producción de tagatosa) fue observado tanto en los procesos secuenciales como simultáneos, se puede especular que la menor estabilidad térmica de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa soluble es responsable de estos bajos niveles de conversión de galactosa en tagatosa, lo cual fue corroborado por la reducción en los niveles de lactolisis (Fig. 5.43).

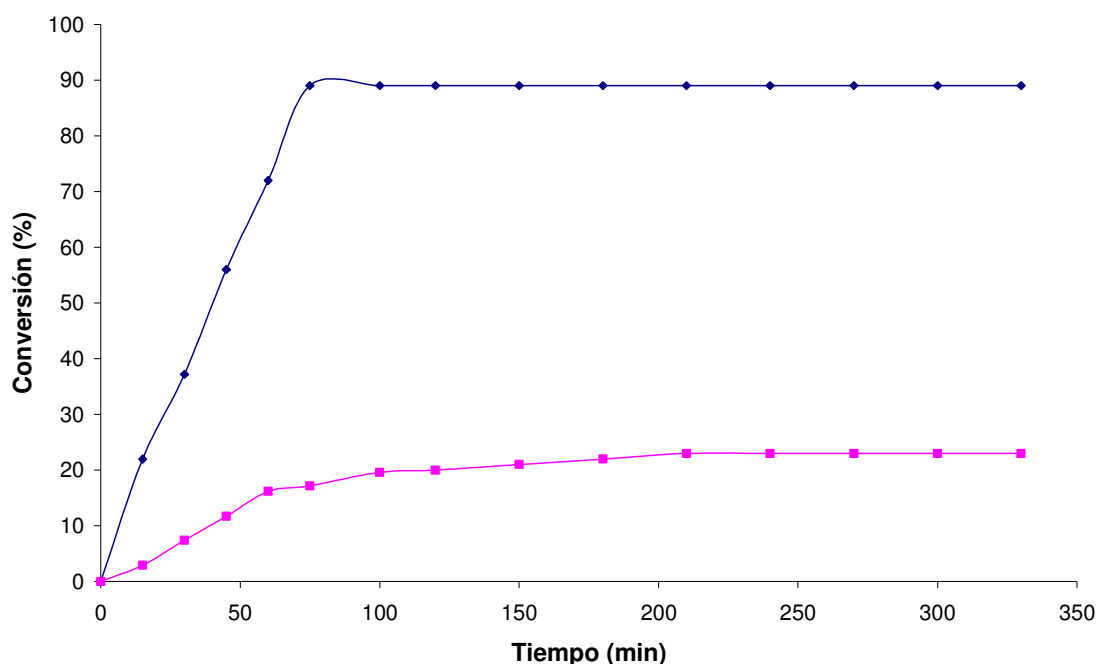


Figura 5.43. Procesos simultáneos mono-reactor de hidrólisis de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con  $\beta$ -galactosidasa soluble e isomerización de galactosa con L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa soluble.  $\blacklozenge$  glucosa  $\blacksquare$  tagatosa. Se emplearon 31 U de  $\beta$ -galactosidasa y 2.1 U de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa.

### Coinmovilización

La coinmovilización de enzimas que catalizan reacciones consecutivas en diversos soportes es una estrategia que puede contribuir a la mejora de las condiciones operativas de los biocatalizadores aplicados a procesos específicos. Con este objetivo se han utilizado los más diversos soportes y protocolos de inmovilización (Atia, 2005). Como forma de reducir al mínimo los problemas difusionales durante el proceso de lactólisis e isomerización, conservando el beneficio de la aparente reducción de la inhibición por galactosa, las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa fueron coinmovilizadas en una misma partícula. Las enzimas se coinmovilizaron en Eupergit C 250 L, en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5 y a 25°C, empleándose para  $\beta$ -galactosidasa una carga aplicada de 30 mg/g de gel (carga determinada como óptima para esta enzima) y para L-arabinosa isomerasa de 4 mg/g de gel (carga máxima que posibilita la preparación enzimática purificada disponible). Los derivados obtenidos alcanzaron eficiencias de inmovilización y estabilidades térmicas comparables a aquellas de las enzimas inmovilizadas individualmente.

Los derivados bienzimáticos resultantes se emplearon en procesos de hidrólisis de lactosa/isomerización de galactosa en suero de Mozzarella a 50°C (Fig. 5.44).

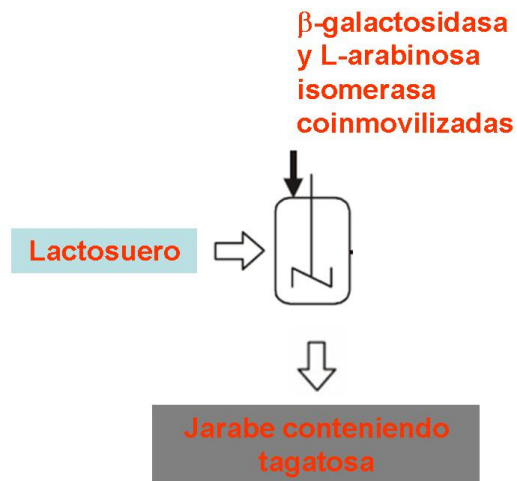


Figura 5.44. Uso de  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa coinmovilizadas en procesos mono-reactor.

Como resultado, se mantuvieron muy buenos niveles de conversión respecto al sistema mono-reactor con enzimas inmovilizadas individualmente, reduciéndose el tiempo de reacción necesario para lograr las concentraciones de equilibrio (Fig. 5.45).

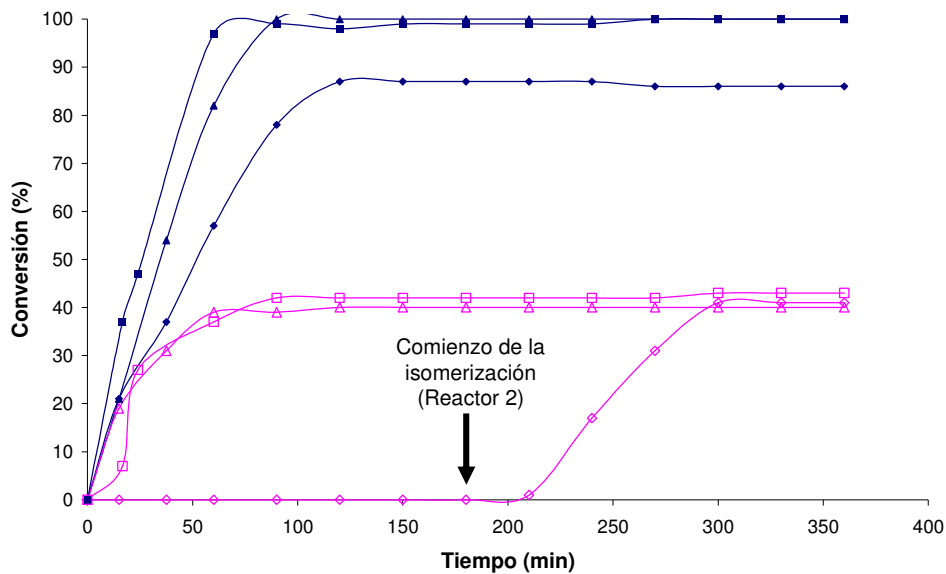


Figura 5.45. Operación de sistemas secuenciales (bi-reactor) y simultáneos (mono-reactor) con  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa inmovilizadas o coinmovilizadas en Eupergit C 250 L. Procesos secuenciales: ◆ glucosa ◇ tagatosa. Procesos simultáneos con enzimas inmovilizadas individualmente: ▲ glucosa △ tagatosa. Procesos simultáneos con enzimas coinmovilizadas: ■ glucosa □ tagatosa.

Se apreció una diferencia en las velocidades de los procesos simultáneos llevados a cabo con derivado coinmovilizado bienzimático y con una mezcla de derivados de cada una de las enzimas inmovilizadas separadamente, como se ve en detalle en la Figura 5.46. En efecto, las velocidades de

los procesos de lactolisis e isomerización fueron muy superiores con el sistema coinmovilizado. Asimismo, los procesos donde las enzimas actúan en un mismo reactor (sistemas simultáneos) presentaron mayores niveles de conversión tanto en términos de lactosa hidrolizada como de tagatosa producida. La productividad en tagatosa del sistema bi-enzimático secuencial es aproximadamente 8 g/Lh, en tanto que el aumento de productividad para los sistemas mono-reactor con enzimas inmovilizadas individualmente y coinmovilizadas es del 12% y el 25%, respectivamente, comparado con el sistema bi-reactor (Fig. 5.47).

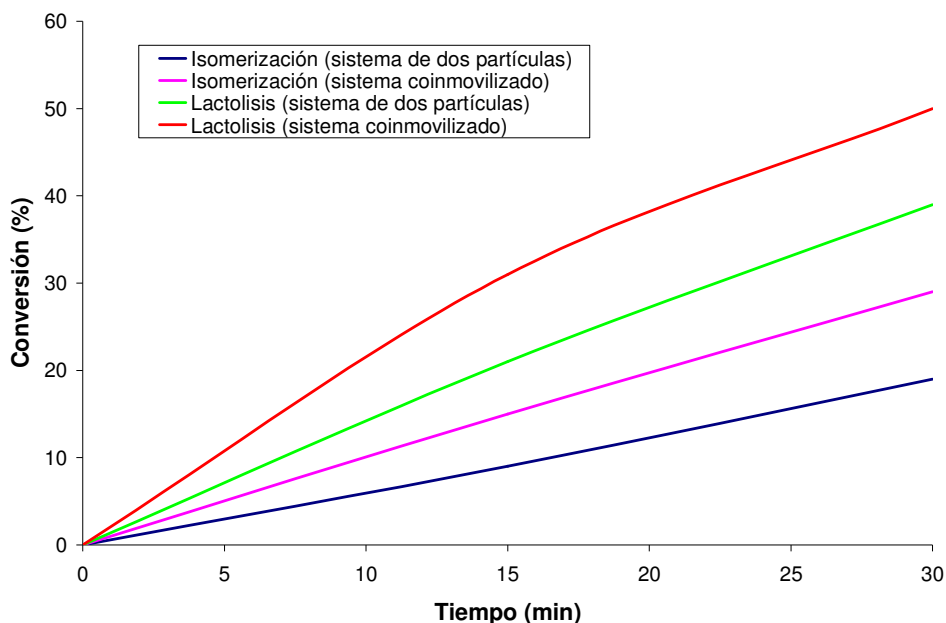


Figura 5.46. Comparación de velocidades para procesos simultáneos con enzimas inmovilizadas individualmente y simultáneos con enzimas coinmovilizadas.

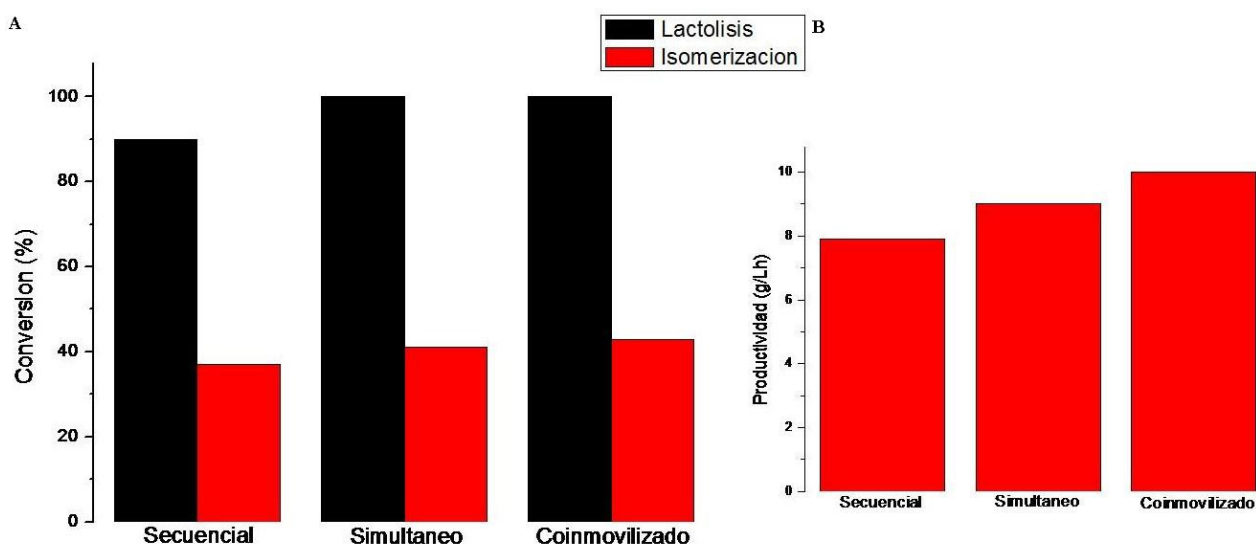


Figura 5.47. Niveles de conversión (en términos de lactolisis e isomerización) (A) y productividades (en términos de tagatosa) (B), alcanzados con distintos sistemas mono-reactor con enzimas  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa inmovilizadas individualmente [Simultáneo] o coinmovilizadas en Eupergit C 250 L (Coinmovilizado), y bi-reactor (Secuencial).

### Reuso de derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa

Se estudió la posibilidad de reutilización de los derivados de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa inmovilizada individualmente o coinmovilizada con  $\beta$ -galactosidasa en Eupergit C 250 L a lo largo de varios ciclos de operación a 50°C, empleando sueros de Mozzarella lactosa-hidrolizados (proceso secuencial) o sueros de Mozzarella (procesos simultáneos) respectivamente, como sustratos.

Los derivados L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa-Eupergit C 250 L inmovilizados y coinmovilizados mantuvieron cocientes tagatosa/galactosa entre 37-40% y 41-44%, respectivamente, a lo largo de 6 ciclos de operación a 50°C (Fig. 5.48). En términos de actividad residual, los derivados LAI-Eupergit C conservan actividades residuales en el entorno de 81% luego de 6 ciclos, en tanto que los derivados  $\beta$ -galactosidasa-LAI-Eupergit C 250 L exhiben actividades residuales del 90% luego del sexto ciclo de operación.

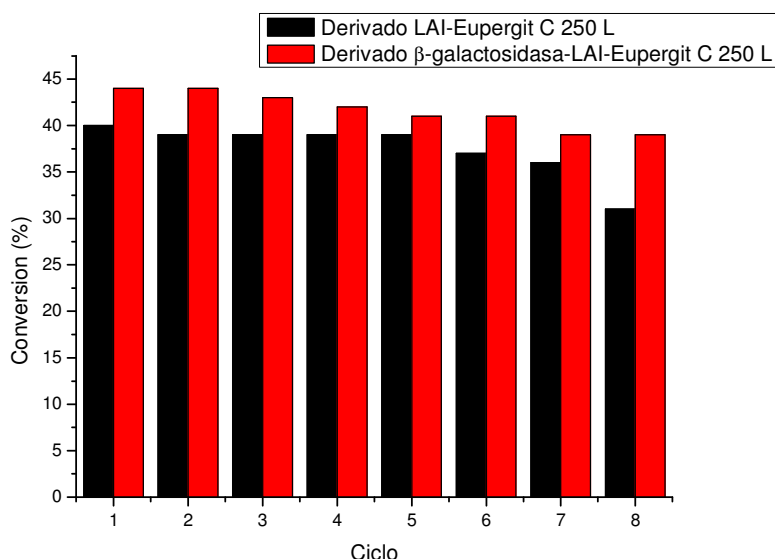


Figura 5.48. Reuso en reactores en batch a 50°C de los derivados L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa-Eupergit C 250 L (LAI-Eupergit C 250 L) en procesos secuenciales y  $\beta$ -galactosidasa-L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa-Eupergit C 250 L ( $\beta$ -galactosidasa-LAI-Eupergit C 250 L) en procesos simultáneos. La conversión se expresa como porcentaje de tagatosa.

### 5.4. Inmovilización/estabilización de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa

La D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de *Streptomyces rubiginosus* (Hampton) fue inmovilizada en soportes acrílicos epoxi-activados haciendo uso de la estrategia descrita con anterioridad. Se seleccionaron los soportes Eupergit C y Eupergit C 250 L en base a los estudios previos llevados a cabo con  $\beta$ -galactosidasa. La inmovilización se realizó durante 24 horas a 25°C

en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5, obteniéndose rendimientos máximos (100%) y eficiencias de inmovilización de 91% (Eupergit C) y 98% (Eupergit C 250 L).

Posteriormente se exploraron las posibilidades de estabilización térmica de estos biocatalizadores mediante dos estrategias post-inmovilización: i- bloqueo de los grupos oxirano remanentes con glicina 3 M; ii- tratamiento alcalino durante 7 o 24 horas a pH 8.5 (para favorecer la unión multipuntual enzima-soporte) y posterior bloqueo con glicina, estrategia similar a la empleada en el proceso de estabilización de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa. Se determinó la eficiencia de inmovilización y la estabilidad térmica de los derivados sometidos a ambos tratamientos. (Tabla 5.20).

Los derivados en Eupergit C 250 L sometidos al proceso de bloqueo [estrategia i] retuvieron 98% de su actividad inmovilizada, en tanto que los derivados en Eupergit C retuvieron en el entorno de 90% de su actividad. Sus vidas medias a 50°C fueron de 210 y 230 h respectivamente, claramente superiores a las correspondientes a la enzima nativa (vida media de 23 h) y sus derivados no bloqueados. Los derivados más termoestables fueron aquellos sometidos a tratamiento alcalino durante 24 horas antes del bloqueo [estrategia ii], con vidas medias de 491 y 554 h a 50°C para Eupergit C 250 L y Eupergit C, respectivamente. Si bien la eficiencia de inmovilización se reduce en ambos casos, las actividades inmovilizadas son superiores en los derivados insolubles en Eupergit C 250 L, probablemente debido a la mayor intensidad de unión multipuntual en el caso del soporte Eupergit C, más activado. En tanto que la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* es monomérica, la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de *S. rubiginosus* posee cuatro subunidades idénticas, lo cual podría ser la base de las diferencias en estabilidad que se obtienen al utilizar esta estrategia combinada para la estabilización de ambas enzimas.

**Tabla 5.20. Inmovilización y estabilización de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L.**

SopORTE	Incubación a pH 8.5 (h)	Proteína aplicada (mg/g de gel)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)	Vida media (h)
Eupergit C 250 L	0 <sup>a</sup>	1.9	100 ± 1	98 ± 1	210
	7	-----	-----	91 ± 1	360
	24	-----	-----	84 ± 1	491
Eupergit C	0	1.9	100 ± 1	91 ± 1	230
	7	-----	-----	79 ± 1	389
	24	-----	-----	66 ± 1	554

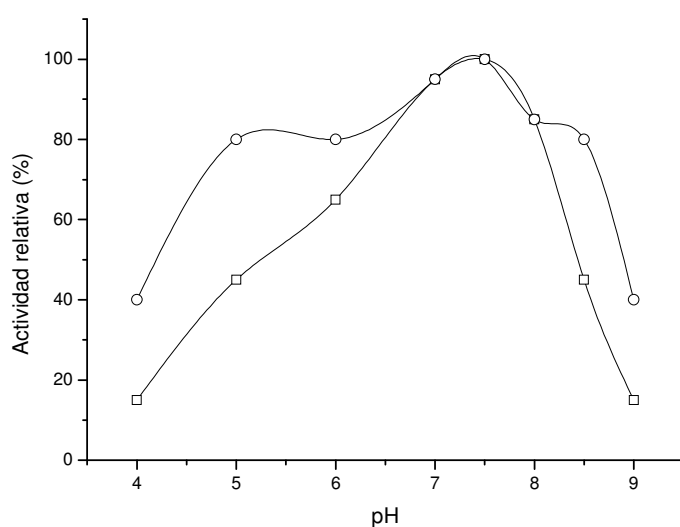
La inmovilización de GI se realizó incubando 5.8 U de la enzima con 1 g del soporte correspondiente en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5 durante 24 h. La vida media (a 50°C) de la enzima nativa (en concentración equivalente a los derivados obtenidos) fue de 23 h bajo las mismas condiciones. Los resultados son la media de triplicados ± SD.

a- Derivados sólo bloqueados.

### 5.4.1. Caracterización de los derivados de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa

#### *pH óptimo y estabilidad frente al pH*

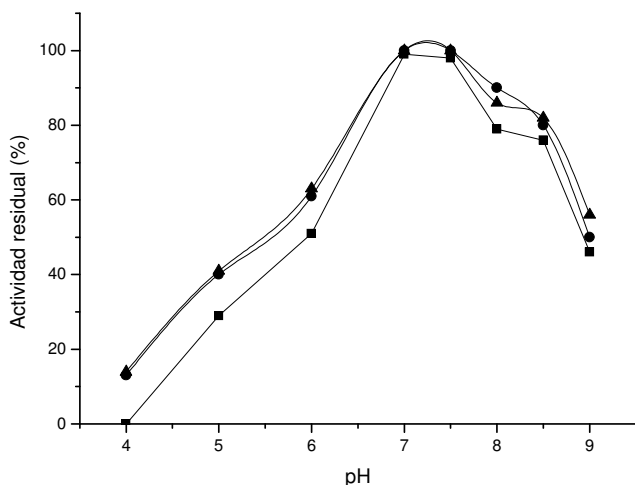
Los efectos del pH sobre la actividad y estabilidad fueron analizados en forma comparativa entre la enzima soluble y los derivados. En el caso de la enzima en solución se evidenció una curva típica en la relación actividad vs. pH, con un óptimo en pH 7.5 y un descenso marcado a pH ácidos. Los derivados en Eupergit C presentan un pH óptimo en 7.5 y mayores actividades que la enzima soluble a pH por debajo de 6.0, lo cual puede deberse a diferencias de microentorno (Fig. 5.49). La enzima inmovilizada conserva más del 75% de su actividad entre pH 5.0-8.5. No obstante, la enzima libre sólo presenta una actividad relativa en el entorno de 40% para estos pH. Demirel et al. (2006) y Rhimi et al. (2007) reportan un pH óptimo de 7.5 para los derivados D-xilosa (D-glucosa) isomerasas del género *Streptomyces* entrampados en varios geles, en particular alginato.



**Figura 5.49.** Efecto del pH sobre la actividad de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y sus derivados. □ Enzima nativa ○ Derivado en Eupergit C.

Los perfiles de estabilidad para la enzima soluble y los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L fueron similares. No obstante, la comparación de los perfiles evidencia que considerado cualquiera de los derivados, éstos presentan una ligera estabilización frente al pH (Fig. 5.50). La estrategia de estabilización basada en tratamiento alcalino no resultó efectiva en lo que refiere a estabilidad frente al pH.





**Figura 5.50.** Efecto del pH sobre la estabilidad de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y sus derivados. ■ Enzima nativa ▲ Derivado en Eupergit C ● Derivado en Eupergit C 250 L.

### *Temperatura óptima*

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad de la forma nativa y los derivados de la enzima. La enzima libre y todos sus derivados exhiben un incremento continuo de la actividad en el rango 40-70°C. La temperatura óptima para la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa inmovilizada en Eupergit C y Eupergit C 250 L fue de 60°C, confirmando reportes previos (Tükel y Alagöz, 2008). La enzima de *S. phaeochromogenes* presenta una temperatura óptima de 80°C (Strandberg y Smiley, 1971); no obstante, las temperaturas de operación seleccionadas en general están por debajo de la temperatura óptima, dado que el aumento de temperatura, si bien incrementa el nivel de producción de fructosa, favorece también reacciones secundarias que llevan a la generación de subproductos (Chou et al., 1976). En las aplicaciones reportadas en este trabajo, los derivados GI-Eupergit C y GI-Eupergit C 250 L se utilizarán en combinación con otros derivados enzimáticos y a una temperatura de 50°C.

### *Estabilidad térmica*

En la literatura existen múltiples reportes de la estabilización térmica de enzimas particularmente sensibles por inmovilización en Eupergit C. Para citar algunos ejemplos, la termoestabilidad de los derivados de la nitrilo hidratasa inmovilizados en Eupergit C y posteriormente entrecruzados con 1-etil-3-dimetil amino propilcarbodiimida (EDAC) para estabilizar su estructura oligomérica, se distingue de la de la enzima soluble a 60°C (con vidas medias de aproximadamente 50 minutos para la enzima soluble y 330 minutos para los derivados) [Chiyanzu et al., 2010]. Pero la estrategia también es útil para el caso de enzimas muy estables

frente a la temperatura, como el caso de la (R)-hidroxinitrilo liasa de *Prunus pseudoarmeniaca* cuya vida media a 50°C es de aproximadamente 30 horas, incrementándose a casi el doble por inmovilización en Eupergit C 250 L y más de tres veces cuando se la inmoviliza en Eupergit C (Tükel et al., 2010). La lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en Eupergit C y Eupergit C 250 L retiene más del 70% de su actividad luego de una hora de incubación a una temperatura de 70°C (Othman et al., 2008). Se ha reportado que la inmovilización en Eupergit C, Eupergit C 250 L y GAMM (matriz similar a las anteriores) provee alta estabilidad a esta enzima, incluso a temperaturas superiores a los 60°C (Tükel y Alagöz, 2008; Yu et al., 2011). La D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de *Streptomyces* sp. NCIM 2730 (tetramérica) es activa como tetramero y como dímero, en tanto que los monómeros son formas inactivas que se obtienen luego de tratamientos térmicos a altas temperaturas (Gaikwad et al., 1993; Ghatge et al., 1994).

En este trabajo, no obstante su gran termoestabilidad, la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa ha sido estabilizada por un factor de 30-40 veces en base a la metodología de estabilización empleada, combinando tratamiento alcalino y bloqueo.

#### *Parámetros cinéticos*

La  $K_m$  de la enzima libre y la  $K_m$  aparente de los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L se determinaron a 30°C, 40°C y 50°C, utilizando D-glucosa como sustrato, asumiendo una cinética de Michaelis-Menten y empleando para el cálculo la linealización de Eadie-Hofstee (Tabla 5.21). Los valores de  $K_m$  son más altos para los derivados que para la enzima soluble. Como se esperaba  $K_m$  disminuyó con el incremento de temperatura. Como en el caso de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, los derivados en Eupergit C mostraron valores de  $V_{m\acute{a}x}$  regularmente más bajos que los hallados en el caso de los derivados en Eupergit C 250 L. La modificación de ambas constantes podría considerarse como un efecto de limitaciones difusionales, efectos estéricos o cambios estructurales en la enzima unida covalentemente respecto a la enzima nativa, u ocurrir como consecuencia de una menor accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima, como se discutió antes. Knezevic et al. (2006) reportaron que la  $K_m$  de la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en el soporte amino-Eupergit C se aproxima a la  $K_m$  de la enzima soluble. No obstante, la interacción de las lipasas con soportes hidrofóbicos presenta características peculiares que pueden facilitar la adsorción preferencial de la forma “abierta” de la lipasa en condiciones de baja fuerza iónica (Hernández et al., 2011).

**Tabla 5.21. Parámetros cinéticos de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa soluble y sus derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L.**

<i>Biocatalizador</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>K<sub>m</sub> (mM)</i>	<i>V<sub>max</sub> (nM/min)</i>
Enzima nativa	30	365	49
	40	315	68
	50	265	176
Derivado en Eupergit C	30	925	17
	40	802	59
	50	750	159
Derivado en Eupergit C 250 L	30	905	31
	40	775	65
	50	672	161

En base a sus características funcionales se seleccionó para posteriores aplicaciones el derivado en Eupergit C 250 L, tomando en cuenta tanto la actividad como la estabilidad de los derivados.

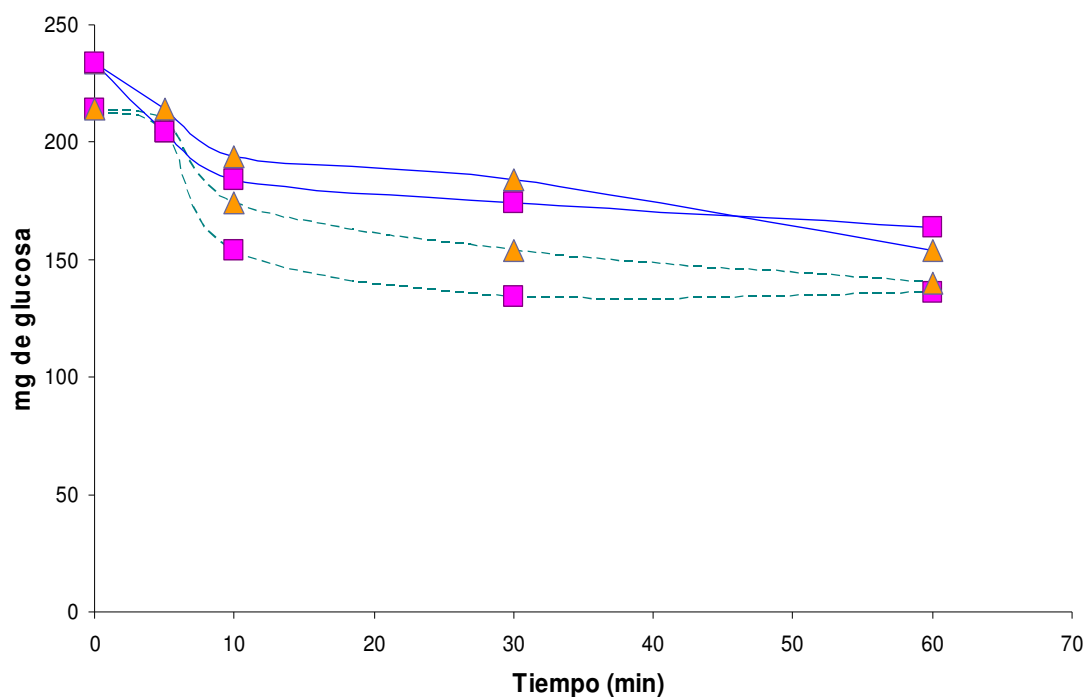
#### **5.4.2. Biotransformación de lactosa**

Se estudió el empleo de una combinación de  $\beta$ -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa para desarrollar un proceso de hidrólisis de lactosa e isomerización de D-glucosa, con producción de D-fructosa. Este proceso es de interés debido al alto poder edulcorante de la fructosa. Para llevar adelante este proceso de biotransformación se estudiaron en forma comparativa tres tipos de derivados de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa, comprendiendo: i- derivados inmovilizados comerciales obtenidos a partir de la adsorción de la enzima en DEAE-celulosa aglomerado con poliestireno y TiO<sub>2</sub> (Gensweet, IGI, Genencor); ii- derivados obtenidos a partir de la inmovilización en Eupergit C y Eupergit C 250 L de la glucosa isomerasa de Genencor (previamente extraída del soporte comercial); iii- inmovilizados y estabilizados de la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (Hampton) en Eupergit C y Eupergit C 250 L obtenidos en el curso de este trabajo, como ya fue detallado (sección 5.4).

##### ***Derivado comercial***

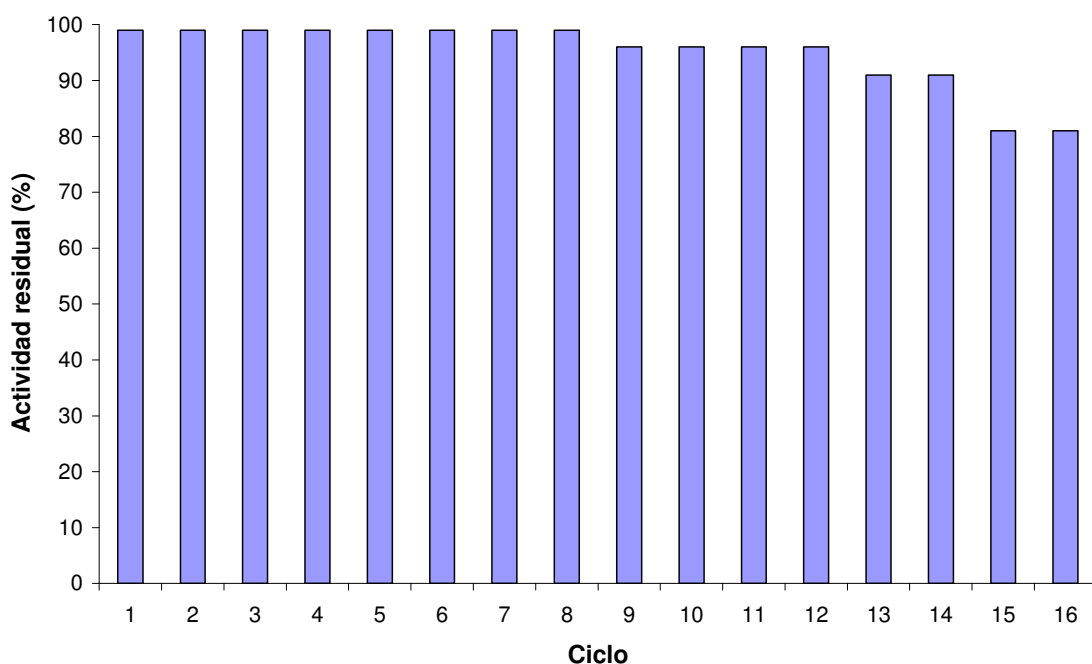
En el rango de temperaturas de trabajo, 20-70°C, el derivado de D-xilosa (D-glucosa) inmovilizado comercial (IGI, Genencor) mostró un incremento proporcional de actividad con incrementos de la temperatura de operación, tanto con el sustrato convencional (jarabe de glucosa 40%), como con lactosuero lactosa-hidrolizado. El máximo de actividad se ubicó en 50°C, temperatura a la que se reporta alta estabilidad de la preparación (Bhosale, 1996). La acción de la

isomerasa sobre los distintos sustratos naturales reveló algunas diferencias en el porcentaje de isomerización alcanzado así como en la cinética de la reacción (Torres y Batista-Viera, 2006). En todos los casos se obtuvieron porcentajes de fructosa superiores al 40% al cabo de 85 minutos. El mayor porcentaje de isomerización por el derivado IGI se alcanzó empleando suero de queso Mozzarella lactosa-hidrolizado como sustrato, en el que se llegó a un porcentaje de 44% de fructosa operando a 50°C (Fig. 5.51).



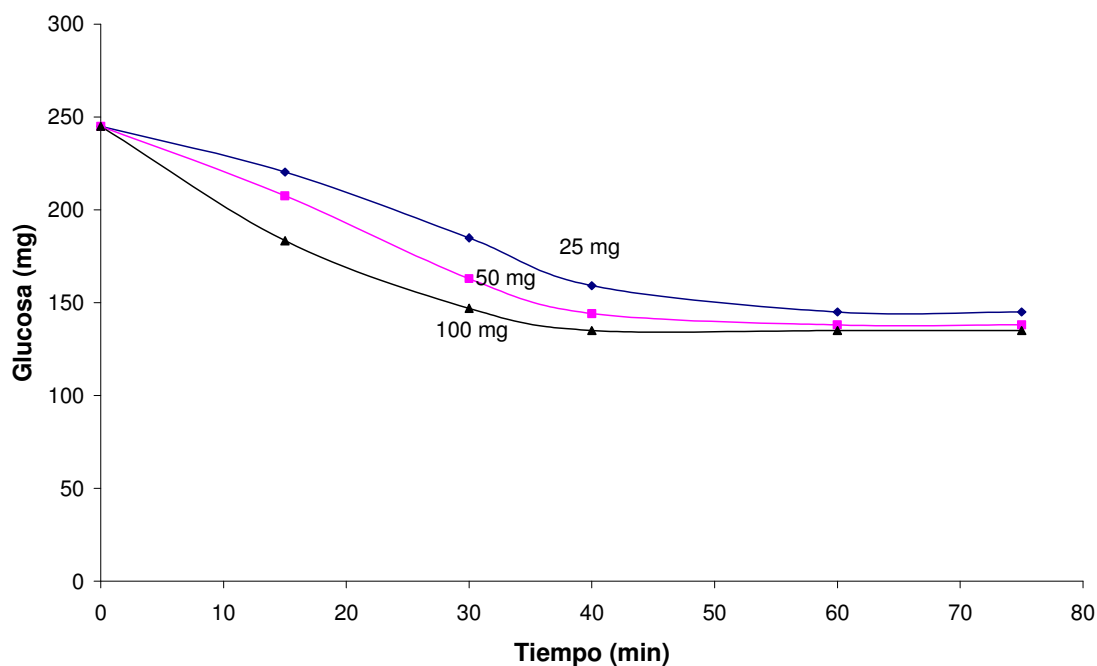
**Figura 5.51.** Isomerización a 50°C por medio de derivado IGI de sueros de queso Pratto (línea entera) y Mozzarella (línea punteada) lactosa-hidrolizados por  $\beta$ -galactosidasa soluble (triángulos) y derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C (cuadrados).

El derivado IGI no mostró disminución apreciable de su actividad a través de 16 ciclos de reuso a 50°C, obteniéndose en todos los casos un nivel de conversión en fructosa del 44% luego de una hora de incubación. Los resultados obtenidos en términos de actividad residual luego de cada reuso se muestran en la Figura 5.52.



**Figura 5.52. Actividad residual de derivados IGI en función de los ciclos de reuso a 50°C con suero de Mozzarella lactosa-hidrolizado como sustrato.**

Se estudió el efecto de la relación derivado/sustrato para un volumen fijo de suero lactosa-hidrolizado y variando la cantidad de derivado IGI aplicado para su isomerización en procesos en batch. Se empleó un volumen de 10 mL de suero y una cantidad de derivado de 25-100 mg (Figura 5.53).



**Figura 5.53. Efecto de la relación derivado-sustrato utilizada sobre el proceso de isomerización de glucosa en suero de Mozzarella lactosa-hidrolizado con derivado IGI.**

## Derivados en soportes acrílicos

Los derivados de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en Eupergit C 250 L se aplicaron en batch usando D-glucosa 500 g/L como sustrato en un rango de temperaturas 30-60°C (Fig. 5.54). El porcentaje de D-fructosa obtenido fue de 36% a 30°C y de 55% a 60°C (Tabla 5.22) A su vez se estudió el efecto del pH sobre la isomerización de glucosa en el rango 7.0-8.0, verificándose escasa variación.

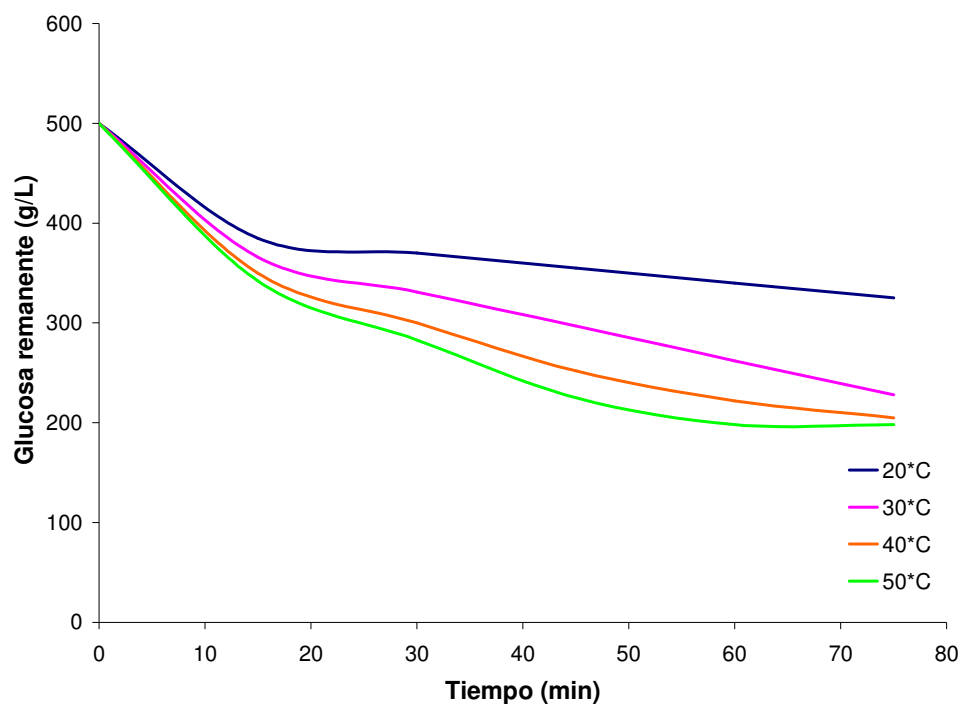


Figura 5.54. Efecto de la temperatura sobre la isomerización de D-glucosa catalizada por D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (derivado GI-Eupergit C 250 L).

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.

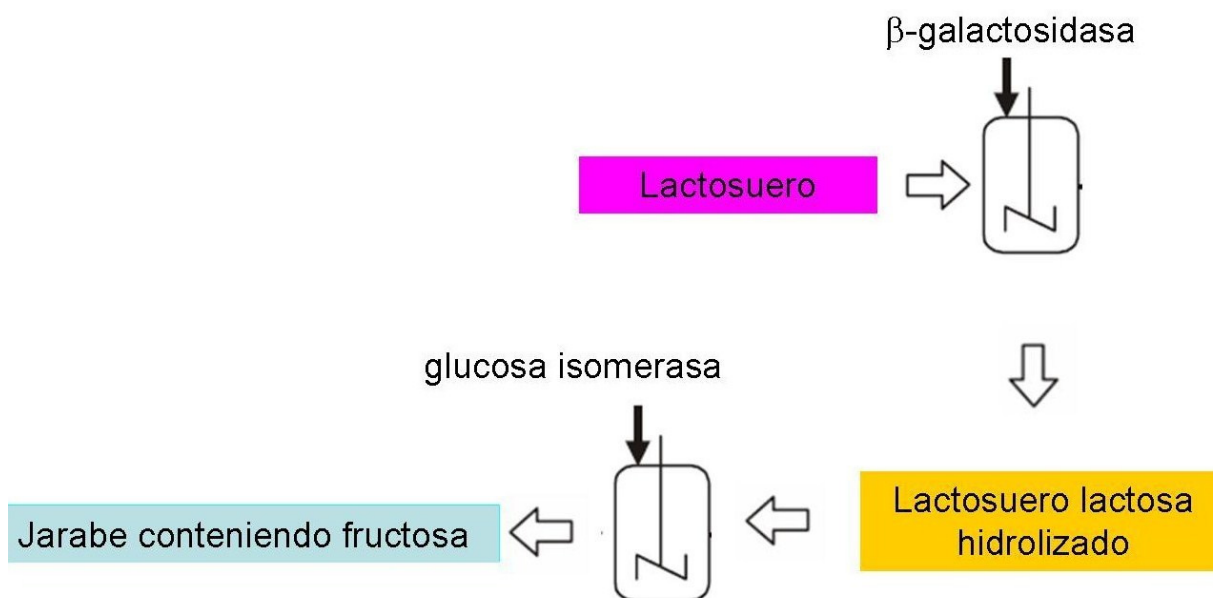
Temperatura (°C)	Conversión (%) <sup>a</sup>	
	Enzima libre	Enzima inmovilizada <sup>b</sup>
30	32	36
40	41	43
45	46	49
50	51	53
60	51	55

a- Conversión expresada como porcentaje de fructosa.

b- Derivado en Eupergit C 250 L.

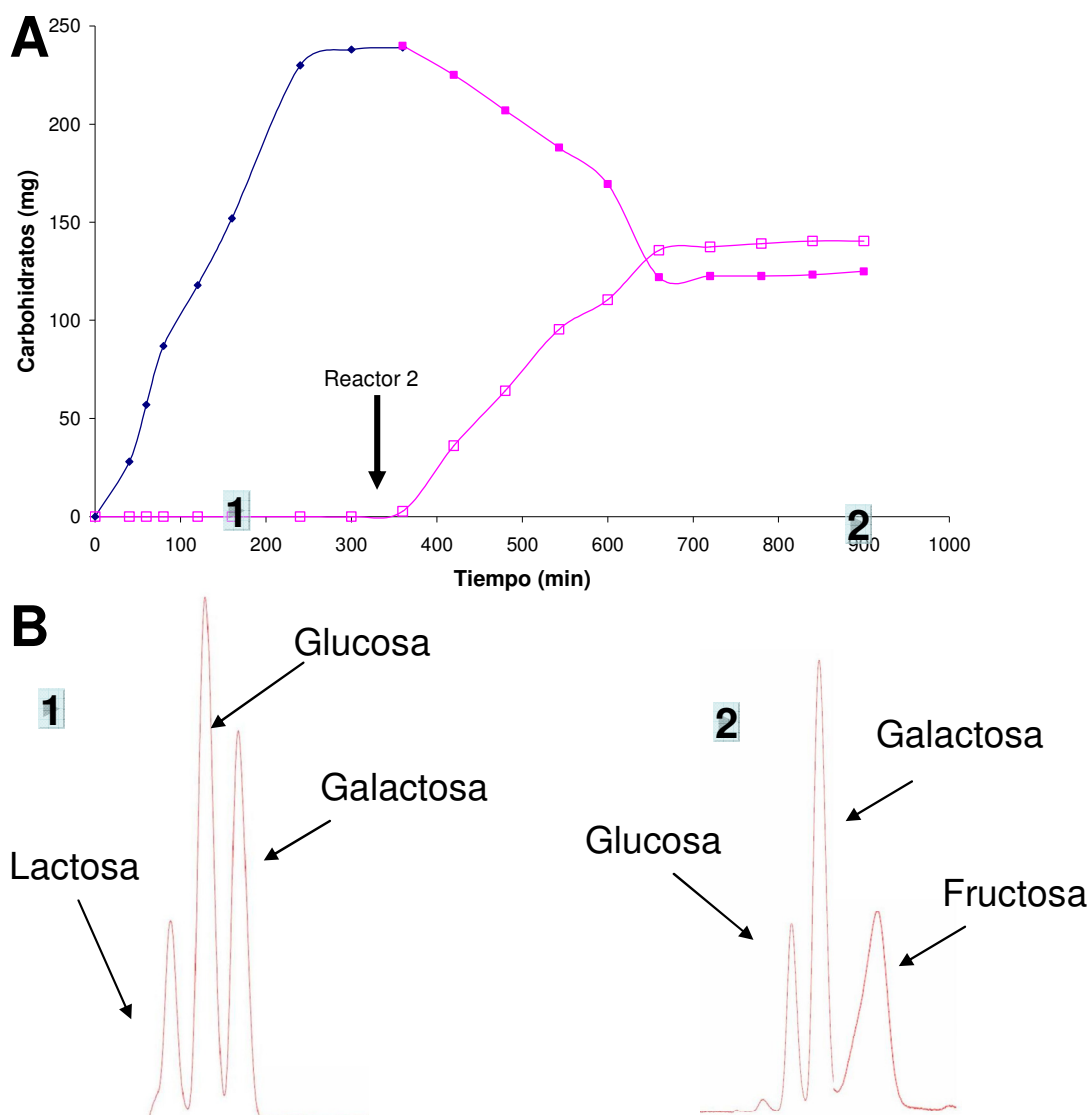
### Proceso secuencial

Los derivados estabilizados de  $\beta$ -galactosidasa se aplicaron a la hidrólisis de lactosa a 50°C en batch usando lactosa 4.6% y suero de queso Mozzarella ajustado a pH 7.0 como sustratos. Luego de la lactolisis, los sueros lactosa-hidrolizados fueron incorporados en un segundo reactor conteniendo D-xilosa (D-glucosa) isomerasa inmovilizada (Fig. 5.55). Se estudió el efecto del pH (en el rango 5.0-8.0) y la temperatura de operación (entre 30 y 60°C) en este segundo reactor.



**Figura 5.55.** Uso de derivados de  $\beta$ -galactosidasa y de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en procesos bi-reactor.

No se evidenció un efecto importante del pH inicial del suero de quesería lactosa-hidrolizado sobre la isomerización. Dado que el pH óptimo de las enzimas difiere en 1.5 unidades, el pH de trabajo seleccionado (7.0) responde a un compromiso entre los pH óptimos de ambas enzimas, para evitar un ajuste de pH intermedio entre las reacciones de lactolisis e isomerización. Respecto a los resultados del procesamiento secuencial con ambas enzimas cuando se empleó suero de Mozzarella como sustrato, se obtuvieron grados de lactolisis cercanos al 89% a 50°C y un cociente fructosa/glucosa de 35% y 52%, operando el segundo reactor a 30°C y 50°C, respectivamente. Los resultados obtenidos a 50°C se muestran en la Fig. 5.56.

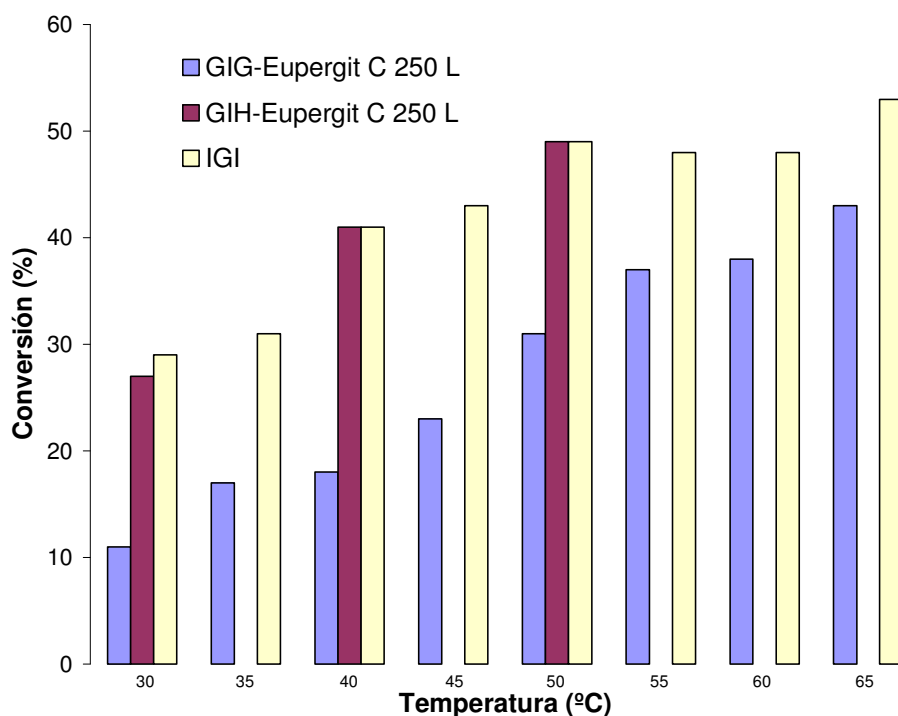


**Figura 5.56. (A) Proceso secuencial de lactolisis (Reactor 1) y posterior isomerización (Reactor 2) de suero de queso Mozzarella a 50°C. ◆ producción de glucosa durante la lactolisis ■ consumo de glucosa durante la isomerización □ producción de fructosa durante la isomerización. (B) Perfiles de HPLC correspondientes a los puntos numerados en (A).**

El mismo proceso efectuado con el empleo de las enzimas en solución arrojó valores de conversión de 89% para la lactolisis y 50% para la isomerización. Los resultados fueron analizados de forma comparativa, considerando los niveles de conversión obtenidos al trabajar con el derivado comercial inmovilizado de Genencor (IGI), la enzima soluble extraída de la preparación IGI y aquella suministrada por Hampton, ambas inmovilizadas en Eupergit C 250 L. Los niveles de conversión alcanzados por los derivados de la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de Hampton inmovilizada en Eupergit C 250 L son comparables a los obtenidos con el derivado comercial IGI entre 30-50°C (Fig. 5.57). El menor nivel de conversión alcanzado con el derivado de la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de Genencor inmovilizada en soportes acrílicos probablemente refleja que el método empleado para obtener la preparación soluble (partiendo del derivado comercial) promueve



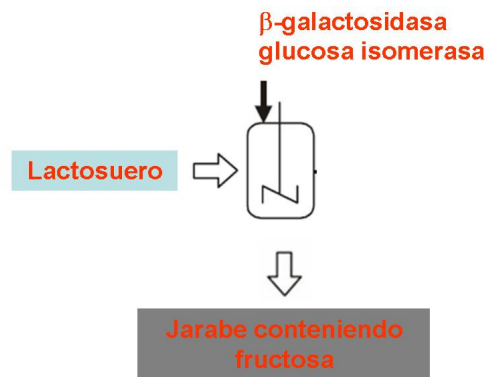
de alguna forma una modificación en las propiedades de la enzima o su estructura cuaternaria, pudiendo este cambio conducir a una menor estabilidad operativa del derivado en Eupergit C 250 L.



**Figura 5.57.** Influencia de la temperatura sobre los niveles de isomerización de D-glucosa alcanzados en procesos secuenciales con suero de Mozzarella lactosa-hidrolizado como sustrato, utilizando los derivados de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa inmovilizada comercial de Genencor (IGI), D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de Genencor inmovilizada en Eupergit C 250 L (GIG-Eupergit C 250 L) y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa de Hampton inmovilizada en Eupergit C 250 L (GIH-Eupergit C 250 L).

#### *Uso simultáneo de los derivados*

Se evaluó el efecto de la operación en un único reactor de las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa, inmovilizadas individualmente en Eupergit C 250 L (Fig. 5.58). Tomando en cuenta que estos derivados fueron estabilizados por unión covalente multipuntual, era previsible una buena estabilidad operativa, incluso en condiciones de uso en sistemas en batch con agitación mecánica. Sin embargo, como se ha visto antes para el caso de la combinación de la acción de  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en sistemas mono-reactor, la operación conjunta provee beneficios adicionales en relación al nivel de conversión, fundamentalmente en el caso de la reacción de lactolisis.



**Figura 5.58. Uso de derivados de  $\beta$ -galactosidasa y de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en procesos mono-reactor.**

En este caso, los derivados  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C 250 L y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa-Eupergit C 250 L se emplearon en procesos de hidrólisis de lactosa e isomerización de glucosa en sueros de quesos Mozzarella y Manchego a pH 7.0 y 50°C (Fig. 5.59), en las mismas condiciones que se emplearon antes con los derivados de  $\beta$ -galactosidasa y de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa. Si bien los dos sustratos utilizados mostraron escasa diferencia en los niveles de conversión alcanzados, se reafirma el mejor desempeño de los derivados cuando se trabaja sobre suero de Mozzarella (el nivel de hidrólisis de lactosa es 10% mayor para este sustrato). Como resultado del procesamiento simultáneo con ambas enzimas se obtuvo un mayor grado de lactolisis, un mayor nivel de conversión en términos de glucosa y una mayor producción de fructosa, aunque sólo ligeramente superior al obtenido en el proceso secuencial, lo cual puede deberse a la menor incidencia de la glucosa como inhibidor de la  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 5.59). También es de destacar la reducción en el tiempo necesario para alcanzar el máximo nivel de conversión en D-fructosa, el cual era de aproximadamente 700 min para el sistema secuencial y que se redujo a la mitad mediante el sistema simultáneo.

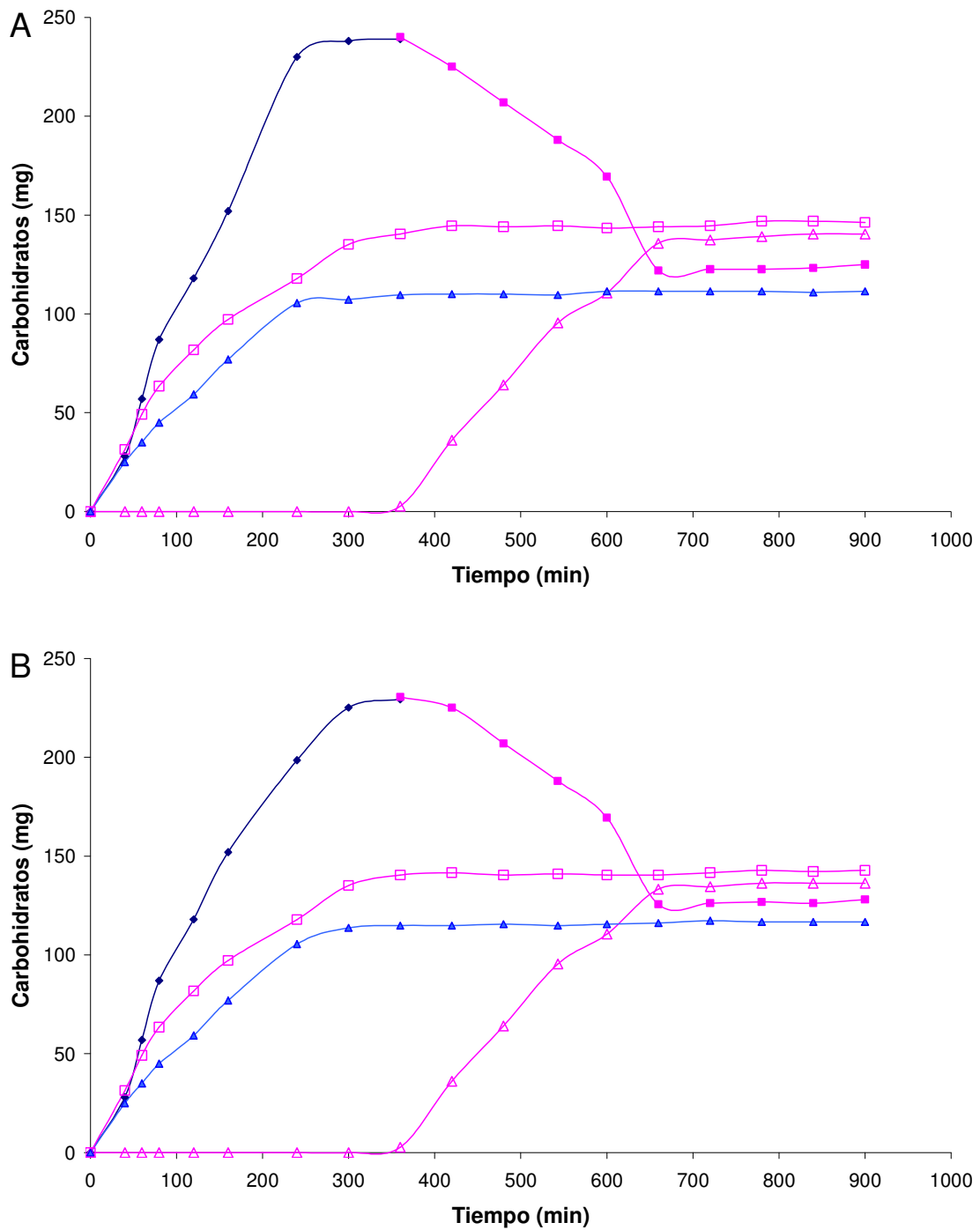


Figura 5.59. Procesamiento secuencial y simultáneo de sueros de queso Mozzarella (A) y Manchego (B) con derivados de  $\beta$ -galactosidasa y de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa.  $\blacklozenge$  producción de glucosa durante la lactolisis en procesos secuenciales  $\blacksquare$  consumo de glucosa durante la isomerización en procesos secuenciales  $\blacktriangle$  producción de glucosa en procesos simultáneos  $\triangle$  producción de fructosa en procesos secuenciales  $\square$  producción de fructosa en procesos simultáneos.

### Coinmovilización

Como forma de reducir al mínimo las limitaciones difusionales durante los procesos de lactolisis e isomerización, las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa fueron

coimmobilizadas en una misma partícula de soporte (Eupergit C 250 L). La coimmobilización se llevó a cabo en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5 durante 24 h a 25°C, empleándose para  $\beta$ -galactosidasa una carga aplicada de 30 mg/g de gel (carga determinada como óptima para esta enzima) y para D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (Hampton) de 2 mg/g de gel. Los derivados estabilizados mediante tratamiento alcalino post-inmovilización (pH 8.5 durante 24 horas) y bloqueo con glicina alcanzaron eficiencias de inmovilización y estabilidades térmicas comparables a aquellas de las enzimas inmovilizadas/estabilizadas individualmente.

Estos biocatalizadores se aplicaron de manera de producir simultáneamente la hidrólisis de lactosa/isomerización de glucosa en suero de Mozzarella a 50°C en sistemas mono-reactor (Fig. 5.60). Como resultado, se mantuvieron muy buenos niveles de conversión, con cocientes fructosa/glucosa de 52%, reduciéndose en aproximadamente una hora el tiempo de reacción necesario para lograr las concentraciones de equilibrio.

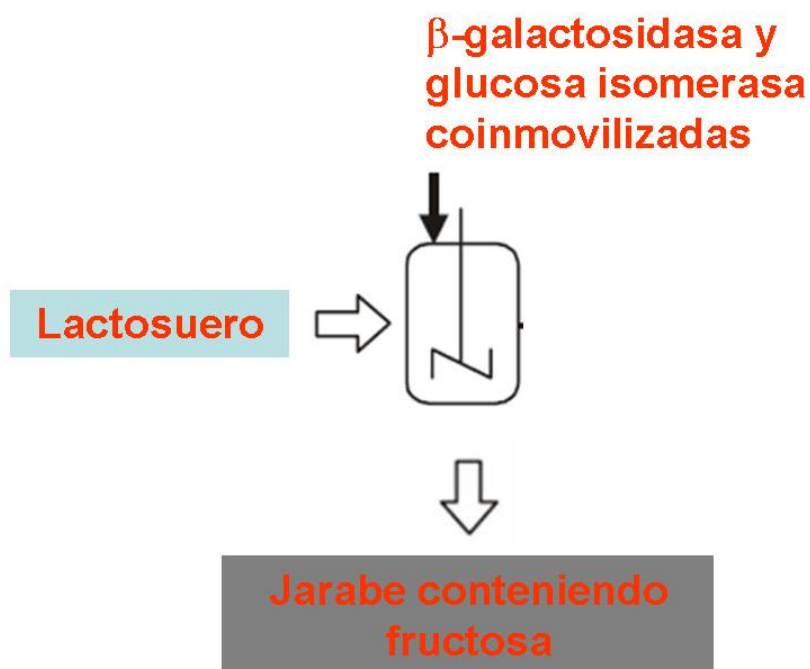
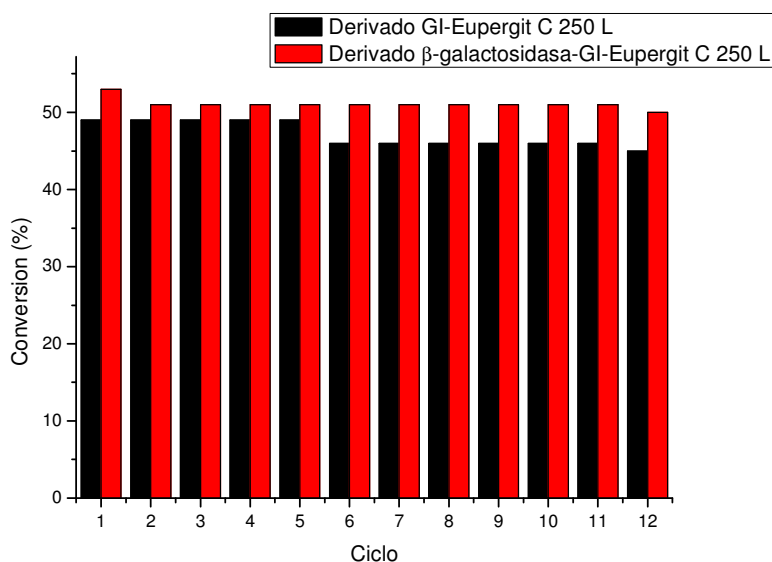


Figura 5.60. Uso de  $\beta$ -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa coimmobilizadas en procesos mono-reactor.

### Reuso de los derivados D-xilosa (D-glucosa) isomerasa

Se estudió la posibilidad de reutilización de los derivados de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa inmovilizada en Eupergit C 250 L y coinmovilizada con  $\beta$ -galactosidasa en este mismo soporte, a lo largo de varios ciclos de operación a 50°C, empleando sueros de Mozzarella lactosa-hidrolizados (proceso secuencial) y suero de queso Mozzarella (procesos simultáneos) como sustratos, respectivamente. Los derivados inmovilizados y coinmovilizados mantuvieron cocientes fructosa/glucosa entre 45-49% y 50-53%, respectivamente, a lo largo de 12 ciclos de operación a 50°C (Fig. 5.61). Es de destacar los mayores niveles de conversión en fructosa alcanzados con el derivado coinmovilizado, así como su mayor estabilidad operativa evidenciada a lo largo de estos



**Figura 5.61.** Reuso de los derivados D-xilosa (D-glucosa) isomerasa-Eupergit C 250 L (GI-Eupergit C 250 L) y  $\beta$ -galactosidasa-D-xilosa (D-glucosa) isomerasa-Eupergit C 250 L ( $\beta$ -galactosidasa-GI-Eupergit C 250 L) en reactores en batch a 50°C, empleando suero de Mozzarella lactosa-hidrolizado (proceso secuencial) y suero de queso Mozzarella (proceso simultáneo) como sustratos, respectivamente. La conversión se expresa como porcentaje de glucosa isomerizada a fructosa.

### Efecto del ion calcio

Se estudió el efecto del ion  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el proceso de isomerización, verificándose su efecto inhibitorio sobre la actividad D-xilosa (D-glucosa) isomerasa (Fig. 5.62). Como se verá más adelante, en especial en relación a algunos sustratos empleados, surge la necesidad de una desmineralización previa de los mismos para mejorar la capacidad de biotransformación de glucosa en fructosa por parte de esta enzima.

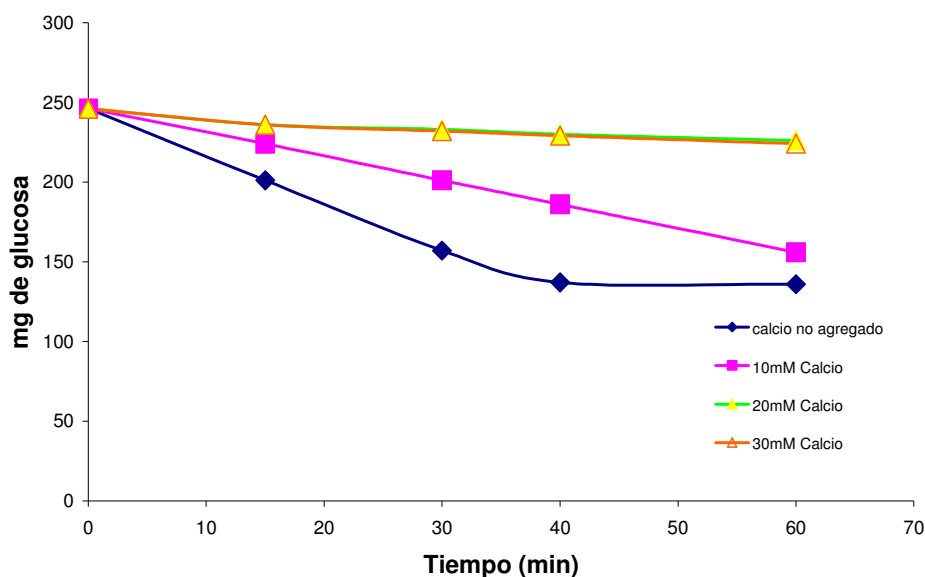


Figura 5.62. Efecto de distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el proceso de isomerización catalizado por D-xilosa (D-glucosa) isomerasa a  $50^\circ\text{C}$  empleando lactosa 4.6% hidrolizada como sustrato.

## 5.5. Sistema trienzimático

En este trabajo se ha alcanzado una importante estabilización térmica de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa, lo que permitió trabajar a temperaturas de  $50^\circ\text{C}$ , favoreciendo el aumento de los cocientes tagatosa/galactosa y fructosa/glucosa en estas condiciones. La operación en un mismo reactor y la coinmovilización revelaron a su vez una serie de ventajas con respecto a otras modalidades de uso de este sistema. La posibilidad de transformar la lactosa del suero de quesería en una mezcla de monosacáridos y la isomerización de los mismos en sus correspondientes cetohexosas, no sólo le provee mayor poder edulcorante al producto sino que elimina muchos obstáculos tecnológicos relacionados con la utilización de la lactosa. Las propiedades prebióticas de la tagatosa refuerzan el interés de esta serie de biotransformaciones. En la etapa final de esta investigación se desarrollaron biocatalizadores en base a la coinmovilización/estabilización de  $\beta$ -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa, los cuales en un proceso mono-reactor fueron capaces de generar la hidrólisis de lactosa, con isomerización parcial de sus productos, galactosa y glucosa, en las correspondientes cetohexosas, tagatosa y fructosa, las cuales aparecen resaltadas en la Figura 5.63.

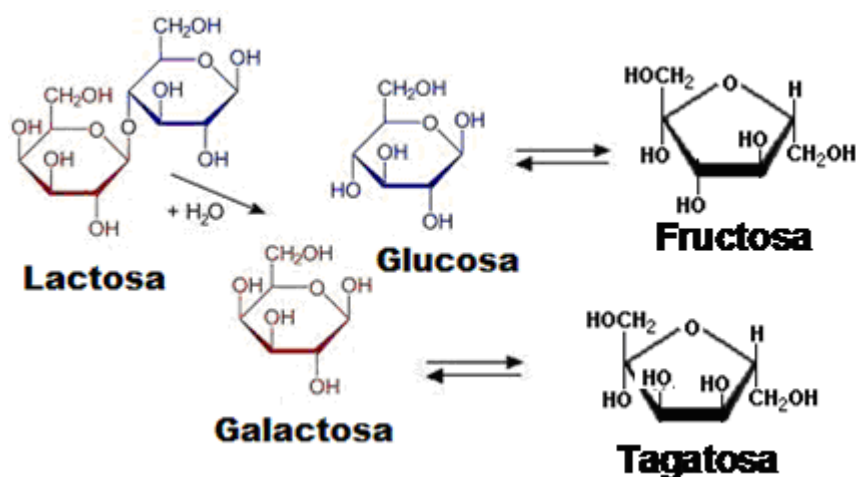


Figura 5.63. Biotransformaciones de la lactosa del suero de quesería (se han resaltado los productos de interés).

### 5.5.1. Inmovilización/estabilización de derivados trienzimáticos

Las enzimas  $\beta$ -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa fueron coimmobilizadas en Eupergit C 250 L (por incubación en amortiguador fosfato de potasio 1.0 M pH 7.5 durante 24 horas a 25°C) y se exploraron las posibilidades de estabilización térmica de estos biocatalizadores mediante dos estrategias post-inmovilización: i- bloqueo de los grupos oxirano remanentes con glicina 3 M; ii- tratamiento alcalino durante 7 o 24 horas a pH 8.5 (para favorecer la unión multipuntual enzima-soporte) y posterior bloqueo con glicina. Se determinó la eficiencia de inmovilización y la estabilidad térmica de los derivados sometidos a ambos tratamientos (Tabla 5.23).

Los derivados sometidos al proceso de bloqueo [estrategia i] retuvieron 91%, 99% y 89% de las actividades  $\beta$ -galactosidasa, D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa inmovilizadas, respectivamente. Sus vidas medias a 50°C fueron de 181, 217 y 93 h, respectivamente, claramente superiores a las correspondientes a las enzimas nativas. Los derivados más termoestables fueron aquellos sometidos a tratamiento alcalino durante 24 horas antes del bloqueo [estrategia ii] con vidas medias a 50°C de 388, 593 y 319 h, respectivamente. Si bien la eficiencia de inmovilización se reduce en todos los casos (Tabla 5.23), las mismas son superiores en los derivados insolubles de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa, incluso superiores a aquellas obtenidas a partir de la inmovilización individual de dicha enzima (Tabla 5.20), reflejando probablemente el efecto de la presencia de otras proteínas (en particular de la preparación de  $\beta$ -galactosidasa), presentes en mayor concentración en la mezcla aplicada. Por su parte este efecto no se evidenció en el caso de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa, probablemente como consecuencia de la mayor sensibilidad de esta enzima (proveniente de una preparación no comercial y altamente purificada) frente al proceso de unión covalente al soporte.

Tabla 5.23. Coinmovilización y estabilización de enzimas en Eupergit C 250 L.

Enzima	Incubación a pH 8.5 (h)	Rendimiento de inmovilización (%)	Eficiencia de inmovilización (%)	Vida media (h)
$\beta$ -Galactosidasa	0 <sup>a</sup>		91 $\pm$ 3	181
	8		85 $\pm$ 3	285
	24		80 $\pm$ 3	388
D-xilosa (D- glucosa) isomerasa	0	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 3	217
	8		95 $\pm$ 3	405
	24		82 $\pm$ 3	593
L-arabinosa (D- galactosa) isomerasa	0		89 $\pm$ 3	93
	8		84 $\pm$ 1	206
	24		79 $\pm$ 3	319

La coinmovilización se realizó incubando 30 U de  $\beta$ -galactosidasa, 2 U de L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y 2 U de D-xilosa (D-glucosa) isomerasa con 1 g del soporte en amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 7.5 durante 24 horas. Las vidas medias fueron determinadas a 50°C. Los resultados son la media de triplicados  $\pm$  SD.

a- Derivado sólo bloqueados.

### 5.5.2. Biotransformación de lactosa

#### *Lactosuero*

Se estudiaron los niveles de productividad alcanzados al trabajar con derivados trienzimáticos estabilizados y sin estabilizar en reactores de tipo batch con suero de Mozzarella. Al analizar la productividad en términos de cetohexosas (fructosa y tagatosa), los derivados estabilizados mostraron productividades más altas (Fig. 5.64). La diferencia en productividad de los derivados estabilizados y sin estabilizar se hace más notoria por encima de los cinco reusos, revelando probablemente la mayor inestabilidad de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa en estas condiciones, lo cual se verificó mediante el seguimiento del proceso por HPLC, comprobando una disminución en la producción de tagatosa desde el quinto ciclo de operación.



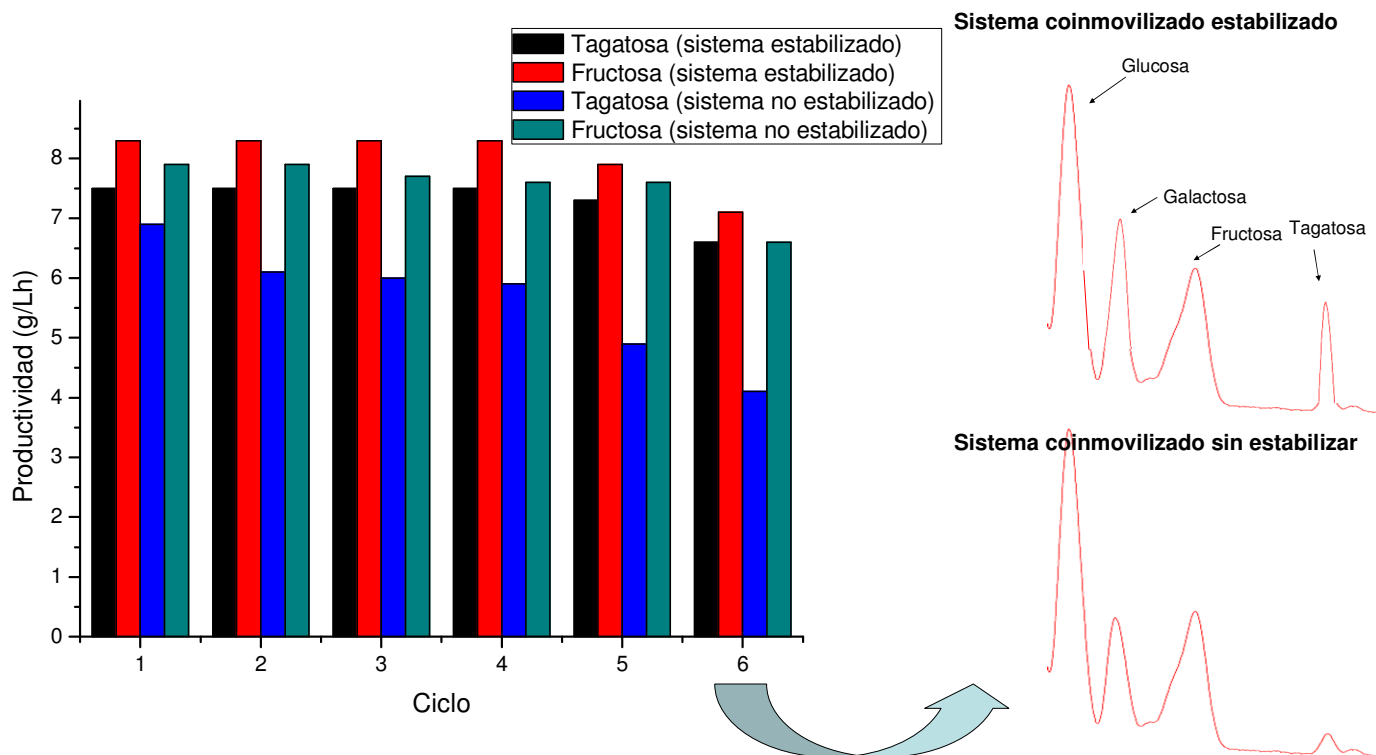


Figura 5.64. Productividades de los sistemas trienzimáticos coinmovilizados, estabilizados y sin estabilizar, y composición de los jarabes luego del sexto ciclo de operación con suero de queso Mozzarella.

Por su parte, se estudió el efecto de la temperatura en el rango 30-60°C sobre el desempeño funcional del derivado trienzimático estabilizado (Tabla 5.24).

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 estabilizado.

Temperatura (°C)	Lactolisis (%)	Tagatosa <sup>a</sup> (%)	Fructosa <sup>a</sup> (%)
30	81	29	36
40	89	39	39
50	100	49	46
60	100	49	53

a- Porcentajes de conversión (D-galactosa en D-tagatosa y D-glucosa en D-fructosa).

Se estudió la cinética del proceso simultáneo de biotransformación de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C en relación al nivel de conversión en cetohechosas, cuando se trabajó con el sistema trienzimático coinmovilizado y con las mismas enzimas inmovilizadas individualmente. Al cabo de 6 horas de operación se alcanzaron porcentajes de tagatosa y fructosa del 31 y 24% (sistema con enzimas inmovilizadas individualmente) y 43 y 30% (sistema coinmovilizado), respectivamente (Tabla 5.25).

**Tabla 5.25. Cinética del proceso simultáneo de biotransformación de lactosa en suero de Mozzarella a 50°C con enzimas inmovilizadas.**

Sistema	Tiempo (h)	Tagatosa <sup>a</sup> (%)	Fructosa <sup>a</sup> (%)
	0	0	0
Simultáneo con enzimas inmovilizadas individualmente	1	10	1
	2	16	7
	3	19	10
	4	21	13
	5	27	19
	6	31	24
	0	0	0
Simultáneo con enzimas coinmovilizadas	1	11	9
	2	19	10
	3	21	13
	4	29	21
	5	39	30
	6	43	30

a- Porcentajes de conversión (D-galactosa en D-tagatosa y D-glucosa en D-fructosa).

El uso de un sistema batch mono-reactor con las enzimas  $\beta$ -galactosidasa, D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa solubles (utilizadas en cantidades y bajo condiciones comparables a aquellas en que se ha aplicado el derivado trienzimático), para la biotransformación de lactosa en suero de quesería reveló que la velocidad de la conversión se incrementó con relación a los sistemas con enzimas inmovilizadas de forma individual o coinmovilizadas. No obstante, este sistema no permite el reuso de los biocatalizadores, lo cual constituye una de sus principales limitaciones. En lo que respecta al nivel de conversión alcanzado, se registró un notorio descenso en términos de cetohechosas durante la operación con enzimas solubles, a expensas de una baja en los niveles de isomerización de galactosa (Fig. 5.65).

El uso de un sistema batch mono-reactor con las enzimas  $\beta$ -galactosidasa, D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa coinmovilizadas, para la biotransformación de lactosa en suero de quesería reveló que se mantuvieron muy buenos niveles de conversión, reduciéndose el tiempo de reacción necesario para lograr las concentraciones de equilibrio con respecto al sistema batch mono-reactor con dichas enzimas inmovilizadas individualmente cuando se utilizan en cantidades y bajo condiciones comparables a aquellas en que se ha aplicado el derivado trienzimático coinmovilizado (Fig. 5.65). Si bien desde el punto de vista de la velocidad de conversión el sistema con enzimas coinmovilizadas no supera al de las enzimas solubles, las primeras están mucho más estabilizadas, lo cual permite desarrollar procesos de operación continua o ciclos de operación más largos o a mayor temperatura, representando una notoria ventaja a favor de los derivados.

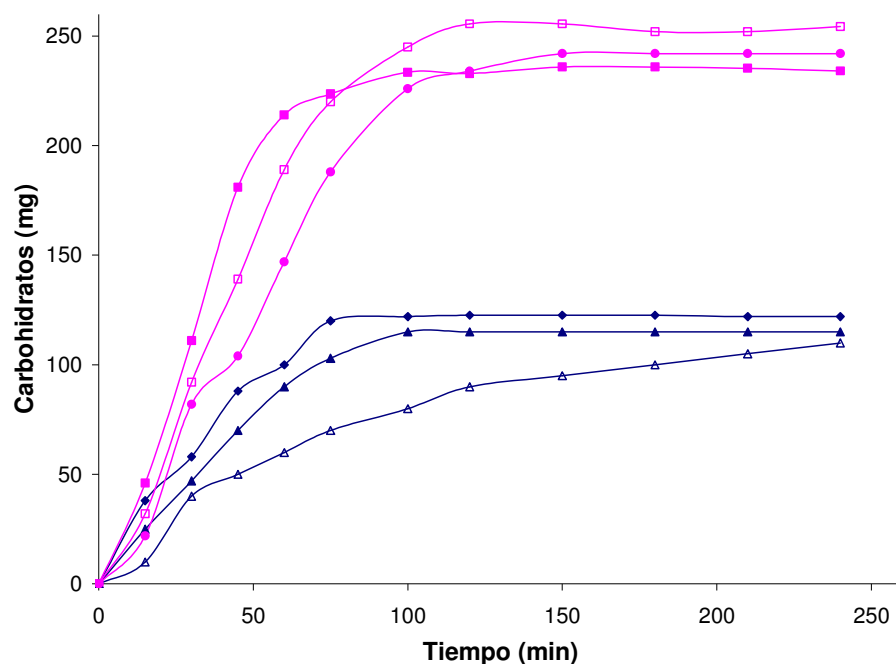
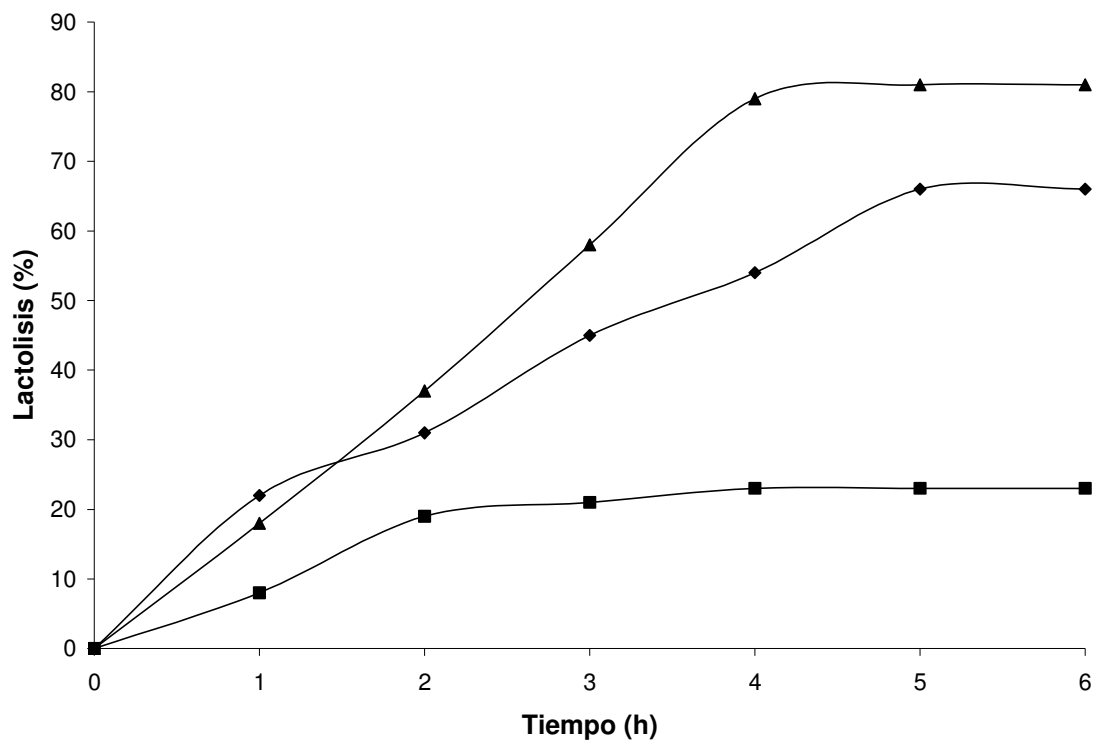


Figura 5.65. Operación de sistemas mono-reactor con  $\beta$ -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa solubles (Sistema 1), inmovilizadas individualmente en Eupergit C 250 L (Sistema 2), o coinmovilizadas (Sistema 3), con suero de Mozzarella a 50°C. Para el sistema 1:  $\blacklozenge$  glucosa  $\blacksquare$  cetohechosas. Para el Sistema 2:  $\triangle$  glucosa  $\bullet$  cetohechosas. Para el sistema 3:  $\blacktriangle$  glucosa  $\square$  cetohechosas.

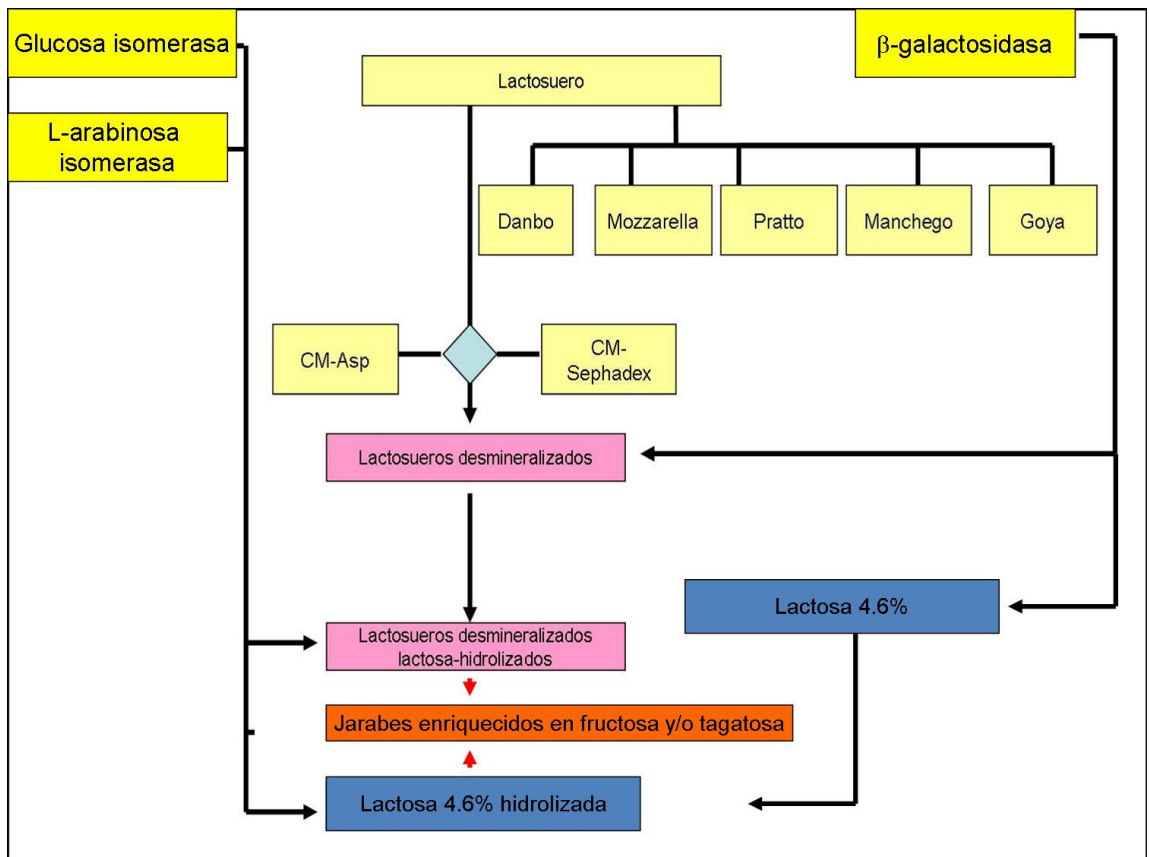
### Nanofiltrado

Se llevaron a cabo procesos de lactolisis a 50°C con derivado estabilizado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C empleando nanofiltrado de sueros de quesería como sustrato. Como consecuencia del elevado contenido en lactosa (20-25% p/p) se aprecia un alto nivel de inhibición cuando se trabaja con el sustrato sin diluir (debido al efecto de la galactosa producida), en tanto que al diluirlo 1/5 los niveles de conversión aumentan a grados comparables a los obtenidos con lactosuero (Fig. 5.66). No obstante estos resultados, el trabajo con nanofiltrados de quesería resulta de gran interés, debido al alto porcentaje de lactosa que contienen y el concomitante aumento en la producción de las cetohechosas de interés que sería posible en estas condiciones.



**Figura 5.66.** Lactolisis de nanofiltrado a 50°C con derivado estabilizado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C. ▲ nanofiltrado diluido 1/5 ◆ nanofiltrado diluido 1/2 ■ nanofiltrado sin diluir.

Un inconveniente adicional en el trabajo con este tipo de sustrato es que el proceso de nanofiltración concentra no sólo el componente lactosa sino además ciertos minerales y en especial el ion calcio. En este sentido, la actividad D-xilosa (D-glucosa) isomerasa es sensible a la concentración de calcio y esto puede en muchos casos llevar a que uno de los componentes del sistema trienzimático no funcione con su máxima eficiencia. Por esta razón, se comparó el efecto del calcio para algunos de los sistemas reseñados, dado que por un lado, el calcio es un componente habitual del suero de quesería y sus nanofiltrados, y por otro, que luego del proceso de entrapamiento en perlas de alginato, el calcio se halla presente a su vez en la composición del biocatalizador. Por este motivo se aplicó al sustrato un procedimiento de desmineralización, teniendo éste dos variantes: desmineralización en una columna de CM-Sephadex y desmineralización en una columna de CM-aspártico-agarosa. La Figura 5.67 muestra una perspectiva de los sustratos sometidos al proceso de desmineralización.



**Figura 5.67. Procesos de desmineralización y tratamientos enzimáticos empleados en este trabajo. CM-Asp: Carboximetil-aspártico-Agarosa.**

La mayor reducción en el nivel de calcio se logró aplicando la segunda estrategia (desmineralización mediante CM-aspártico-agarosa), comprobándose que bajo las condiciones de trabajo sólo una pequeña proporción de las proteínas que se encuentran en lactosueros y nanofiltrados se adsorben a la columna por intercambio iónico y aparecen en los eluidos luego de aplicar EDTA (Tabla 5.26).

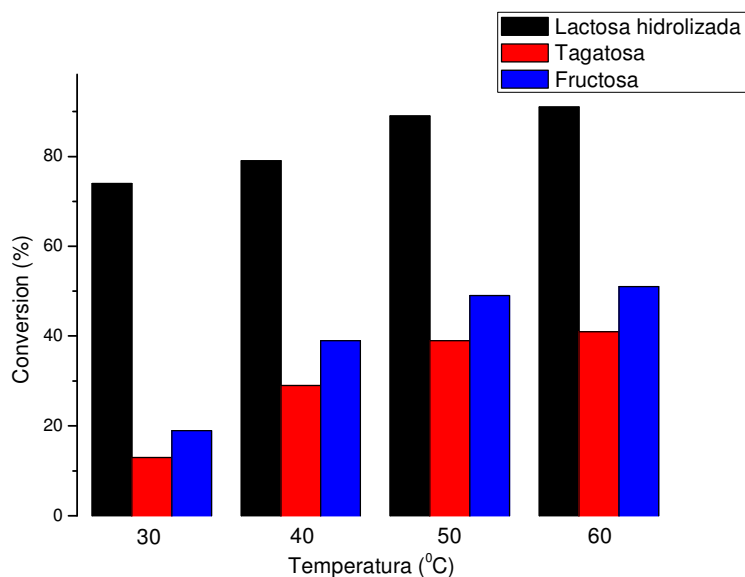
Al emplear el derivado trienzimático  $\beta$ -galactosidasa-LAI-GI-Eupergit C 250 L sobre nanofiltrado desmineralizado en reactores en batch bajo condiciones comparables, los grados de hidrólisis de lactosa fueron significativamente mayores que los registrados con el derivado  $\beta$ -galactosidasa –Eupergit C (Fig. 5.68), incluso con el sustrato sin diluir, lo cual refuerza la hipótesis de la posible reducción de la inhibición de  $\beta$ -galactosidasa por productos, al ser éstos consumidos durante las reacciones catalizadas por las cetoisomerasas.

**Tabla 5.26. Desmineralización de lactosueros de queso Mozzarella, Goya y Manchego y nanofiltrados de suero con CM-aspártico-agarosa.**

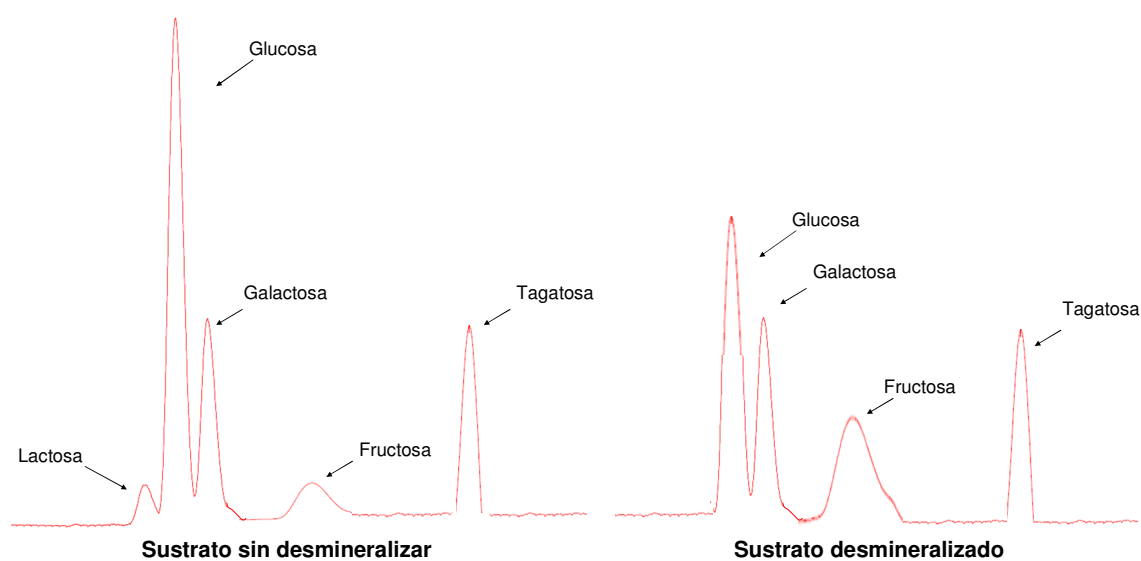
Lactosuero	Fracción	Concentración de Ca <sup>2+</sup> (mg/mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)
Mozzarella	Aplicado	11	7.9
	Desmineralizado	2.3	7.5
	Eluído con EDTA	Nd	0.19
Manchego	Aplicado	9	9.9
	Desmineralizado	1.9	9.1
	Eluído con EDTA	Nd	0.9
Goya	Aplicado	9.1	9.6
	Desmineralizado	2.1	8.9
	Eluído con EDTA	Nd	0.79
Nanofiltrado	Aplicado	32	0.6
	Desmineralizado	2.6	0.3
	Eluído con EDTA	Nd	0.3

nd- no detectado

Por otra parte se estudió el efecto de la temperatura de operación sobre el proceso (Fig. 5.68). La lactosa hidrolizada alcanza un máximo a 50°C. Como se ha visto en el caso de los sistemas bienzimáticos, la producción de tagatosa a 60°C es sólo ligeramente superior al valor obtenido a 50°C. Sin embargo, el nivel de fructosa obtenido responde de manera casi lineal en el intervalo considerado, registrándose aumentos significativos de productividad a 60°C con respecto a 50°C. En suma, la productividad medida como cetohexosas totales a 60°C sufre sólo un leve incremento respecto a la obtenida a 50°C. Teniendo en cuenta la menor estabilidad de la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa a temperaturas por encima de 50°C, se justifica la operación a esta temperatura, donde como se ha visto el nivel de productividad se mantiene a lo largo de 4 ciclos (Fig. 5.64). Para el caso de la operación con nanofiltrado sin desmineralizar, la conversión en fructosa es muy baja, y puede incluso encontrarse un pequeño porcentaje de lactosa residual en el producto final (Fig. 5.69).



**Figura 5.68.** Lactolisis e isomerización de glucosa y galactosa de nanofiltrado desmineralizado con derivado  $\beta$ -galactosidasa-LAI-GI-Eupergit C 250 L, en función de la temperatura. Las conversiones se expresan como porcentaje de lactosa hidrolizada (lactolisis), porcentaje de conversión en tagatosa o fructosa (isomerización por LAI o GI, respectivamente).

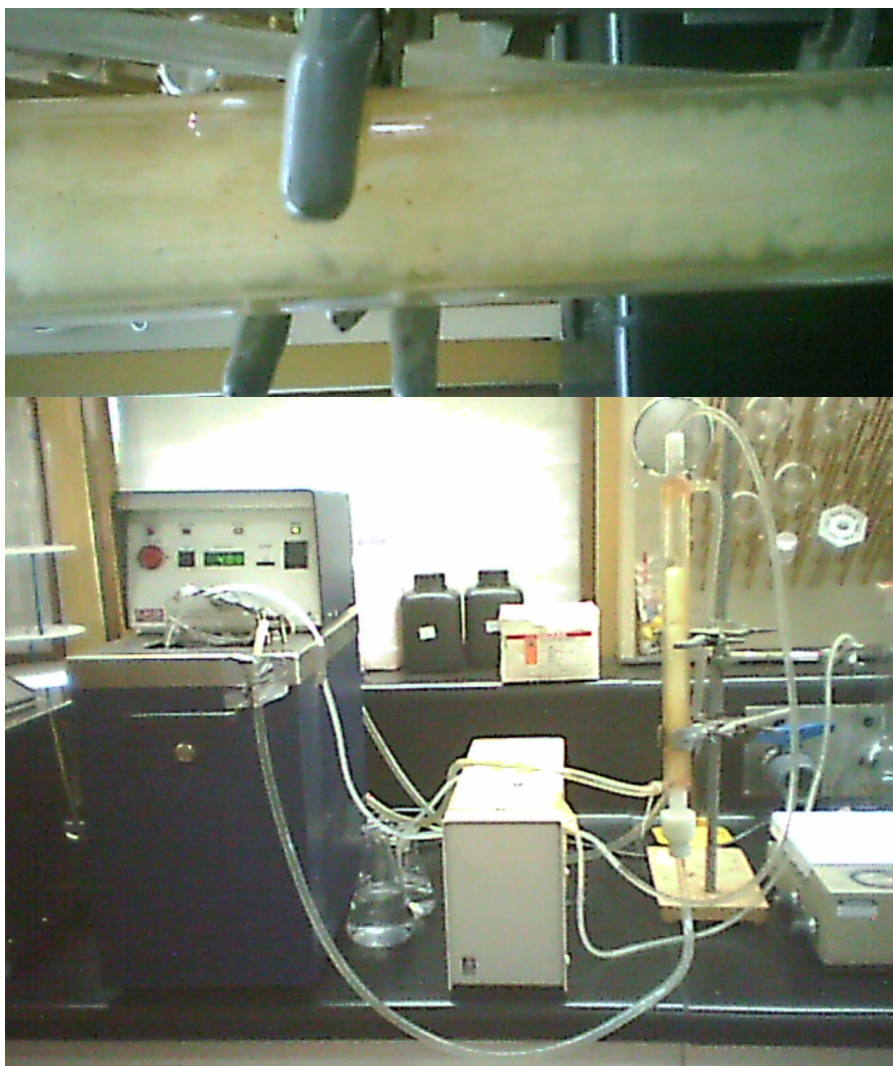


**Figura 5.69.** Seguimiento por HPLC de los procesos de lactolisis e isomerización de glucosa y galactosa de nanofiltrado desmineralizado y sin desmineralizar con derivado  $\beta$ -galactosidasa-LAI-GI-Eupergit C 250 L.

### 5.5.3. Entrampamiento de derivado trienzimático y uso en sistemas de lecho fijo

El biocatalizador en base a  $\beta$ -galactosidasa, L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa coinmovilizadas en Eupergit C 250 L fue entrampado en perlas de alginato de calcio y empacado en un reactor tubular con camisa calefactora, de dimensiones similares al empleado con el derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C entrampado en alginato y se operó en la

modalidad de lecho fijo con recirculación, utilizando lactosuero de queso Mozzarella como sustrato (Fig. 5.70).

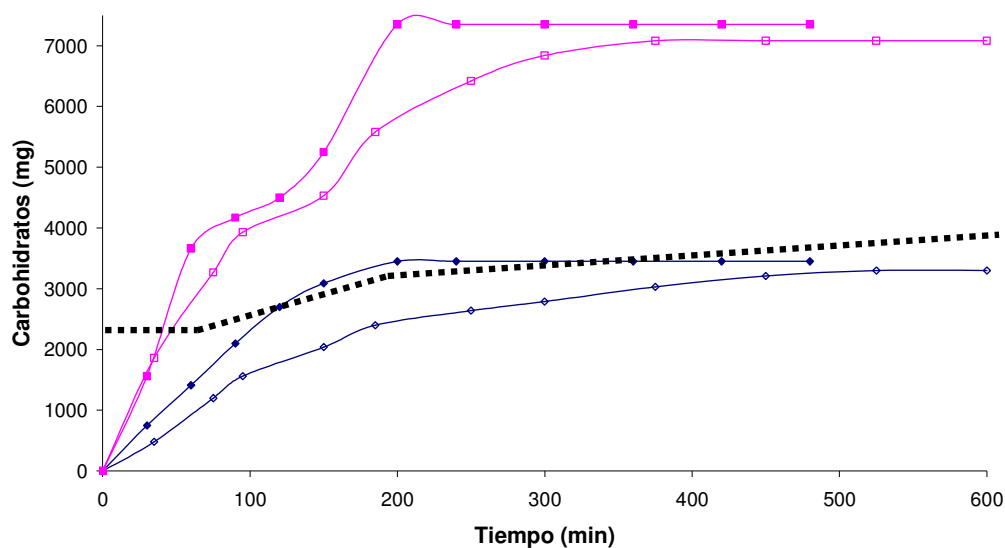


**Figura 5.70. Reactor tubular con camisa calefactora operando en la modalidad de lecho fijo con derivado trienzimático entrampado en perlas de alginato de calcio.**

Se analizó en forma comparativa el comportamiento del sistema conformado por perlas de alginato conteniendo derivado entrampado de las tres enzimas coinmovilizadas en la misma partícula, en relación con el comportamiento del sistema obtenido por entrampamiento de las enzimas inmovilizadas individualmente en distintas partículas. Los tiempos necesarios para alcanzar un estado estacionario del conjunto de reacciones consideradas se redujeron al utilizar el derivado coinmovilizado y entrampado (Fig. 5.71). En relación a la lactolisis, la misma fue notoriamente favorecida desde el punto de vista de la velocidad del proceso como así también el nivel de conversión alcanzado en relación al proceso llevado a cabo en el mismo tipo de reactores con el derivado  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C entrampado y con un sustrato similar (permeado de lactosuero). [Fig. 5.22]



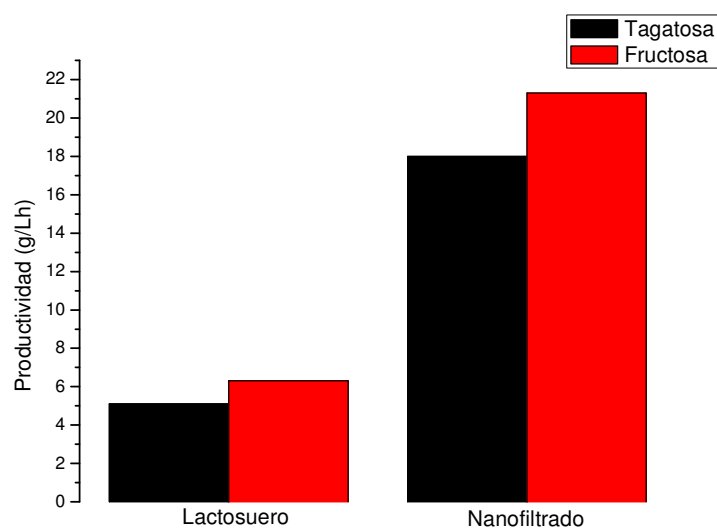
A su vez para ambos sistemas se observó un entrecimiento con reducción en las correspondientes velocidades de producción de cetohexosas, el cual tiene lugar en tiempos intermedios de reacción, coincidiendo con el comienzo de la liberación de calcio desde la partícula de alginato. Este aumento del nivel de calcio puede contribuir a la inhibición de la glucosa isomerasa en estas condiciones, dado que como se ha visto la enzima es altamente sensible al nivel de calcio presente en el medio de reacción, con una reducción muy significativa de su actividad. El análisis por HPLC de muestras tomadas a distintos tiempos de reacción, reveló que en la composición del producto final existió un nivel de fructosa inferior al esperado, y que la menor producción de este azúcar se correlacionaba de manera casi lineal con aquellos tiempos en los que los niveles de calcio se incrementaban. La liberación de calcio desde las partículas de alginato no es un fenómeno continuo en el tiempo, como ya se ha visto, sino que luego de una liberación inicial anterior a las 2-9 horas (variable de acuerdo con las condiciones de pH y composición del medio), la velocidad de liberación de calcio desciende significativamente, lo cual permite el almacenamiento del biocatalizador sin afectación de las propiedades tanto funcionales como mecánicas y reológicas del mismo.



**Figura 5.71.** Operación de un reactor de lecho fijo con derivado trienzimático obtenido por coinmovilización (Sistema 1) o una mezcla de derivados inmovilizados de  $\beta$ -galactosidasa, D-xilosa (D-glucosa) isomerasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa (Sistema 2), entrampados en partículas de alginato de calcio, para la obtención de un jarabe edulcorante a partir de suero de Mozzarella. Para el sistema 1:  $\blacklozenge$  glucosa  $\blacksquare$  cetohexosas. Para el sistema 2:  $\diamond$  glucosa  $\square$  cetohexosas. La línea discontinua representa el nivel relativo de calcio presente en el medio de reacción.

Comparando la productividad del sistema trienzimático coinmovilizado y entrampado cuando se utilizan suero y nanofiltrado desmineralizado como sustratos, puede apreciarse que a pesar de que el proceso de biotransformación fue más lento en el caso del nanofiltrado, se

alcanzaron niveles de conversión comparables en términos de cetohechosas, y en consecuencia la productividad fue considerablemente más alta (Fig. 5.72). Se ha reportado que la operación de un bio-reactor de lecho fijo empacado con el biocatalizador trehalosa sintasa de *Thermus caldophilus* GK 24, con alimentación continua y sin recirculación de sustrato, permite aumentar el nivel de conversión de maltosa en trehalosa en un 16%, gracias a la remoción continua de los subproductos inhibidores generados en el proceso (Cho et al., 2006). En el sistema desarrollado en esta Tesis, a pesar de la recirculación de sustrato, los dos inhibidores de importancia de la  $\beta$ -galactosidasa (galactosa y glucosa), son parcialmente removidos por las actividades cetoisomerasas presentes. El hecho de que la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada sea menos sensible a los niveles de glucosa que la forma soluble de esta enzima, y que la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa no presente inhibición por producto, son otros aspectos importantes en relación a la estrategia de biotransformación descrita.



**Figura 5.72.** Productividad de reactor con derivado trienzimático coinmovilizado en Eupergit C 250 L y entrampado en alginato de calcio, en la obtención de tagatosa y fructosa a partir de suero de Mozzarella y de nanofiltrado de sueros de quesería desmineralizado.

## 6. Conclusiones

Se investigó el proceso de inmovilización covalente de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* en resinas 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.

Los períodos de incubación requeridos para una inmovilización cuantitativa de la enzima a través de enlaces covalentes fueron de 24 horas en el caso de Sepabeads HFA, Eupergit C y Eupergit C 250 L, y de 48 horas para Sepabeads EP.

La inmovilización en soportes convencionales requiere altas fuerzas iónicas (amortiguador fosfato de potasio 1.0-1.4 M) para alcanzar altos rendimientos (98-100%, para cargas enzimáticas no saturantes). En cambio, en el caso del soporte heterobifuncional (Sepabeads HFA) se requieren bajas fuerzas iónicas en virtud del mecanismo de inmovilización en este tipo de soporte. A pesar del menor contenido de grupos epóxido del Sepabeads HFA, una optimización del protocolo de inmovilización (llevando a cabo la adsorción a pH 7.5 y aumentando luego el pH a 8.5 para favorecer la unión covalente) resultó en la obtención de rendimientos cercanos al 100%, comparables con los alcanzados con los demás soportes.

El análisis de las cinéticas de inmovilización reveló la existencia de dos modos diferentes de inactivación en función de la carga enzimática aplicada. A baja carga (en el orden de 3 mg/g de soporte), la ocurrencia de cierto grado de inactivación de la enzima se produce mayormente a consecuencia de la unión al soporte. Sin embargo, a alta carga (en el orden de 120 mg/g de soporte), los soportes convencionales con mayor grado de activación (Sepabeads EP y Eupergit C) muestran un comportamiento diferente al del Sepabeads HFA. Mientras que en el caso de los soportes convencionales la inactivación ocurre mayormente en las fracciones solubles (debido a la alta concentración salina del medio), para Sepabeads HFA la enzima covalentemente unida y la enzima en solución exhibieron bajos niveles de inactivación (como consecuencia de las condiciones de inmovilización más suaves utilizadas en este caso).

Los rendimientos de inmovilización alcanzados en todos los soportes a carga media fueron similares y mayores del 80%. Para estos derivados, los efectos negativos del medio de inmovilización y la unión covalente se minimizan. Por lo cual, además, los mismos exhiben las más altas eficiencias de inmovilización.

El bloqueo de los grupos epóxido remanentes con glicina fue el tratamiento más estabilizante para todos los derivados, pero la estabilización por tratamiento alcalino fue también efectiva en muchos casos.

La estabilidad térmica alcanzada varió en función del agente utilizado para el bloqueo de grupos reactivos remanentes (oxirano), comprobándose que la glicina fue más efectiva que el 2-mercaptoetanol en todos los casos. Los derivados obtenidos a baja carga aplicada, luego del bloqueo, presentaron estabilidades más altas (vidas medias de 80 y 289 h a 50°C para los derivados en Sepabeads EP y Eupergit C, respectivamente) que los correspondientes derivados bloqueados obtenidos a carga aplicada media (21 y 197 h respectivamente). Este hecho podría explicarse en base a diferencias en la intensidad de uniones multipuntuales, la cual depende de la carga enzimática. En concordancia con esto, los derivados a baja carga muestran una mejora poco significativa en su termoestabilidad cuando se someten a tratamiento alcalino previo al bloqueo (estrategia combinada).

La estabilización alcanzada mediante la estrategia combinada fue más efectiva para el caso de los derivados en la matriz Eupergit obtenidos a carga aplicada media (vidas medias de 387 y 385 h a 50°C para los derivados en Eupergit C y Eupergit C 250 L, en comparación con 37 h para los derivados de carga media en Sepabeads EP). En el caso particular de esta enzima, la mayor congruencia geométrica de las matrices Sepabeads no logró superar las limitaciones impuestas por su mayor carácter hidrofóbico en relación al Eupergit. La reducción sustancial en la eficiencia de inmovilización como consecuencia de la incubación alcalina (de 90 a 74%) se vio compensada por una ganancia significativa en estabilidad.

Los valores de la  $K_m$  aparente para lactosa de los derivados fueron 2-3 veces más altos que para la enzima nativa. Cuando la temperatura se incrementó de 30°C a 50°C, la  $K_m$  disminuyó cerca de 3 veces, aumentando por tanto la afinidad de la enzima por su sustrato. Dado que se logró una considerable estabilización térmica de los derivados en Eupergit C, este hecho representa una ventaja considerando la aplicabilidad de estos biocatalizadores a temperaturas en el entorno de 50°C.

Los biocatalizadores desarrollados en base a la inmovilización y estabilización de  $\beta$ -galactosidasa en Eupergit C y Eupergit C 250 L a cargas aplicadas medias se seleccionaron para realizar ensayos de hidrólisis de lactosa en sueros de quesería. Estos biocatalizadores exhibieron buenas estabilidades operativas, térmicas y mecánicas. La enzima inmovilizada llevó a cabo la bioconversión eficiente de la lactosa del suero de quesería a escala de laboratorio, tanto en procesos en batch (alcanzando 95% de hidrólisis de lactosa) como en procesos en columna con recirculación

de sustrato (80% de conversión). La capacidad de estos derivados de actuar sobre diversos sueros de quesería (Danbo, Goya, Manchego, Pratto, Mozzarella) demuestra su gran versatilidad.

Los derivados  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C y  $\beta$ -galactosidasa-Eupergit C 250 L mostraron estabildades operacionales promisorias cuando se aumentó la escala de trabajo, bajo las mismas condiciones, pudiéndose alcanzar conversiones de lactosa en lactosuero y permeado de lactosuero del 77-92%.

Por su parte, los biocatalizadores desarrollados en base a  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* a través de su inmovilización covalente y estabilización en soportes acrílicos y posterior entrapamiento en perlas de alginato, exhibieron adecuadas propiedades funcionales para la bioconversión de lactosa en lactosueros y permeados, alcanzando niveles de conversión de 81-95%.

El entrapamiento en alginato no generó retardos difusionales, mostrando los derivados buena estabilidad mecánica en las condiciones de operación. La estrategia de entrapado de los derivados de  $\beta$ -galactosidasa en partículas acrílicas en geles de alginato proporciona nuevas aplicaciones para estos derivados enzimáticos, evitando los inconvenientes relacionados con el reducido tamaño de las partículas acrílicas comerciales utilizadas en su inmovilización.

Durante este trabajo de Tesis se desarrolló además la producción de una L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa a partir de un cultivo de la bacteria *Enterococcus faecium* DBFIQ E36. Luego de haber ensayado diferentes técnicas de purificación del extracto crudo obtenido, incluyendo precipitación salina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de afinidad, se pudo concluir que el protocolo en dos pasos combinando precipitación salina con sulfato de amonio seguida de cromatografía de afinidad en el bioadsorbente L-arabitol-agarosa, permitió una adecuada purificación de la enzima (con factores de purificación de aproximadamente 755 veces y rendimientos en el entorno de 40%).

Estudios estructurales combinando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (MALDI-TOF) permitieron concluir que la enzima es un homotetrámero de 224 kDa. Los estudios de caracterización de la enzima revelaron propiedades bioquímicas tecnológicamente interesantes, entre las que podemos mencionar: la baja constante de Michaelis-Menten para D-galactosa ( $K_m$  de 34 mM a 50°C), la alta actividad enzimática a pH alcalinos y la no inhibición por producto. La enzima resultó muy sensible a cationes divalentes, en especial  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , necesarios para lograr una máxima actividad enzimática. El efecto sinérgico de los iones  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  en concentraciones definidas (0.75 mM y 0.25 mM, respectivamente) permitió aumentos de aproximadamente 30 veces en la actividad con respecto a un control sin suplementar con iones. Por su parte el bario demostró

ser un inhibidor potente de la enzima, la cual resulta completamente inactiva en presencia de 1 mM de BaCl<sub>2</sub>. Adicionalmente, la pérdida de actividad como consecuencia del proceso de liofilización fue inferior al 10%.

Las enzimas L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa se inmovilizaron y estabilizaron en los soportes Eupergit C y Eupergit C 250 L, lográndose mayores niveles de estabilización térmica que para el caso de la  $\beta$ -galactosidasa. La afinidad de las enzimas por sus respectivos sustratos a 50°C se mantuvo en el mismo orden de magnitud tras la inmovilización (así por ejemplo la  $K_m$  de la L-arabinosa isomerasa inmovilizada en Eupergit C 250 L fue de 40 mM para D-galactosa). Las correspondientes  $V_{m\acute{a}x}$  experimentaron a su vez disminuciones que no superaron el 40% en todos los casos. Los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  resultaron más elevados para el caso de los derivados en Eupergit C 250 L, probablemente como consecuencia de menores impedimentos difusionales, dada la estructura más macroporosa de este soporte en relación al Eupergit C.

En este trabajo se han desarrollado distintos sistemas enzimáticos para la biotransformación de la lactosa presente en sueros de quesería y nanofiltrado de sueros haciendo uso de las tres enzimas mencionadas, habiéndose estudiado los efectos de distintas variables sobre el proceso así como la operación en diferentes configuraciones de bio-reactor. La estabilización térmica de los derivados enzimáticos permitió trabajar a una temperatura de 50°C, seleccionada para alcanzar mayores niveles de conversión en las reacciones de hidrólisis de lactosa e isomerización de los productos. Los sistemas bienzimáticos en base a  $\beta$ -galactosidasa y L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa y  $\beta$ -galactosidasa y D-xilosa (D-glucosa) isomerasa mostraron una reducción en los niveles de inhibición de la actividad lactásica por galactosa y glucosa, respectivamente. El sistema bienzimático para el cual se logró el mayor nivel de lactólisis fue aquel en el que participó la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa como uno de sus componentes.

La coinmovilización y estabilización de las tres enzimas en una misma partícula acrílica, permitió obtener rendimientos y eficiencias de inmovilización así como termoestabilidades comparables a los alcanzados para la inmovilización de cada una de las enzimas por separado. A su vez, el análisis químico (glucosa y cetohechosas totales) y cromatográfico (HPLC) demostró que se alcanzaron muy buenos niveles de conversión durante la operación en batch en un único reactor con suero de Mozzarella (44% para tagatosa y 53% para fructosa, correspondientes a más de 20% y casi 25% en términos de carbohidratos totales). 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  $\beta$ -galactosidasa. De esta manera se logró alcanzar la hidrólisis completa de lactosa en sueros de quesería, permitiendo de este modo aumentar los niveles de conversión en términos de cetoheptosas.

Al transformar parcialmente la lactosa del suero de quesería en una mezcla de monosacáridos, se genera un producto con mayor poder edulcorante y se eliminan muchos obstáculos tecnológicos relacionados con la utilización de la lactosa. El atrapamiento de los derivados trienzimáticos permitió desarrollar el proceso de biotransformación en mayor escala y operando en reactores de lecho fijo.

En el sistema trienzimático desarrollado en esta Tesis, los dos inhibidores de importancia de la  $\beta$ -galactosidasa (galactosa y glucosa), fueron parcialmente removidos por las actividades de las correspondientes cetoisomerasas, y a pesar de la recirculación de sustrato, se consigue una lactólisis completa en sueros, y altos valores de conversión en nanofiltrados desmineralizados, demostrando la eficacia del sistema desarrollado, la cual se evidencia en los niveles de productividad alcanzados. El hecho de que la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada sea menos sensible a los niveles de glucosa, y que la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa no presente inhibición por producto, son otros aspectos importantes en relación a la estrategia de biotransformación presentada.

## 7. Futuras perspectivas

La investigación desarrollada en esta tesis es un primer eslabón en el desarrollo de sistemas enzimáticos compuestos por  $\beta$ -galactosidasa y un conjunto de cetoisomerasas, habiéndose seleccionado en esta instancia a la L-arabinosa isomerasa y la D-xilosa isomerasa dado su potencial en la transformación del principal carbohidrato del lactosuero en productos de interés. Las perspectivas de este trabajo, aún circunscribiéndonos a las tres enzimas mencionadas, son bastante amplias, y se refieren tanto al posible uso individual de cada una como a su uso combinado en sistemas bi- o trienzimáticos.

Una posible aplicación de la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada y estabilizada desarrollada en este trabajo es en la síntesis de galactósidos y galactooligosacáridos (GOS), dado que esta enzima en particular presenta características diferenciales respecto a lactasas de otras fuentes empleadas con estos fines. Los enlaces glicosídicos formados entre dos o más unidades galactosa son preferentemente  $\beta$ -(1,4) cuando se emplea la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, frente a la preferencia por enlaces  $\beta$ -(1,6) de las  $\beta$ -galactosidasas de *Aspergillus oryzae* o *Streptococcus thermophilus*. Asimismo, la enzima de *Bacillus circulans* produce mayoritariamente oligosacáridos de más de tres unidades poliméricas a diferencia de las enzimas de *Aspergillus niger* y *Kluyveromyces lactis* que tienden a formar fundamentalmente trisacáridos.

A su vez la L-arabinosa (D-galactosa) isomerasa puede emplearse en forma individual para la producción de D-tagatosa o L-ribulosa, y la D-xilosa (D-glucosa) isomerasa en forma combinada con otras enzimas en la producción de etanol o jarabes edulcorantes a partir de residuos conteniendo hemicelulosas o almidón, respectivamente. En lo relativo a la producción de estas dos cetoisomerasas sería de interés coproducir ambas enzimas a partir del cultivo del mismo microorganismo. No obstante, hay que tener presente que la mayor parte de las bacterias aisladas de leche y productos lácteos no expresan o expresan una forma no activa de la D-xilosa isomerasa. En este sentido, el género *Bacillus* se presenta como una alternativa razonable para la coproducción de ambas cetoisomerasas.

La profundización de los estudios de biotransformación de nanofiltrados de suero de quesería, así como la mejora de las condiciones de operación de los bio-reactores empleados, constituye otro punto importante en el marco de futuras aplicaciones, en paralelo con la posibilidad de modificar el pH óptimo y la estabilidad de los derivados enzimáticos para posibilitar la operación a pH ácidos, donde se ha comprobado que la reacción de producción de cetoheptosas presenta menos inconvenientes tecnológicos. Esta estabilización operativa a pH ácidos permitiría



evitar el ajuste de pH de los sustratos (en especial el nanofiltrado), así como el aprovechamiento de la galactosa residual en el yogur o en productos lácteos deslactosados, dado que podría resultar de interés la presencia de tagatosa en estos alimentos de alto consumo, tanto con funciones edulcorantes como tomando en cuenta sus efectos prebióticos.

La generación de microambientes en el entorno de las moléculas enzimáticas inmovilizadas que favorezcan la catálisis enzimática y mejoren la estabilidad térmica, operativa, etc., de los biocatalizadores bajo distintas condiciones será otro de los objetivos a futuro en el desarrollo de este trabajo. A su vez sería de interés poder llevar a cabo la inmovilización en condiciones menos exigentes que permitan una menor pérdida de actividad, incluso trabajando a cargas aplicadas elevadas. La combinación de estas estrategias con métodos de modificación química de la estructura de la proteína eventualmente permitirían aumentar la termoestabilidad de la L-arabinosa isomerasa, que se ha revelado como la enzima más termolábil de las utilizadas en este trabajo. El entrampamiento de los derivados coinmovilizados trienzimáticos que han sido desarrollados genera nuevas perspectivas también en relación al estudio de sus potenciales aplicaciones.

La evaluación sensorial de los jarabes de lactosueros obtenidos, es otro aspecto importante que se estudiará en el futuro. Finalmente, resultaría de interés la purificación de la cetohexosa de alto valor D-tagatosa, lo cual podría realizarse por medios químicos, cromatográficos o bien mediante la acción selectiva de microorganismos específicos.

### ***El presente trabajo de Tesis ha dado origen a las siguientes publicaciones:***

Torres, P., Batista-Viera, F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. J. Mol. Catal. B: Enzym. 74 (2012) 230-35.

Torres, P., Batista-Viera, F. Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: applications in whey processing. J. Mol. Catal. B: Enzym. 83 (2012) 57-64.

Torres, P., Mammarella, E., Regenhardt, S., Batista-Viera, F., Rubiolo, A. Hidrólisis enzimática de lactosa en leche y permeados de lactosuero con  $\beta$ -galactosidasa (*Bacillus circulans*) inmovilizada en resinas acrílicas entrampadas en una matriz de alginato. In: Fontecha, J., Recio, I., y Pilosof, A.M.R. (comp.). Funcionalidad de componentes lácteos. Editorial Universidad Miguel Hidalgo. Elche, España, (2009) pp. 1-24.

## Referencias

- Abian, O., Wilson, L., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., Re, D., Tam, A., Daminati, M. Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules. New enzyme derivatives to be used in any reaction medium. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19-20 (2002) 295-303.
- Abian, O., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Improving the industrial production of 6-APA: enzymatic hydrolysis of penicillin G in the presence of organic solvents. *Biotechnol. Progress* 19 (2003) 1639-42.
- Alkhatim, H.S., Alcaina, M.I., Soriano, E., Iborra, M.I., Lora, J., Arnal, J. Treatment of whey effluents from dairy industries by nanofiltration membranes. *Desalination* 119 (1998) 177-84.
- Alptekin, O., Tükel, S.S., Yildirim, D., Alagöz, D. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 64 (2010) 177-183.
- Alptekin, O., Tükel, S.S., Yildirim, D., Alagöz, D. Covalent immobilization of catalase onto spacer-arm attached modified florisil: characterization and application to batch and plug-flow type reactor systems. *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 547-54.
- Álvaro, G., Fernández-Lafuente, R., Blanco, R.M., Guisán, J.M. Stabilizing effect of penicillin G sulfoxide, a competitive inhibitor of penicillin G acylase: its practical applications. *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991) 210-214.
- Anantharaman, V., Aravind, L. Diversification of catalytic activities and ligand interactions in the protein fold shared by the sugar isomerases, eif2B, DeoR transcription factors acyl-CoA transferases and methenyltetrahydrofolate synthetase. *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 823-42.
- Arica, M.Y., Hasirci, V. Immobilization of glucose oxidase: a comparison of entrapment and covalent bonding. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 58 (1993) 287-292.
- Arica, M.Y., Senel, S., Alaeddinoglu, N.G., Patir, S., Denizli, A. Invertase immobilized on spacer-arm attached poly(hydroxyethyl methacrylate) membrane: preparation and properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 75 (2000) 1685-1692.
- Arica, M.Y., Bayramoğlu, G., Bıçak, N. Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochem.* 39 (2004) 2007-2017.
- Arroyo, M. Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica* 39 (1998) 23-39.
- Aslan, Y., Tanriseven, A. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 45 (2007a) 73-77.
- Aslan, Y., Tanriseven, A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. *Biochem. Eng. J.* 34 (2007b) 8-12.

Asraf, S.S., Gunasekaran, P. Current trends of  $\beta$ -galactosidase research and application. In: A. Méndez-Vilas (Ed.). Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology (2010) 880-890.

Atia, K.S., Co-immobilization of cyclohexanone monooxygenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase onto polyethyleneimine-porous agarose polymeric composite using  $\gamma$  irradiation to use in biotechnological processes. Radiation Phys. Chem. 73 (2005) 91-9.

Bainor, A., Chang, L., McQuade, M.J., Webb, B., Gestwicki, J.E. Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. Anal. Biochem. 410 (2011) 310-312.

Bakken, A.P., Hill, C.G. Jr., Amundson, C.H. Use of novel immobilized  $\beta$ -galactosidase reactor to hydrolyze the lactose constituent of skim milk. Biotechnol. Bioeng. 36 (1990) 293-309.

Bakken, A.P., Hill, C.G. Jr., Amundson, C.H. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized  $\beta$ -galactosidase (*Bacillus circulans*). Biotechnol. Bioeng. 39 (1992) 408-17.

Bär, A. (2004) D-Tagatose. Dossier. Bioresco.

Barbosa, O., Ortiz, C., Torres, R., Fernández-Lafuente, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: enantiospecific production of atenolol acetate. J. Mol. Catal. B: Enzym. 71 (2011) 124-132.

Bayraktar, H., Serilmez, M., Karkas, T., Celem, E.B., Onal, S. Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA. International J. Biol. Macromol. 49 (2011) 855-60.

Beadle JR, Saunder JP, Wajada TJ (1992) Process for manufacturing tagatose. US Patent 5,078,796.

Bellezza, F., Cipiciani, A., Quotadamo, M.A. Immobilization of myoglobin on phosphate and phosphonate grafted-zirconia nanoparticles. Langmuir 21 (2005) 11099–11104.

Bernal, C., Sierra, L, Mesa, M. Improvement of thermal stability of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. J. Mol. Catal. B: Enzym., in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.05.023>

Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. J. Biotechnol. 121 (2006a) 284-9.

Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. Enzyme Microb. Technol. 39 (2006b) 877-882.

Bezbradica, D., Mijin, D., Mihailovic, M., Knezevic-Jugovic, Z. Microwave-assisted immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports. J. Chem. Technol. Biotechnol. 84 (2009) 1642-48.

Bhattacharjee, M. Cloning, expression, characterization and immobilization of carbonyl reductase from *Candida parapsilosis*. Doctoral Thesis, Faculty of Mathematics, Informatics, and Natural Sciences, RWTH Aachen University, Germany, 2006.

Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* 60 (1996) 280-300.

Blanco, R.M., Guisán, J.M. Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachment: trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system. *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 227-232.

Blanco, R.M., Calvete, J.J., Guisán, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine) agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989a) 353-59.

Blanco, R.M., Guisán, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989b) 360-66.

Bolívar, J.M., Wilson, L., Ferratotti, S.A., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C. Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose. *J. Biotechnol.* 125 (2006) 85-94.

Bolívar, J.M., Wilson, L., Ferratotti, S.A., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., Mateo, C. Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 540-46.

Bolívar, J.M., Mateo, C., Rocha-Martín, J., Cava, F., Berenguer, J., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports. *Enzyme Microb. Technol.* 44 (2009a) 139-44.

Bolívar, J.M., Rocha-Martín, J., Mateo, C., Cava, F., Berenguer, J., Veja, D., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 58 (2009b) 158-63.

Bolívar, J.M., López-Gallego, F., Godoy, C., Rodrigues, D.S., Rodrigues, R.C., Batalla, P., Rocha-Martín, J., Mateo, C., Giordano, R.L.C., Guisán, J.M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose at mild pH values: new strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009c) 477-83.

Bolívar, J.M., Mateo, C., Grazú, V., Carrascosa, A.V., Pessela, B.C.C., Guisán, J.M. Heterofunctional supports for the one step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports. *Process Biochem.* 45 (2010) 1692-98.

Boller T., Meier C., Menzler S. Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit to biocatalysis. *Organic Process Res. Dev.* 6 (2002) 509-519.

- Boon, M.A., Janssen, A.E.M., van't Riet, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2000) 271–281.
- Bor, Y.-C., Moraes, C., Lee, S.-P., Crosby, W.L., Sinskey, A.J., Batt, C.A. Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* encoding xylose isomerase. *Gene* 114 (1992) 127-31.
- Borgi, M.A., Srih-Belguith, K., ben Ali, M., Mezghani, M., Tranier, S., Haser, R., Bejar, S. Glucose isomerase of the *Streptomyces* sp. SK strain: purification, sequence analysis and implication of alanine 103 residue in the enzyme thermostability and acidotolerance. *Biochimie* 86 (2004) 561-568.
- Boudebouze, S.S., Maguin, E., Rhimi, M. Bacterial L-arabinose isomerases: industrial application for D-tagatose production. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences* 5 (2011) 194-201.
- Brena B., Batista-Viera F. Enzyme Immobilization Methods 1965-1995: a literature survey. In: J.M. Guisán, *Methods in Biotechnology (Vol. 22): Immobilization of enzymes and cells*, 2nd Edition (2006) 15-30. Totowa: Humana Press Inc.
- Byrne E., Fitzpatrick J. Investigation of how agitation during precipitation and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of  $\alpha$ -lactalbumin enriched whey protein precipitates. *Biochem. Eng. J.* 10 (2002) 17-25.
- Cabrera, Z., Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Asymmetric hydrolysis of dimethyl 3-phenylglutarate catalyzed by Lecitase Ultra: effect of the immobilization protocol on its catalytic properties. *Enzyme Microb. Technol.* 43 (2008) 531-6.
- Cabrera-Padilla, R.Y., Pinto, G.A., R.L.C. Giordano, R.C. Giordano. A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. *Process Biochem.* 44 (2009) 269-276.
- Calik, P., Angardi, V., Haykir, N.I., Boyaci, I.H. Glucose isomerase production on a xylan-based medium by *Bacillus thermoantarcticus*. *Biochem. Eng. J.* 43 (2009) 8-15.
- Cao, L. Immobilized enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 217-26.
- Celem, E.B., Onal, S. Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabeads EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 61 (2009) 150-56.
- Cerdobbel, A., Desmet, T., De Winter, K., Maertens, J., Soetaert, W. Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by multipoint covalent attachment. *J. Biotechnol.* 150 (2010) 125-130.
- Chakravorty, M. Induction and repression of L-arabinose isomerase in *Lactobacillus plantarum*. *Biochim. Biophys. Acta* 85 (1964) 152-161.
- Cheetham PSJ, Wootton AN. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. *Enzyme Microb Technol* 15 (1993) 105–108.
- Chen, Y.-M., Hsu, R.-S., Lin, H.-C., Chang, S.-J., Chen, S.-C., Lin, J.-J. Synthesis of acrylic copolymers consisting of multiple amine pendants for dispersing pigment. *J. Colloid and Interface Sci.* 334 (2009) 42-9.

Cheng, L., Mu, W., Jiang, B. Thermostable L-arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterisation. *J. Sci. Food Agric.*, 90 (2010a) 1327.

Cheng, L., Mu, W., Zhang, T., Jiang, B. An L-arabinose isomerase from *Acidothermus cellulolyticus* ATCC 43068: cloning, expression, purification, and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86 (2010b) 1089.

Chiyanzu, I., Cowan, D.A., Burton, S.G. Immobilization of *Geobacillus pallidus* RAPc8 nitrile hydratase (NHase) reduces substrate inhibition and enhances thermostability. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 63 (2010) 109-115.

Cho, Y.-J., Park, O.-J., Shin, H.-J. Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trehalose. *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 108-113.

Chouayekh, H., Bejar, W., Rhimi, M., Jelleli, K., Mseddi, M., Bejar, S. Characterization of an L-arabinose isomerase from the *Lactobacillus plantarum* NC8 strain showing pronounced stability at acidic pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 277 (2007) 260-67.

Clouet, F., Bergamini, T., Brossas, J. Coupling of hydroxycinnamic acids to epoxy-activated Sepharose 6B. *J. Chromat.* 362 (1986) 125-131.

Cowan, D.A., Fernández-Lafuente, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 326–346.

Creamer, L.K., Pearce, L.E., Hill, J.P., Boland, M.J. Milk and dairy products in the 12st. century. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 7187-7193.

Cristiani-Urbina, E, Netzahuatl-Muñoz, AR, Manríquez-Rojas, EJ, Juárez-Ramírez, C, Ruiz-Ordaz, N, Galindez-Mayer, J. Batch and feed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochem.* 35 (2000) 649-657.

Damnjanovic, J.J., Zuza, M.G., Savanovic, J.K., Bezbradica, D.I., Mijin, D.Z., Boskovic-Vragolovic, N., Knezevic-Jugovic, Z.D. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 75 (2012) 50-59.

Dauter, Z., Dauter, M., Hhemker, J., Witzel, H., Wilson, K.S. Crystallization and preliminary assays of glucose isomerase from *Streptomyces albus*. *FEBS Lett.* 247 (1989) 1-8.

De Man JD, Rogosa M, Sharpe ME. Medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23 (1960) 130-135.

Demirhan, E., Apar, D.K., Ozbek, B. Effect of hydrolysis product and Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions on whey lactose and β-galactosidase stability. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 625-636.

Dische, Z.; Borenfreund, E. A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses. *J. Biol. Chem.* 192 (1951) 583-587.

- Donner, T. W.; Wilber, J. F.; and Ostrowsky, D. D-Tagatose, a Novel Hexose: Acute Effects on Carbohydrate Tolerance in Subjects with and Without Type 2 Diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 1 (1999) 285–291.
- Dyal, A., Loos, K., Noto, M., Chang, S.W., Spagnoli, C., Shafi, K.V.P.M., Ulman, A., Cowman, M., Gross, R.A. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on  $\gamma$ -FeO<sub>3</sub> magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1684–1685.
- Erhardt, F.A., Jördening, H.-J. Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*. *J. Biotechnol.* 131 (2007) 440-47.
- Fernandes, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res.* 2010 (2010) 1-19.
- Fábián, P., Asbóth, B., Náray-Szabó, G. The role of electrostatics in the ring opening step of xylose isomerase catalysis. *J. Molec. Struct.* 307 (1994) 171-8.
- Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Mateo, C., Penzol, G., Hernández-Justiz, O., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Guisán, J.M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 7 (1999) 181-189.
- Fernández-Lafuente, R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009) 405-18.
- Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Mateo, C., Guisán, J.M. Engineering of enzymes via immobilization and post-immobilization techniques: preparation of enzyme derivatives with improved stability in organic media. *Methods in non-aqueous enzymology*. In: Gupta, M.N. *Methods and tools in biosciences and medicine* (2000). Birkhauser Verlag AG, pp. 36-51.
- Fernández-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernández-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisán, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalyst properties. *Process Biochem.* 43 (2008) 1061-67.
- Filho, M., Pessela, B.C.C., Mateo, C., Carrascosa, A.V., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Immobilization-stabilization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: selection of the optimal immobilization strategy. *Enzyme Microb. Technol.* 42 (2008) 265-71.
- Gaikwad, S.M., Deshpande, V.V. Immobilization of glucose isomerase on Indion 48-R. *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 855-858.
- Gaikwad, S.M., Rao, M.B., Deshpande, V.V. Structure-function relationship of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*: evidence for the occurrence of inactive dimer. *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 155-57.
- Galvao, C.M.A., Pinto, G.A., Jesus, C.D.F., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolysis of cheese whey. *J. Food Eng.* 91 (2009) 109-117.

- Gárdonyi, M., Hahn-Hagerdal, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 32 (2003) 252-259.
- Ghatge, M.S., Phadatare, S.U., Bodhe, A.M., Deshpande, V.V. Unfolding and refolding of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces* sp. NCIM 2730. *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 323-27.
- Ghazi, I., Gómez de Segura, A., Fernández-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Plou, F.J., Ballesteros, A. Immobilization of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 35 (2005) 19-27.
- Giacomini C., Villarino A., Franco Fraguas L., Batista-Viera F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 4 (1998) 313-327.
- Giacomini, C., Irazoqui, G., Batista-Viera, F., Brena, B.M. Influence of immobilization chemistry on the properties of immobilized  $\beta$ -galactosidase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11 (2001) 597-606.
- Gindler M., King J.D. Rapid colorimetric determination of calcium in biologic fluids with methylthymol blue. *Amer. J. Clin. Path.* 58 (1972) 376-382.
- Giordano, R.C., Ribeiro, M.P.A., Giordano, R.L.C. Kinetics of  $\beta$ -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 27-41.
- Givry, S.F., Bliard, C., Duchiron, F. Selective ketopentose analysis in concentrated carbohydrate syrups by HPLC. *Carbohydrate Res.* 342 (2007) 859-64.
- Givry, S.F., Duchim, C. Optimization of culture medium and growth conditions for production of L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase by *Lactobacillus bifementans*. *Microbiol.* 77 (2008) 281-87.
- Goedl, C., Schwartz, A., Minani, A., Nidetzky, B., Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: characterization, kinetics studies of transglucosylation and application of immobilized enzyme for production of  $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate. *J. Biotechnol.* 129 (2007) 77-86.
- Gombotz, W.R., Wee, S.F. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Delivery Rev.* 31 (1998) 267-85.
- Gómez de Segura, A., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., López-Cortés, N., Ballesteros, A., Plou, F.J. Immobilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C supports. *Biotechnol. Progress* 20 (2004) 1414-1420.
- Gong, P.J., Yu, J.H., Sun, H.W., Hong, J., Zhao, S.F., Xu, D.M., Yao, S.D. Preparation and characterization of OH-functionalized magnetic nanogels under UV irradiation. *J. Appl. Polym. Sci.* 101 (2006) 1283-1290.



- Gram, J., de Bang, M., Villadsen, J. An automated glucose isomerase reactor system with online flow injection analyzers for monitoring of pH, glucose and fructose concentrations. *Chem. Eng. Sci.* 45 (1990) 1031-42.
- Granström, T.B., Takata, G., Tokuda, M., Izumori, K. Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars. *J. Biosci. Bioeng.* 97 (2004) 89-94.
- Grazú V., Abian O., Mateo C., Batista-Viera F., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromol.* 4 (2003) 1495-1501.
- Grazú, V., López-Gallego, F., Montes, T., Abian, O., González, R., Hermoso, J.A., García, J.L., Mateo, C., Guisán, J.M. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. *Process Biochem.* 45 (2010) 390-98.
- Grosova, Z., Rosenberg, M., Rebroš, M. Perspectives and applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food industry. A review. *Czech J. Food Sci.* 26 (2008) 1-14.
- Grulich, M., Marsalek, J., Kyslik, P., Stepanek, V., Kotik, M. Production, enrichment and immobilization of a metagenome-derived epoxide hydrolase. *Process Biochem.* 46 (2011) 526-532.
- Hall, C.E., Karboune, S., Florence, H., Kermasha, S. Immobilization of an enzymatic extract from *Penicillium camemberti* containing lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 52-53 (2008) 88-95.
- Hartley, B.S., Nalón, N., Jackson, R.J., Rangarajan, M. Glucose isomerase; insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochim. Biophys. Acta* 1543 (2000) 294-335.
- Heath EC, Horecker BL, Smyrniotis PZ, Takagi Y. Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*: II. L-arabinose isomerase. *J Biol Chem* 231 (1958) 1031-1037.
- Heckly RJ. Preservation of microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 24 (1978) 1-53.
- Henley S., Sadana T. Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.* 28 (1986) 1277-1285.
- Henley S., Sadana T. Graphical determination of mean activation theory energy and standard deviation in a microheterogeneity model of enzyme deactivation. *Biotechnol. Bioeng.* 34 (1989) 916-923.
- Henrick, K., Collyer, C.A., Blow, D.M. Structures of D-xilose isomerase from *Arthrobacter* strain B3728 containing the inhibitors xylitol and D-sorbitol at 2.5 Å and 2.3 Å resolution, respectively. *J. Mol. Biol.* 208 (1989) 129-57.
- Hernaiz M.J., Crout D.H.G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* and an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 27 (2000) 26-32.
- Hernández, K., Fernández-Lafuente, R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 107-22.

- Hernández, K., García-Galán, C., Fernández-Lafuente, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 72-78.
- Hernández, K., Fernández-Lafuente, R. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl-Sepabeads: a very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide. *Process Biochem.* 46 (2011) 873-78.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J.A. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Res.* 101 (2011) 196-204.
- Hidalgo, A., Betancor, L., López-Gallego, F., Moreno, R., Berenguer, J., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Design of an immobilized preparation of catalase from *Thermus thermophilus* to be used in a wide range of conditions: structural stabilization of a multimeric enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 278-85.
- Hildebrand, F., Lütz, S. Immobilization of alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* and its application in a plug-flow reactor. *Tetrahedron: Asymm.* 17 (2006) 3219-3225.
- Hlima, H.B., Aghajari, N., Ali, M.B., Haser, R., Bejar, S. Engineering glucose isomerase from *Streptomyces* sp. SK is resistant to  $Ca^{2+}$  and  $Co^{2+}$  independent. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012) 537-546.
- Ho, N.W.Y. Rosenfeld, S., Stevis, P., Tsao, G.T. Purification and characterization of the D-xylose isomerase gene from *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 5 (1983) 417-420.
- Hong, J., Gong, P., Xu, D., Dong, L., Yao, S. Stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *J. Biotechnol.* 128 (2007a) 597-605.
- Hong, Y.-H., Lee, D.-W., Lee, S.-J., Choe, E.-A., Kim, S.-B., Lee, Y.-H., Cheigh, C.-I., Pyun, Y.-R. Production of D-tagatose at high temperatures using immobilized *Escherichia coli* cells expressing L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnol. Lett.* 29 (2007b) 569-74.
- Hoppe, N., Higgins, N. Ultrafiltration. In J.G. Zadow, *Whey and lactose processing.* (pp. 118-210). New York: Elsevier, 1992.
- Huerta, L.M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., Illanes, A. Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochem.* 46 (2011) 245-252.
- Hughes, S.R., Moser, B.R., Robinson, S., Cox, E.J., Harmsen, A.J., Friesen, J.A., Bischoff, K.M., Jones, M.A., Pinkelman, R., Bang, S.S., Tasaki, K., Doll, K.M., Qureshi, N., Liu, S., Saha, B.C., Jackson, J.S., Cotta, M.A., Rich, J.O., Caimi, P. Synthetic resin-bound truncated *Candida antarctica* lipase B for production of fatty acid alkyl esters by transesterification of corn and soybean oils with ethanol or butanol. *J. Biotechnol.* 159 (2012) 69-77.

- Husain, Q., Ansari, S.A., Alam, F., Azam, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 37–43.
- Ibrahim OO, Spradlin JE (2000) Process for manufacturing D-tagatose. US Patent 6057135.
- Illanes, A., Altamirano, C., Fuentes, M., Zamorano, C., Aguirre, C. Síntesis of cephalixin in organic medium at high substrate concentration and low enzyme to substrate ratio. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 35 (2005a) 45-51.
- Illanes, A., Rodríguez, F., Bahamondes, C., Altamirano, C. Determination of lumped kinetic parameters and their thermal dependence for the synthesis of cephalixin with immobilized penicillin acylase in organic medium. *Biochem. Eng. J.* 24 (2005b) 209-215.
- Illanes, A. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic J. Biotechnol.* 14 (2011).
- Irazaqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Brena, B.M., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Jimeno, M.L. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 11302–11307.
- Iyer, P.V., Ananthanarayan, L. Enzyme stability and stabilization –aqueous and non aqueous environment. *Process Biochem.* 43 (2008) 1019–1032.
- Izumori K., Ueda Y, Yamanaka K. Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: comparison of L-arabinose isomerases induced by L-arabinose and D-galactose. *J Bacteriol* 133 (1978) 413–414.
- Izumori K, Miyoshi T, Tokuda S, Yamabe K. Production of D-tagatose from dulcitol by *Arthrobacter globiformis*. *Appl Environ Microbiol* 46 (1984) 1055–1057.
- Izumori K, Tsuzaki K. Production of D-tagatose from D-galactitol by *Mycobacterium smegmatis*. *J Ferment Bioeng* 66 (1988) 225–227.
- Izumori, K. Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwiss.* 89 (2002) 120-4.
- Jørgensen, F., Hansen, O. C., Stougaard, P. Enzymatic conversion of D-Galactose to D-Tagatose: Heterologous Expression and Characterisation of a Thermostable L-Arabinose Isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64 (2004) 816.
- Jung, E.-S., Kim, H.-J., Oh, D.-K. Tagatose production by immobilized recombinant *Escherichia coli* cells containing *Geobacillus stearothermophilus* L-arabinose isomerase mutant in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Progress* 21 (2005) 1335-40.
- Kahraman, M.V., Bayramoglu, G., Kayaman-Apohan, N., Güngör, A.  $\alpha$ -amylase immobilization of functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chem.* 104 (2007) 1385-1392.
- Kamerke, C., Pattky, M., Huhn, C., Elling, L. Synthesis of UDP-activated oligosaccharides with commercial  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* under microwave irradiation. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 79 (2012) 27-34.

- Karboune, S., Neufeld, R., Kermasha, S. Immobilization and biocatalysis of chlorophyllase in selected organic solvents systems. *J. Biotechnol.* 120 (2005) 273-83.
- Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* 11 (1993) 471-478.
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M. Eupergit, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10 (2000) 157-176.
- Kerstens-Hilderson, H., Callens, M., van Opstal, O., Vangrype, W., de Bruin, C.K. Kinetic characterization of D-xylose isomerases by enzymatic assays using D-sorbitol dehydrogenase. *Enzyme Microb. Technol.* 9 (1987) 145-148.
- Khalilpour, R., Roostazad, R. Development and verification of a model to describe an immobilized glucose isomerase packed bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 40 (2008) 328-336.
- Khan, S., Lindahl, S., Turner, C., Karlsson, E.N. Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 80 (2012) 28-38.
- Kim, P., Yoon, S.-H., Roh, H.-J., Choi, J.-H. High production of D-tagatose, a potential sugar substitute, using immobilized L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Progress* 17 (2001) 208-10.
- Kim, B.-C., Lee, Y.-H., Lee, H.-S., Lee, D.-W., Choe, E.-A., Pyun, Y.-R. Cloning, expression and characterization of L-Arabinose Isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-Galactose to D-Tagatose using the enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.*, 212 (2002) 121.
- Kim, J.-W., Kim, Y.-W., Roh, H.-J., Kim, H.-Y., Cha, J.-H., Park, K.-H., Park, C.-S. Production of tagatose by a recombinant thermostable L-arabinose isomerase from *Thermus* sp. IM6501. *Biotechnol. Lett.* 25 (2003a) 963-967.
- Kim, H.-J., Ryu, S.-A., Kim, P., Oh, D.-K. A feasible enzymatic process for D-tagatose production by an immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Progress* 19 (2003b) 400-4.
- Kim, P. Current Studies on Biological Tagatose Production using L-Arabinose Isomerase: a Review and Future Perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 (2004) 243-249.
- Kim, H.-J., Oh, D.-K. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose. *J. Biotechnol.* 120 (2005) 162-73.
- Kim HJ, Kim JH, Oh HJ, Oh DK. Characterization of a mutated *Geobacillus stearothermophilus* L-arabinose isomerase that increases the production rate of D-tagatose. *J Appl Microbiol* 101 (2006a) 213-221.
- Kim, J., Grate, J.W., Wang, P. Nanostructures for enzyme immobilization. *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006b) 1017-26.

- Kim JH, Prabhu P, Jeya M, Tiwari MK, Moon HJ, Singh RK, Lee JK. Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85 (2010) 1839-1847.
- Klibanov, A. M., Ahern, T. J. Thermal stability of proteins. In: Protein Engineering (Oxender, D. L., & Fox, C. F., Eds.) pp 213-218, Alan R. Liss, New York, 1987.
- Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., Prodanovic, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by covalent attachment. *Biochem. Eng. J.* 30 (2006) 269-78.
- Kovalevsky, A.Y., Hanson, L., Fisher, S.Z., Mustyakimov, M., Mason, S.A., Forsyth, V.T., Blakeley, M.P., Keen, D.A., Wagner, T., Carrell, H.L., Katz, A.K., Glusker, J.P., Langan, P. Metal ions roles and the movement of hydrogen during reaction catalyzed by D-xylose isomerase: a joint X-ray and neutron diffraction study. *Structure* 18 (2010) 688-99.
- Kuroiwa, T., Shoda, H., Ichikawa, S., Sato, S., Mukataka, S. Immobilization and stabilization of pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* by a multipoint attachment method using activated agar gel support. *Process Biochem.* 40 (2005) 2637-2642.
- Larimer, F., Land, M. Annotation of the draft genome assembly of *Enterococcus faecium* DO. EMBL/GenBank/DDBJ databases. Entrada: EMBL EAN10296.1. (2005)
- Lee, D.-W., Jang, H.-J., Choe, E.-A., Kim, B.-C., Lee, S.-J., Kim, S.-B., Hong, Y.-H., Pyun, Y.-R. Characterization of a Thermostable L-Arabinose (D-Galactose) Isomerase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (2004) 1397.
- Lee, D.-W., Choe, E.-A., Kim, S.-B., Eom, S.-H., Hong, Y.-H., Lee, S.-J., Lee, H.-S., Lee, D.-Y., Pyun, Y.-R. Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose isomerases from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 434 (2005a) 333-43.
- Lee, D.-W., Hong, Y.-H., Choe, E.-A., Lee, S.-J., Kim, S.-B., Lee, H.-S., Oh, J.-W., Shin, H.-H., Pyun, Y.-R. A thermodynamic study of mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic L-arabinose isomerases: the effect of divalent metal ions on protein stability at elevated temperatures. *FEBS Lett.* 579 (2005b) 1261-66.
- Lee SJ, Lee DW, Choe EA, Hong YH, Kim SB, Kim BC, Pyun YR. Characterization of a thermoacidophilic L-arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: role of Lys-269 in pH optimum, *Appl Environ Microbiol* 71 (2005c) 888-896
- Levin, G.V. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *J. Med. Food* 5 (2002) 1-19.
- Li, T., Li, S., Wang, N., Tain, L. Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chem.* 109 (2008) 703-8.
- Li, Y., Zhu, Y., Liu, A., Sun, Y. Identification and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose production. *Extremophiles* 15 (2011) 441-450.

- Liang, M., Chen, M., Liu, X., Zhai, Y., Liu, X., Zhang, H., Xiao, M., Wang, P. Bioconversion of D-galactose to D-tagatose: continuous packed bed reaction with an immobilized thermostable L-arabinose isomerase and efficient purification by selective microbial degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1469-1474.
- Lim, B.-C., Kim, H.-J., Oh, D.-K. Tagatose production with pH control in a stirred tank reactor containing immobilized L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149 (2008) 245-53.
- Lindén, T., Hahn-Hägerdal, B. Activity and stability of xylose isomerase preparations from whole cells of *Lactobacillus brevis* in spent sulfite liquor. *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 321-5.
- Long, Z., Xu, J., Pan, J. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase and catalytic resolution of Trans-3-(4'-methoxyphenyl)glycidic acid methyl ester. *Chin. J. Catal.* (2007) 175-179.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl-acylase: stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads. *J. Biotechnol.* 111 (2004) 219-27.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on Sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method *Enzyme Microb. Technol.* 37 (2005a) 750-56.
- López-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazú, V., Betancor, L., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *J. Biotechnol.* 116 (2005b) 1-10.
- Lu, Y.; Levin, G. V.; Donner, T. W. Tagatose, a New Antidiabetic and Obesity Control Drug. *Diabetes Obes. Metab.* 10 (2008) 109-134.
- Mahoney R., Adamchuk C. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.* 45 (1980) 962-964 y 968.
- Mammarella E.J., Rubiolo A.C. Response Surface Methodology to Optimize  $\beta$ -Galactosidase Immobilization Using a Combination of Hydrocolloids as the Supporting Matrix. *Biotech. Progress* 12 (1996) 612-617.
- Manjasetty, B.A., Chance, M.R. Crystal structure of *Escherichia coli* L-arabinose isomerase (ECAI), the putative target of biological tagatose production. *J. Mol. Biol.* 360 (2006) 297-309.
- Manzoni M, Rollini M. Bioconversion of D-galactitol to tagatose by acetic acid bacteria. *Process Biochem* 36 (2001) 971-977.
- Martín, M.T., Plou, F.J., Alcalde, M., Ballesteros, A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of immobilized biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 21 (2003) 299-308.

- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2000a) 509-15.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Multifunctional epoxy-supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromol.* 1 (2000b) 739-45.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Predoche, J., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., Tam, A., Daminati, M. Epoxy Sepabeads: a novel epoxy-support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 629–634. 447
- Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, D., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J.M., Betancor, L., Pessela, B.C.C., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromol.* 4 (2003) 772–777.
- Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazú, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb. Technol.* 37 (2005) 456-462.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazú, V., López-Gallego, F., Pessela, B.C.C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006a) 274-80.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pessela, B.C.C., Grazú, V., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Immobilization-stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment on supports activated with epoxy-groups. In: J.M. Guisán, *Methods in Biotechnology (Vol. 22): Immobilization of enzymes and cells*, 2nd Edition (2006b) 47-55. Totowa: Humana Press Inc.
- Mateo C., Grazú V., Pessela B., Montes, T., Palomo, J., Torres, R., López-Gallego F., Fernández-Lafuente R., Guisán J. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007a) 1593-1601.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity by immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007b) 1451-63.
- Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Archelas, A., Guisán, J.M., Furstoss, R. Preparation of a very stable immobilized *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. *Tetrahedron: Asymm.* 18 (2007c) 1233-38.
- Matioli, G., de Moraes, F.F., Zanin, G.M. Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Acta Scientiarum* 25 (2003) 7-12.

Mendes, A.A., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C., de Castro, H.F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: application of the biocatalyst in biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68 (2011) 109-115.

Mendoza, M. R.; A. Olano, A.; Villamiel, M. Chemical Indicators of Heat Treatment in Fortified and Special Milks. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2995–2999.

Mezghani, M., Borgi, M.A., Kammoun, R., Aouissaoui, H., Bejar, S. Construction of a new stable strain over-expressing the glucose isomerase of the *Streptomyces* sp. SK strain. *Enzyme Microb. Technol.* 37 (2005) 735-38.

Mielgo, I., Palma, C., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J.M. *Enzyme Microb. Technol.* 32 (2003) 769-775.

Miletic, N., Rohandi, R., Vukovic, Z., Nastasovic, A., Loos, K. Surface modification of macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization. *React. Funct. Polymers* 69 (2009a) 68-75.

Miletic, N., Vukovic, Z., Nastasovic, A., Loos, K. Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins: versatile immobilization supports for biocatalysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56 (2009b) 196-201.

Miranda, V., Wilson, L., Cárdenas, C., Illanes, A. Reactivation of immobilized penicillin G acylase: influence of cosolvents and catalytic modulators. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68 (2011) 77-82.

Mislovicova, D., Michalkova, E., Vikartovska, A. Immobilized glucose oxidase on different supports for biotransformation removal of glucose from oligosaccharide mixtures. *Process Biochem.* 42 (2007) 704-709.

Mislovicova, D., Turjan, J., Vikartovska, A., Pätoprsty, V. Removal of D-glucose from a mixture with D-mannose using immobilized glucose oxidase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 60 (2009) 45-49.

Moore, M. C. Drug Evaluation: Tagatose in the Treatment of Type 2 Diabetes and Obesity. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 7 (2006) 924–935.

Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R., Kamikubo, T. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 3053–3061.

Muddada, S. Tagatose: the multifunctional food ingredient and potential drug. *J. Pharm. Res.* 5 (2012) 626-31.

Muniruzzanman S, Tokunaga H, Izumori K. Isolation of *Enterobacter agglomerans* strain 221e from soil, a potent D-tagatose producer from galactitol. *J Ferment Bioeng* 78 (1994) 145–148.

Nakamatu, T., Yamanaka, K. Crystallization and properties of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii*. *Biochim. Biophys. Acta* 178 (1969) 156-165.

Nakanishi, K., Matsuno, R., Torii, K., Yamamoto, K., Kamikubo, T. Properties of immobilized  $\beta$ -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Enzyme Microb. Technol.* 5 (1983) 115-120.



Neri, D.F.M., Balcao, V.M., Cardoso, S.M., Silva, A.M.S., M. do R. M. Domingues, D.P.M. Torres, L.R.M. Rodrigues, Carvalho, L.B. Jr., J.A.C. Teixeira. Characterization of galactooligosaccharides produced by  $\beta$ -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. *Int. Dairy J.* 21 (2011) 172-78.

Novalin, S., Neuhaus, W., Kulbe, K.D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. *J. Biotechnol.* 119 (2005) 121-18.

O'Fágáin, C. Enzyme stabilization: recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 137-49.

Oh, H.-J., Kim, H.-J., Oh, D.-K. Increase in D-tagatose production rate by site-directed mutagenesis of L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Biotechnol. Lett.* 28 (2006a) 145-9.

Oh, D.-K., Oh, H.J., Kim, H.J., Cheon, J., Kim, P. Modification of optimal pH in L-arabinose isomerase from *Geobacillus stearothermophilus* for D-galactose isomerisation. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43 (2006b) 108-112.

Oh, D.-K. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (2007) 1-8.

Olcer, Z., Tanriseven, A. Co-immobilization of dextransucrase and dextransase in alginate. *Process Biochem.* 45 (2010) 1645-1651.

Othman, S.S., Basri, M., Hussein, M.Z., Rahman, M.B.A., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Jasmani, H. Production of highly enantioselective (-)- menthyl butyrate using *Candida rugosa* lipase immobilized on epoxy-activated supports. *Food Chem.* 106 (2008) 437-443.

Ovsejevi, K., Grazú, V., Cuadra, K., Batista-Viera, F. Enzyme reduction on solid phase as a tool for the reversible immobilization of yeast  $\beta$ -galactosidase onto a thiol-reactive support. *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 203-9.

Palomo, J.M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins: hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 21 (2003) 201-210.

Panesar, P.S. Kumari, S., Panesar, R. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res.* 2010 (2010) 2-16.

Park, J.-H., Batt, C.A. Restoration of a defective *Lactococcus lactis* xylose isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 4318-25.

Paterna, J. C.; Boess, F.; Staubli, A.; Boelsterli, U. A. Antioxidant and Cytoprotective Properties of D-Tagatose in Cultured Murine Hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148 (1998) 117-125.

Patra, F.; Tomar, S. K.; Arora, S. Technological and Functional Applications of Low-Calorie Sweeteners from Lactic Acid Bacteria. *J. Food Sci.* 74 (2009) R16-R23.

Patrick JW, Lee N. Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 243 (1968) 4312-4318.

Patrick JW, Lee N. Subunit structure of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 244 (1969) 4277–4283.

Patrick J, Lee N. L-arabinose isomerase. *Methods Enzymol* (1975) 453–458.

Pedroche, J., Yust, M. del M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón- Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J.M., Millán, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1160-66.

Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 199-205.

Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Stabilization of a multimeric  $\beta$ -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by immobilization on novel heterofunctional epoxy supports plus aldehyde-dextran cross-linking. *Biotechnol. Progress* 20 (2004) 388-92.

Pessela, B.C.C., Mateo, C., Filho, M., Carrascosa, A., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentration: purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007a) 242-48.

Pessela, B.C.C., Dellamora-Ortiz, G., Betancor, L., Fuentes, M., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007b) 310-15.

Pessela, B.C.C., Mateo, C., Filho, M., Carrascosa, A.V., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Stabilization of the quaternary structure of a hexameric  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus* sp. T2 by immobilization and post-immobilization techniques. *Process Biochem.* 43 (2008) 193-198.

Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., Daminati, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 39 (2006) 83-90.

Petzelbauer, I., Nidetzky, B., Haltrich, D., Kulbe, K.D. Development of an Ultra-High-Temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. I. The properties of two thermostable  $\beta$ -glycosidases. *Biotechnol. Bioeng.* 64 (1999) 323-332.

Petzelbauer, I., Zeleny, R., Reiter, A., Kulbe, K.D., Nidetzky, B. Development of an Ultra-High-Temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. II. Oligosaccharide formation by two thermostable  $\beta$ -glycosidases. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 140-149.

Petzelbauer, I., Splechtna, B, Nidetzky, B. Development of an Ultra-High-Temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. III. Utilization of two thermostable  $\beta$ -glycosidases in a continuous ultrafiltration membrane reactor and galacto-oligosaccharide formation under steady-state conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 77 (2002a) 394-404.

- Petzelbauer, I., Kuhn, B., Splechtna, B., Kulbe, K.D., Nidetzky, B. Development of an Ultra-High-Temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. IV. Immobilization of two thermostable  $\beta$ -glycosidases and optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion. *Biotechnol. Bioeng.* 77 (2002b) 619-631.
- Prabhu P, Tiwari MK, Jeya M, Gunasekaran P, Kim IW, Lee JK. Cloning and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81 (2008) 283-290.
- Prabhu, P., Jeya, M., Lee, J.-K. In silico studies on the substrate specificity of an L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 4436-39.
- Pramparo, L., Stüber, F., Font, J., Fortuny, A., Fabregat, A., Bengoa, C. Immobilization of horseradish peroxidase on Eupergit C for the enzymatic elimination of phenol. *J. Hazard. Mat.* 177 (2010) 990-1000.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. Cheese whey management: a review. *J. Environ. Manage.* 110 (2012) 48–68.
- Quax, W.J. Thermostable glucose isomerases. *Trends Food Sci. Technol.* 4 (1993) 31-34.
- Rabilloud, T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11 (1990) 785-794.
- Rhimi, M., Bejar, S. Cloning, purification and biochemical characterization of metallic-ions independent and thermoactive L-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US 100 strain. *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 191-99.
- Rhimi, M., Messaoud, E.B., Borgi, M.A., Ben Khadra, K., Bejar, S. Co-expression of L-arabinose isomerase and D-glucose isomerase in *E. coli* and development of an efficient process producing simultaneously D-tagatose and D-fructose. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1531-37.
- Rhimi, M., Aghajari, N., Juy, M., Chouayekh, H., Maguin, E., Haser, R., Bejar, S. Rational design of *Bacillus stearothermophilus* US 100 L-arabinose isomerase: potential applications for D-tagatose production. *Biochimie* 91 (2009) 650-53.
- Rhimi, M., Boisson, A., Dejob, M., Boudebouze, S., Maguin, E., Haser, R., Aghajari, N. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a  $\beta$ -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. *Res. Microbiol.* 161 (2010a) 515-25.
- Rhimi, M., Ilhammami, R., Bajic, G., Boudebouze, S., Maguin, E., Haser, R., Aghajari, N. The acid tolerant L-arabinose isomerase from the food grade *Lactobacillus sakei* 23 K is an attractive D-tagatose producer. *Bioresour. Technol.* 101 (2010b) 9171-77.
- Rhimi, M., Chouayekh, H., Gouillouard, I., Maguin, E., Bejar, S. Production of D-tagatose, a low caloric sweetener during milk fermentation using L-arabinose isomerase. *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3309-3315.

- Rocha-Martín, J., Vega, D., Bolívar, J.M., Hidalgo, A., Berenguer, J., Guisán, J.M., López-Gallego, F. Characterization and further stabilization of a new anti-prelog specific alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 for asymmetric reduction of carbonyl compounds. *Bioresour. Technol.* 103 (2012) 343-350.
- Rodrigues, D.S., Mendes, A.A., Adriano, W.S., Goncalves, L.R.B., Giordano, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 51 (2008) 100-109.
- Rodrigues, R.C., Bolívar, J.M., Palau-Ors, A., Volpato, G., Ayub, M.A.Z., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb. Technol.* 44 (2009a) 386-93.
- Rodrigues, R.C., Godoy, C.A., Volpato, G., Ayub, M.A.Z., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: critical role of chemical amination. *Process Biochem.* 44 (2009b) 963-68.
- Rodrigues, R.C., Bolívar, J.M., Volpato, G., Filice, M., Godoy, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. *J. Biotechnol.* 144 (2009c) 113-9.
- Rodrigues, R.C., Pessela, B.C.C., Volpato, G., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., Ayub, M.A.Z. Two step ethanolysis: a simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem.* 45 (2010) 1268-1273.
- Roessl, U., Nahálka, J., Nidetzky, B. Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 341-50.
- Roh HJ, Yoon SH, Kim P. Preparation of L-arabinose isomerase originated from *Escherichia coli* as a biocatalyst for D-tagatose production. *Biotechnol Lett* 2000; 22: 197-199.
- Rollini M, Manzoni M. Bioconversion of D-galactitol to tagatose and dehydrogenase activity induction in *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem* 40 (2005)437-444.
- Roman, G.N., Jansen, N.B., Hsiao, H.-Y., Tsao, G.T. *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985) 129-33.
- Romero, O., Guisán, J.M., Illanes, A., Wilson, L. Reactivation of penicillin acylase biocatalysts: effect of the intensity of enzyme-support attachment and enzyme load. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 74 (2012) 224-229.
- Ryu, S.-A., Kim, C.S., Kim, H.-J., Baek, D.H., Oh, D.-K. Continuous D-tagatose production by immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Progress* 19 (2003) 1643-47.
- Sadana, A., Henley, J.P. Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 717-723.

- Saibi, W., Abdeljalil, S., Masmoudi, K., Gargouri, A. Biocatalyst: beautiful creatures. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press. doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.028
- Salaun, F., Mietton, B., Gaucheron, F. Buffering capacity of dairy products. *International Dairy J.* 15 (2005) 95-109.
- Santa, H., Kammonen, J., Lehtonen, O., Karimäki, J., Pastinen, O., Leisola, M., Turunen, O. Stochastic boundary molecular dynamics simulation of L-ribose in the active site of *Actinoplanes missouriensis* xylose isomerase and its Val135Asn mutant with improved reaction rate. *Biochim. Biophys. Acta* 1749 (2005) 65-73.
- Santos A., Ladero M., García-Ochoa F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 558-567.
- Sariyar, B., Ozkan, P., Kirdan, B., Hortacsu, A. Expression and translocation of glucose isomerase as a fusion protein in *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 105-112.
- Saudagar, P.S., Singhal, R.S. Curdlan as a support matrix for immobilization of enzymes. *Carbohydrates Polymers* 56 (2004) 483-88.
- Saw, J.H., Mountain, B.W., Feng, L., Omelchenko, M.V., Hou, S., Saito, J.A., Stott, M.B., Li, D., Zhao, G., Wu, J., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Rigden, D.J., Dunfield, P.F., Wang, L., Alam, M. Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WKI. *Gen. Biol.* 9 (2008) R 161.
- Seeman, J.E., Schulz, G.E. Structure and mechanism of L-fucose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 273 (1997) 256-68.
- Serra, I., Serra, C.D., Rocchietti, S., Ubiali, D., Terreni, M. Stabilization of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* by immobilization and post-immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 52-58.
- Sheldon, R.A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1289-1307.
- Shimonishi T, Okumura Y, Izumori K. Production of D-tagatose from galactitol by *Klebsiella pneumoniae* strain 40b. *J Ferment Bioeng* 79 (1995) 620–622.
- Silva, J.A., Macedo, G.P., Rodrigues, D.S., Giordano, R.L.C., Goncalvez, R.L.E. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochem. Eng. J.* 60 (2012) 16-24.
- Sisak, C., Csánadi, Z., Rónay, E., Szajáni, B. Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1002-7.
- Siso MIG. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour Technol* 57 (1996) 1-11.

- Smith PK, Khron RI, Hermanson GF, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klent DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76-85.
- Smithers G.W., Copeland A.D. International Whey Conference. *Trends Food Sci. Technol.* 9 (1997) 119-123.
- Song, J., Abe, K., Imanaka, H., Imamura, K., Minoda, M., Yamaguchi, S., Nakanishi, K. Causes of the production of multiple forms of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 268-278.
- Song, J., Abe, K., Imanaka, H., Imamura, K., Minoda, M., Katase, T., Hoshi, Y., Yamaguchi, S., Nakanishi, K. Cloning and expression of  $\beta$ -galactosidase gene of *Bacillus circulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 1194-7.
- Stich, T.M., Determination of protein covalently bound to agarose supports using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 191 (1990) 343-46.
- Sundberg L, Porath J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography: I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *J Chromatogr A* 90 (1974) 87-98.
- Suh, C.W., Park, S.H., Park, S.G., Lee, E.K. Covalent immobilization and solid-phase refolding of enterokinase for fusion protein cleavage. *Process Biochem.* 40 (2005) 1755-62.
- Szczodrak, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Penicillium notatum*. *Acta Biotechnol.* 19 (1999) 235-50.
- Tan, S.S., Li, D.Y., Jiang, Z.Q., Zhu, Y.P., Shi, B., Li, L.T. Production of xylobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using *Thermotoga maritima* xylanase B (Xyn B) immobilized on nickel-chelated Eupergit C. *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 200-204.
- Tardioli PW, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Giordano RLC. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnol Prog* 19 (2003) 565-74.
- Tardioli, P.W., Sousa, R. Jr., Giordano, R.C., R.L.C. Giordano. Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase immobilized on 10% glyoxyl-agarose. *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 555-564.
- Tardioli, P.W., Zanin, G., de Moraes, F.F. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomalto-dextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1270-1278.
- Tardioli, P.W., Vieira, M.F., Vieira, A.M.S., Zanin, G.M., Betancor, L., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M. Immobilization-stabilization of glucoamylase: chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Process Biochem.* 46 (2011) 409-412.

Thompson, D., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C., Cowan, D.A., Guisán, J.M., Daniel, R. Degradation and denaturation of stable enzymes. In: Ballesteros, A., Plou, U., Iborra, E., Halling, E. Stability and stabilization of biocatalyst. Progress Biotechnol. 15 (1998). Elsevier, Amsterdam. pp. 349-352.

Thudi, L., Jasti, L.S., Swarnalatha, Y., Fadnavis, N.W., Mulani, K., Deokar, S., Ponrathnam, S. Enzyme immobilization on epoxy supports in reverse micellar media; prevention of enzyme denaturation. J. Mol. Catal. B: Enzym. 74 (2012) 54-62.

Torres, R., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Palomo, JM, Guisán, JM, Fernández-Lafuente, R. A novel heterofunctional epoxy-amino Sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: immobilization-stabilization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Biotechnol. Prog. 19 (2003) 1056-1060.

Torres, P., Datla, A., Rajasekar, V.W., Zambre, S., Ashar, T., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Caldero-Rueda, O., Barba, V., Martínez, M.J., Ballesteros, A., Plou, F.J. Characterization and application of a sterol esterase immobilized on epoxy-activated carriers (Dilbeads<sup>TM</sup>). Catalysis communications 9 (2008) 539-45.

Torres, P., Mammarella, E., Regenhardt, S., Batista-Viera, F., Rubiolo, A. Hidrólisis enzimática de lactosa en leche y permeados de lactosuero con  $\beta$ -galactosidasa (*Bacillus circulans*) inmovilizada en resinas acrílicas entrampadas en una matriz de alginato. In: Fontecha, J., Recio, I., y Pilosof, A.M.R. (comp.). Funcionalidad de componentes lácteos. Editorial Universidad Miguel Hidalgo. Elche, España, (2009) pp. 1-24.

Torres, P., Batista-Viera, F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. J. Mol. Catal. B: Enzym. 74 (2012a) 230-35.

Torres, P., Batista-Viera, F. Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: applications in whey processing. J. Mol. Catal. B: Enzym. 83 (2012b) 57-64.

Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6 (1969) 24-27.

Tükel, S.S., Alagöz, D. Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerisation of glucose to fructose. Food Chem. 111 (2008) 658-662.

Tükel, S.S., Yildirim, D., Alagöz, D., Alptekin, O., Yüzebilgic, G., Bilgin, R. Partial purification and immobilization of a new (R)-hydroxynitrile lyase from seeds of *Prunus pseudoarmeniaca*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 66 (2010) 161-65.

Tunick, M. H. Whey Protein Production and Utilization. En: Onwulata, C. I.; Huth, P. J. (eds.). Whey Processing, Functionality and Health Benefits. Ames, IA: Blackwell Publishing and IFT Press, p. 169-184, 2008.

Turnbull, G.K. Lactose intolerance and irritable bowel syndrome. Nutrition 16 (2000) 665-6.

Vaidya, B.K., Karale, A.J., Suthar, H.K., Ingavle, G., Pathak, T.S., Ponrathnam, S., Nene, S. Immobilization of mushroom polyphenol oxidase on poly (allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous beaded copolymers. *React. Funct. Polymers* 67 (2007) 905-15.

Vaidya, B.K., Ingavle, G.C., Ponrathnam, S., Kulkarni, B.D., Nene, S.N. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on (allyl glycidyl ether—co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 3623-29.

Valencia, P., Flores, S., Wilson, L., Illanes, A. Effect of particle size distribution on the simulation of immobilized enzyme reactor performance. *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 256-263.

Vetere, A., Paoletti, S. Separation and characterization of three  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1380 (1998) 223-231.

Vieira, M.F., Vieira, A.M.S., Zanin, G.M., Tardioli, P.W., Mateo, C., Guisán, J.M.  $\beta$ -glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 69 (2011) 47-53.

Walker, J. M. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. En: Walker, J. M. (ed.). *The Protein Protocols Handbook*, Second edition. Humana Press, Inc. Totowa, New Jersey, p. 11-14, 2002.

Wallace LJ, Eiserling FA, Wilcox G. The shape of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 253 (1978) 3717-3720.

Wang, P.-Y., Tsai, S.-W., Chen, T.-L. Improvement of enantioselectivity and stability of *Klebsiella oxytoca* hydrolase immobilized on Eupergit C 250 L. *J. of Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008a) 1518-25.

Wang, P.-Y., Tsai, S.-W., Chen, T.-L. Improvements of enzyme activity and enantioselectivity via combined substrate engineering and covalent immobilization. *Biosci. Biotechnol.* 101 (2008b) 460-69.

Wang, P.-Y., Tsai, S.-W. Modification of enzyme surface negative charges via covalent immobilization for tailoring the activity and enantioselectivity. *J. Taiwan Inst. Chem. Engin.* 40 (2009) 364-370.

Wang, F., Gu, Z., Cui, Z., Liu, L. Comparison of covalent immobilization of amylase on polystyrene pellets with pentaethylenehexamine and pentaethylene glycol spacers. *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9374-79.

Wilson, L., Illanes, A., Romero, O., Vergara, J., Mateo, C. Carrier-bound and carrier free penicillin acylase biocatalyst for the thermodynamically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam compounds in organic medium. *Enzyme Microb. Technol.* 43 (2008) 442-7.

Wilson, L., Illanes, A., Soler, L., Henríquez, M.J. Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. *Process Biochem.* 44 (2009) 322-326.

Wiseman A. *Manual de biotecnología de los enzimas*. Zaragoza: Editorial Acirbia S.A., 1995.



- Wong, D. Sweetener Determined Safe in Drugs, Mouthwashes, and Toothpastes. *Dent. Today* 19 (2000) 34–35.
- Xu, W., Yan, M., Xu, L., Ding, L., Ouyang, P. Engineering the activity of thermophilic xylose isomerase by site-directed mutation at subunit interfaces. *Enzyme Microb. Technol.* 44 (2009) 77–83.
- Xue, P., Xu, F., Xu, L. Epoxy-functionalized mesostructured cellular foams as effective support for covalent immobilization of penicillin G acylase. *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 1625–1630.
- Yadav G.D., Jadhav S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate. *Micropor. Mesopor. Mat.* 86 (2005) 215–222.
- Yamanaka K, Wood WA. L-arabinose isomerase. *Methods Enzymol* 9 (1966) 596–602.
- Yamanaka, K. Purification, crystallization and properties of the D-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Biochim. Biophys. Acta* 151 (1969) 670–80.
- Yamanaka K. L-arabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii*. *Methods Enzymol* 41 (1975) 458–461.
- Yeom, S.-J., Ji, J.-H., Yoon, R.-Y., Oh, D.-K. L-ribulose production from L-arabinose by an L-arabinose isomerase mutant from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 1789–93.
- Yoon, S.-H., Kim, P., Oh, D.-K. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalyst for tagatose production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (2003) 47–51.
- Yoshihara K, Shinohara Y, Hirotsu T, Izumori K. Bioconversion of D-psicose to D-tagatose and D-talitol by *Mucoraceae* Fungi. *J Biosci Bioeng* 100 (2006) 219–222.
- Yu, H., Guo, Y., Dongliang, W., Zhan, W., Lu, G. Immobilization of glucose isomerase onto GAMM support for isomerisation of glucose to fructose. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 72 (2011) 73–6.
- Zall, R.R. Sources and composition of whey and permeate. In J.G. Zadow, *Whey and lactose processing*. (pp. 1–72). New York: Elsevier, 1992.
- Zavrel, M., Michalik, C., Schwendt, T., Schmidt, T., Ansorge-Shumacher, M., Janzen, C., Marquardt, W., Büchs, J., Spiess, A.C. Systematic determination of intrinsic reaction parameters in enzyme immobilizates. *Chem. Eng. Sci.* 65 (2010) 2491–99.
- Zhang H, Jiang B, Pan B. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing D-tagatose. *World J Microbiol Biotechnol* 23 (2007) 641–646.
- Zhang, Y.W., Prabhu, P., Lee, J.K. Immobilization of *Bacillus licheniformis* L-arabinose isomerase for semi-continuous L-ribulose production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009a) 2234–39.
- Zhang, Y.W., Prabhu, P., Lee, J.K., Kim, I.W. Enhanced stability of *Bacillus licheniformis* L-arabinose isomerase by immobilization with alginate. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 40 (2009b) 65–75.

Zhang, M.W., Bo, T.J., Hua, Z. Progress in researches on D-tagatose and L-arabinose isomerase. *Food Ferment. Ind.* 2009 (2009c) 14-38.

Zhang, Y.W., Jeya, M., Lee, J.K. L-ribulose production by an *Escherichia coli* harboring L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010a) 1993-9.

Zhang, Y.W., Jeya, M., Lee, J.K. Alginate immobilization of recombinant *Escherichia coli* whole cells harboring L-arabinose isomerase for L-ribulose production. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 33 (2010b) 741-48.

Zhang, Y.W., Jeya, M., Lee, J.K. Enhanced activity and stability of L-arabinose isomerase by immobilization on amino propyl glass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 1435-42.

Zhou Q., Dong-Chen X. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Eng. J.* 10 (2001) 33-40.

Zhou, Q.Z., Chen, X.D., Li, X. Kinetics of lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric. *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2003) 127-133.

Zhou, X., Wu, J.C. Heterologous expression and characterization of *Bacillus coagulans* L-arabinose isomerase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 2205-2212.

Zuh, W., Manjasetty, B., Chance, M. Crystal structure of Mn<sup>2+</sup>-bound *Escherichia coli* L-arabinose isomerase (ECAI) and implications in protein catalytic mechanism and thermostability. *J. Young Inv.* 17 (2007) 29-33.