

**ELABORACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE
PALMA REAL (*Roystonea regia*)**

LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA
2006**

**ELABORACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE
PALMA REAL (*Roystonea regia*)**

LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de químico

DIRECTOR DEL PROYECTO DE GRADO

RODRIGO TORRES SAEZ

Profesor Asistente

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

BUCARAMANGA

2006

A DIOS POR SER MI GUÍA

A MIS PADRES POR SER EL SOL QUE ALUMBRA MI VIDA

A MIS HERMANAS POR SU PACIENCIA

A NAZZOLY POR SER MI ANGEL GUARDIAN EN LA TIERRA

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mis padres por su apoyo incondicional y voz de aliento para la culminación de esta etapa.

Al Dr Rodrigo Torres Sáez por su paciencia, orientación y aportes en el desarrollo de este trabajo de grado.

A la profesora Tulia Stella Rivero por sus valiosas contribuciones en el área de la estadística.

Al ingeniero William La rota por su colaboración y amistad.

A nazzoly Rueda por su amor, tolerancia y compañía en los buenos y malos momentos.

A mis grandes amigos Hernando Camargo, Sergio Rodríguez, Jose Luis Pinto, porque nunca me dejaron desfallecer y siempre me brindaron su más sincera amistad.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1 MARCO DE REFERENCIA	20
1.1 MARCO DE ANTECEDENTES	20
1.2 MARCO TEÓRICO	22
1.2.1 Generalidades de las enzimas	22
1.2.2 Clasificación de las enzimas	27
1.2.3 Oxidorreductasas	28
1.2.4 Peroxidasas	29
1.2.5 Peroxidasas de palma real	31
1.2.5.1 Clasificación de las peroxidasas	32
1.2.5.2 Propiedades catalíticas	33
1.2.5.3 Propiedades moleculares	34
1.2.5.4 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la peroxidasa	36
1.2.5.5 Aplicaciones de las peroxidasas	37
1.2.6 Inmovilización de enzimas	38
1.2.6.1 Aspectos generales	38
1.2.6.2 Métodos de inmovilización	39
1.2.7 Entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA)	41
1.2.7.1 Estructura de los agregados entrecruzados enzimáticos	42
1.2.7.2 Aislamiento de los CLEA	44
1.2.8 El glutaraldehído	44
1.2.8.1 Aspectos generales	44
1.2.8.2 Comportamiento químico en soluciones acuosas	45
1.2.8.3 Reacción con proteínas	46
1.2.8.4 Aplicación para entrecruzar enzimas	49

2 METODOLOGÍA	50
2.1 EXTRACCIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	50
2.1.1 Extracción	50
2.1.2 Eliminación de pigmentos	50
2.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	51
2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA	51
2.4 ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE LA PEROXIDASA DE LA PALMA REAL	52
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	56
2.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA	56
2.7 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS ÓPTIMOS	56
3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
3.1 EXTRACCIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	57
3.2 ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PEROXIDASA SOLUBLE	58
3.3 AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA CON ETANOL COMO AGENTE PRECIPITANTE	58
3.4 AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA CON ACETONA COMO AGENTE PRECIPITANTE	67
3.5 AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA CON PEG (PM 10000) COMO AGENTE PRECIPITANTE.	74
3.6 OPTIMIZACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA	80
3.7 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS	

ENTRECRUZADOS ELABORADOS BAJO LAS CONDICIONES 81
ÓPTIMOS

4 CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXOS	93

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Clasificación de las enzimas	28
Tabla 2	Peso molecular y punto isoelectrico de peroxidasas vegetales	32
Tabla 3	Clasificación de las peroxidasas	32
Tabla 4	Factores constantes en la elaboración de agregados entrecruzados	52
Tabla 5	Condiciones experimentales en la selección de variables significativas de la inmovilización	53
Tabla 6	Matriz del diseño experimental	53
Tabla 7	Actividad específica de la peroxidasa soluble de la palma real	58
Tabla 8	Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados utilizando etanol como agente precipitante	59
Tabla 9	Rendimientos de la actividad específica de los agregados entrecruzados elaborados con etanol como agente precipitante	60

Tabla 10	Porcentaje de entrecruzamiento de proteína contactada con etanol como precipitante	61
Tabla 11	Tabla de ANOVA para las experiencias con etanol	63
Tabla 12	Matriz de resultados para los agregados entrecruzados elaborados con acetona como agente precipitante	68
Tabla 13	Rendimientos de la actividad enzimática de los agregados entrecruzados con acetona como agente precipitante	69
Tabla 14	Rendimientos de inmovilización de proteína contactada con acetona como agente precipitante	70
Tabla 15	Tabla de ANOVA para las experiencias con acetona	71
Tabla 16	Matriz de resultados para los agregados entrecruzados de peroxidasa utilizando PEG	74
Tabla 17	Rendimiento de la actividad específica de los agregados entrecruzados con PEG como agente precipitante	75
Tabla 18	Rendimiento del entrecruzamiento de proteína contactada en la elaboración de los agregados entrecruzados con PEG como precipitante	76
Tabla 19	Tabla ANOVA para las experiencias con PEG	78
Tabla 20	Constantes de inactivación de la peroxidasa soluble a determinadas temperaturas	81

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Palma real (<i>Roystonea regia</i>)	31
Figura 2	Mecanismo general de catálisis de las peroxidasas	33
Figura 3	Estructura molecular HRP	35
Figura 4	Posibles formas del glutaraldehído en solución acuosa	45
Figura 5	Reacciones del glutaraldehído con proteínas	47
Figura 6	Reacciones del glutaraldehído con proteínas bajo condiciones ácidas y neutras	48
Figura 7	Elaboración de agregados entrecruzados (CLEA) [7]	54
Figura 8	Diagrama de Pareto para las variables del proceso de elaboración de los agregados entrecruzados con etanol como agente precipitante	62
Figura 9	Superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados con etanol como agente precipitante	64
Figura 10	Contorno de superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa con	64

etanol como agente precipitante

- Figura 11** Diagrama de Pareto para las variables del proceso de entrecruzamiento con acetona como agente precipitante 71
- Figura 12** Superficie de respuesta para las experiencias con acetona como agente precipitante 72
- Figura 13** Contorno de superficie de respuesta para las experiencias con acetona como agente precipitante 72
- Figura 14** Diagrama de Pareto para las variables utilizadas en la elaboración de los agregados entrecruzados con PEG como agente precipitante 77
- Figura 15** Superficie de respuesta para las experiencias con PEG como agente precipitante 78
- Figuras 16** Contorno de superficie de respuesta para las experiencias con PEG como agente precipitante 79
- Figura 17** Estabilidad de los agregados entrecruzados de peroxidasa de la palma real frente a la temperatura 82
- Figura 18** Estabilidad térmica de los agregados entrecruzados y de la peroxidasa soluble a diferentes temperaturas. 83

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.	93
ANEXO B Calculo de la actividad específica de la peroxidasa soluble de la palma real (<i>Roystonea regia</i>).	94
ANEXO C Calculo de la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real.	95

RESUMEN

TITULO:

ELABORACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea Regia*)*.

Barbosa Jaimes Luis Oveimar, Torres Sáez Rodrigo**.

Palabras claves: enzimas, peroxidasa, agregados entrecruzados (CLEAs), glutaraldehído, diseño experimental, superficie de respuesta.

Las enzimas pueden catalizar diferentes procesos de biotransformación. Un grupo de ellas, pertenecientes al grupo de las oxido-reductasas, entre las cuales se encuentra la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), presentan un gran potencial en el tratamiento de efluentes y suelos contaminados.

En este proyecto se efectuó un estudio de la inmovilización de proteínas de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), a través del entrecruzamiento proteico llevado a cabo con glutaraldehído, para la formación de agregados entrecruzados de enzimas (CLEA), evaluándose el efecto causado por el etanol, acetona y polietilenglicol como agentes precipitantes. Posteriormente se determinó su estabilidad térmica en comparación a la enzima soluble.

Los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*), mostraron un incremento significativo en su actividad específica y estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble. Se determinó que para una concentración de etanol del 78% (v/v) y de glutaraldehído del 1% (p/v), los agregados entrecruzados presentaban una actividad específica de 2011 U/mg y una estabilidad térmica 40 veces mayor que la enzima soluble.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Rodrigo Torres Sáez. Ph.D. en Química.

ABSTRACT

TITLE:

ELABORATION OF CROSSLINKED AGGREGATES PEROXIDASES OF ROYAL PALM (*Roystonea Regia*)*.

Barbosa Jaimes Luis Oveimar, Torres Sáez Rodrigo**.

Keywords: enzymes, peroxidases, cross-linked aggregates (CLEAs), glutaraldehyde, experimental design, answer surface.

Enzymes can catalyze different biotransformation processes. A group of them, belonging to the oxide-reductase group, within which there is the Royal Palm peroxydases (*Roystonea regia*), show a great potential in the treatment of effluents y polluted areas.

A study of protein immobilization of the peroxydases of Royal Palm was effected (*Roystonea regia*) through proteic enzyme cross-linking (CLEA), by evaluating the effect caused by ethanol, acetone, PEG, as aggregation agents. Its thermal stability was determined in comparison to the soluble enzyme.

The cross-linked aggregates peroxidases of Royal Palm, (*Roystonea regia*), showed a significant increase in its specific activity and thermal stability in comparison to the soluble enzyme. It was determined that for a 78%(v/v) ethanol and a 1% (p/v) glutaraldehyde concentration, the cross-linked aggregates showed an specific activity of 2011 U mg and a thermal stability 40 times greater than the soluble enzyme.

* Degree of Project.

** Science of Faculty, School of Chemistry, Director: Rodrigo Torres Sáez, Ph.D. in Chemistry.

INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas en procesos de biotransformación de moléculas orgánicas es un área de gran interés industrial. Estos nuevos bioprocesos pueden permitir el uso de las enzimas en campos de aplicación tan diversos como el tratamiento ambiental, la síntesis orgánica, el procesamiento de alimentos y el análisis químico.

Desde un punto de vista ambiental y una perspectiva de química verde, las enzimas presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores químicos convencionales no biológicos. Ellas se caracterizan por poseer una gran actividad catalítica, especificidad y selectividad frente al sustrato, en condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica, lo cual las convierte en excelentes catalizadores para procesos de transformación.

Las enzimas pueden catalizar diferentes procesos de biotransformación. Un grupo de ellas, pertenecientes al grupo de las oxido-reductasas, entre las cuales se encuentra la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), presentan un gran potencial en el tratamiento de efluentes y suelos contaminados. Tradicionalmente los efluentes municipales o industriales han sido tratados con sistemas físico-químicos y biológicos mediante el empleo de microorganismos. Sin embargo, el uso de enzimas especializadas, tales como las peroxidasas, puede favorecer la eliminación de compuestos fenólicos recalcitrantes presentes en un gran número de efluentes industriales y acelerar los procesos de biorremediación. La posibilidad de utilización de enzimas en procesos de biorremediación de aguas y suelos contaminados ha abierto un campo potencial de aplicación de este tipo de

biocatalizadores. Esta situación ha llevado a buscar nuevas alternativas de insolubilización de las enzimas que permitan la separación de éstas del medio de reacción, su reutilización y estabilización en procesos catalíticos, con la consecuente reducción de costos de proceso, todo lo cual permitiría ser una alternativa viable a otras tecnologías de depuración.

Una de las tecnologías disponibles para la insolubilización de proteínas en los últimos 20 años ha sido la inmovilización. Desarrollada como un sistema modelo de comportamiento *in vitro* de enzimas asociadas a estructuras celulares, muy pronto produjo un gran impacto tecnológico, cuya potencialidad ha venido siendo investigada y desarrollada con gran intensidad en los últimos años.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente.

Entre las distintas técnicas de inmovilización, el entrecruzamiento de agregados enzimáticos mediante reactivos bifuncionales (por ej. glutaraldehído, diisocianato) surge como una alternativa de insolubilización que permite mantener la estructura del agregado, incrementando el rendimiento de la actividad catalítica en comparación con el de la enzima nativa.

En este proyecto se presentan los resultados de un estudio de la inmovilización de proteínas realizado con la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), a través del entrecruzamiento proteico llevado a cabo con un agente bifuncional, el glutaraldehído, para la formación de agregados entrecruzados de enzimas (CLEA), evaluándose el efecto causado por el etanol, acetona y polietilenglicol como agentes precipitantes. Además, se desarrolló un diseño experimental para determinar las condiciones de concentración de agente precipitante y entrecruzante, así como tiempo de reacción de entrecruzamiento, que logran la

formación de CLEAs con mejores rendimientos de actividad enzimática. Finalmente, se llevó a cabo un escalamiento del proceso de agregación de la enzima peroxidasa bajo las condiciones óptimas determinadas previamente, y se determinó su estabilidad térmica en comparación a la enzima soluble.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 MARCO DE ANTECEDENTES

Durante el último tiempo, se ha investigado con gran intensidad el potencial del entrecruzamiento de agregados enzimáticos para la inmovilización de enzimas.

En el año 2000, Linqiu Cao y colaboradores [11] desarrollaron una técnica efectiva de inmovilización, que permitió incrementar la estabilidad operacional de las enzimas facilitando su recuperación y re-uso. Cao y col. inmovilizaron la enzima penicilina acilasa a través del entrecruzamiento con glutaraldehído de agregados físicos de la enzima formados por la adición de un agente precipitante, generando una forma insoluble de agregados entrecruzados de la enzima (CLEA). Estos agregados entrecruzados de la penicilina acilasa, catalizaron la síntesis de ampicilina en un rango amplio de solventes orgánicos, manteniendo su actividad catalítica intacta.

Posteriormente, en el año 2001, Cao y col., reportaron la inmovilización de la penicilina G Acilasa a través del entrecruzamiento de agregados físicos de la enzima con glutaraldehído. Ellos mostraron que la adición de agentes precipitantes, tales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, polietilenglicol o butanol, ocasionaba la agregación de la proteína. El efecto del agente precipitante fue evaluado determinándose que los agregados elaborados con butanol presentaban mejores actividades en comparación con los agregados elaborados con polietilenglicol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los agregados entrecruzados de la penicilina-G-acilasa elaborados con butanol fueron utilizados como catalizadores en la síntesis de antibióticos β -lactámicos mostrando actividades catalíticas superiores tanto en medio acuoso como en fase orgánica en comparación con la penicilina-G-acilasa inmovilizada y disponible comercialmente.

En el 2002, Lopez-Serrano, Cao y Van Rantwijk [13], precipitaron las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y *Rhizomucor miehei* con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en presencia de triton X-100 como surfactante, con un posterior entrecruzamiento con glutaraldehído. La actividad catalítica de los CLEA elaborados fue evaluada en la hidrólisis del p-nitrofenil propionato. Los agregados entrecruzados de las lipasas mostraron actividades similares a la enzima soluble, e incluso en algunos casos actividades superiores.

Moira y Van Rantwijk [21], en el 2003, elaboraron agregados entrecruzados de aminoacilasa de *Aspergillus melleus*, para la determinación de la actividad de aminólisis y alcoholólisis de sustratos quirales. Los agregados entrecruzados de aminoacilasa fueron elaborados utilizando como agente precipitante dimetil eter y glutaraldehído como agente entrecruzante. Los CLEAs elaborados mostraron actividades superiores en comparación con la enzima soluble en las reacciones de aminólisis y alcoholólisis en las que fueron utilizados como biocatalizadores.

En el 2004, Schoevaart, Sheldon y col. [7], demostraron la gran aplicabilidad del entrecruzamiento de agregados enzimáticos para la efectiva inmovilización de enzimas. Elaboraron agregados entrecruzados de 12 enzimas diferentes entre las que se encuentran la galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, lacasa, lipasa entre otras. Estimaron el efecto de 14 agentes precipitantes (metanol, etanol, acetona, PEG, entre otros) y de la concentración del glutaraldehído como agente entrecruzante en la formación de los agregados físicos entrecruzados de estas enzimas. Determinaron las estructuras físicas de los CLEA a través de un microscopio de barrido electrónico, estableciendo que la forma de agregación de las enzimas depende del grado de glicosilación de estas. Los resultados obtenidos demostraron que todos estos parámetros evaluados inciden de manera directa sobre las propiedades de los agregados obtenidos.

En el 2004, Wilson, Betancor y otros [12], publicaron los resultados obtenidos en la elaboración de agregados entrecruzados de enzimas multiméricas como las catalasas de hígado de bovino (BLC) y *Micrococcus lysodikticus* (MLE). Los agregados entrecruzados fueron elaborados adicionando dietilenglicol dimetil eter como agente precipitante y glutaraldehído al 5% (v/v). Determinaron que los CLEAs elaborados presentaban una alta estabilidad bajo condiciones de dilución e interesantemente estabilizaban la estructura multimérica de estas enzimas tetraméricas. Determinaron que los CLEAs presentaban una alta estabilidad bajo condiciones de dilución y probablemente estabilizaban la estructura multimérica de estas enzimas tetraméricas.

En el 2005, Gaur y col. [10], inmovilizaron la β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* por tres técnicas diferentes, adsorción sobre celita, acoplamiento covalente con quitosano y agregación por entrecruzamiento. Estas técnicas fueron comparadas en términos de rendimiento de inmovilización, características enzimáticas, estabilidad y eficiencia en la síntesis de oligosacáridos. Los CLEAs formados mostraron ser más efectivos en la hidrólisis de lactosa con un rendimiento hasta de un 78% en comparación con las otras técnicas.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Generalidades de las enzimas

- **Historia**

Desde hace cientos de años se han venido empleando enzimas en procesos de fermentación tales como la fabricación de quesos, pan, vino y cerveza.

Hacia el siglo XVIII, ya se usaban microorganismos como fuente enzimática. Antoine Lavoisier (1743-1794) a través de observaciones experimentales fue el

primero en establecer bases cuantitativas en el proceso de la fermentación alcohólica al observar una relación entre la cantidad de azúcar presente y los productos formados durante el proceso.

El primer reporte de la estabilización de las enzimas por un sustrato data de los tiempos de Buchner, quien trabajó con el jugo de la levadura rehidratado, demostrando que la actividad de dicho jugo disminuía luego de 5 días de ser almacenado a bajas temperaturas. Sin embargo, la actividad permanecía intacta hasta por dos semanas conservándolo a bajas temperaturas en hielo, al agregarle jugo de caña de azúcar.

En 1860, Luis Pasteur comunicó que las enzimas estaban íntimamente ligadas con la estructura vital de las células de la levadura. A partir de estos experimentos y de diversos sustratos se empezaron a extraer enzimas muy diversas de diferentes fuentes vegetales, animales y de microorganismos.

- **Definición**

Las enzimas son catalizadores muy eficientes en los procesos biológicos. Estas catalizan reacciones promoviendo la consecución del equilibrio sin alterarlo, acelerando las reacciones químicas a través de la disminución de la energía de activación. Además de su función catalítica, las enzimas se caracterizan por su alta especificidad e incluso regioselectividad, catalizando un cierto tipo de reacción y reaccionando con un número de reactivos estructuralmente similares.

- **Estructura**

Todas las enzimas descubiertas hasta hoy son proteínas. Además de su parte proteica (apoenzima), la molécula enzimática puede estar integrada por otras macromoléculas ligadas por enlaces covalentes (carbohidratos), no covalentes

(ácidos nucleicos, lípidos), y por grupos de bajo peso molecular (coenzimas), que participan activamente en el proceso catalítico y son por tanto esenciales para la expresión de la actividad enzimática.

Las proteínas son heteropolímeros formados por residuos aminoacídicos unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos que conforman las proteínas son del tipo α (a excepción de prolina que es iminoácido) y poseen una configuración del tipo L. Son 20 en total y, de acuerdo a su estructura química pueden dividirse en no-polares y polares, cargados y no cargados. Sus propiedades funcionales dependen esencialmente del número y distribución de estos residuos aminoacídicos a lo largo de la molécula proteica. Las proteínas poseen diversos niveles estructurales (1°, 2°, 3° o 3D).

Se entiende por estructura primaria la secuencia de residuos aminoacídicos en la molécula proteica, que es consecuencia directa del mensaje genético contenido en la secuencia de los nucleótidos que conforman el ácido desoxirribonucleico.

Se entiende por estructura secundaria la resultante de la interacción de residuos aminoacídicos próximos en la estructura primaria; para proteínas globulares, como las enzimas, el modelo de la hélice α es razonablemente aceptable.

La estructura tridimensional de una proteína está determinada por su estructura primaria y por las condiciones ambientales que las rodean, y será la que le conferirá a la proteína sus propiedades funcionales.

La estructura tridimensional o terciaria es la resultante de la interacción de residuos aminoacídicos alejados en la estructura primaria y le confieren a la molécula proteica una estructura compacta y retorcida. Esta estructura configurará el sitio catalítico activo de la enzima, por lo que su preservación es esencial para su funcionalidad biológica [1].

Los principales tipos de interacciones responsables de la estructura tridimensional de una proteína son:

Los puentes de hidrógeno, resultantes de la interacción de un protón unido a un átomo electronegativo con otro átomo electronegativo.

Las interacciones apolares, resultantes de la mutua repulsión por un solvente polar de los residuos aminoacídicos apolares, que los hace ubicarse en el interior de la molécula. Los puentes disulfuro producidos por oxidación de residuos de cisterna, que son altamente estabilizantes de la estructura tridimensional, adquieren un gran significado para el caso de proteínas de bajo peso molecular.

Los enlaces iónicos entre residuos aminoacídicos cargados contribuyen, aunque de manera poco significativa, a la estabilización de la estructura tridimensional de la proteína, esto debido en gran manera a la elevada fuerza iónica del medio que rodea a la molécula proteica, lo que hace que los residuos aminoacídicos cargados reaccionen preferentemente con otros iones y no entre si.

- **Propiedades**

Las propiedades de las enzimas se derivan de su estructura proteica, siendo la principal propiedad su capacidad catalítica. La especificidad y estabilidad de las enzimas están también determinadas por su condición de proteínas. Así tenemos:

- **Estabilidad**

La capacidad catalítica de una enzima depende de la manutención de su estructura nativa. Dicha configuración es la resultante de muchas fuerzas de interacción, como las descritas anteriormente. Los cambios ambientales pueden

debilitar estas interacciones alterando la estructura tridimensional nativa ocasionando la pérdida total o parcial de su funcionalidad biológica

La desnaturalización se entiende como cualquier proceso que altere la estructura tridimensional nativa de una enzima que conlleva a la pérdida de la actividad. Dependiendo de la magnitud del agente desnaturalizante, puede verse afectada su estructura cuaternaria (si existe), terciaria o secundaria. La pérdida de la estructura cuaternaria es frecuentemente reversible, pudiéndose recobrar la actividad catalítica, por el contrario la pérdida de la estructura terciaria es frecuentemente irreversible y lleva asociada una pérdida total o parcial de la actividad; la alteración de la estructura secundaria es irreversible, provocando un efecto de coagulación y la inactivación total de la enzima.

Las enzimas son catalizadores muy sensibles a la temperatura. Un aumento del nivel térmico se traduce en un aumento de la energía vibracional que puede provocar la ruptura de puentes de hidrógeno y la destrucción de interacciones apolares [1].

La fuerza iónica del medio afecta la estabilidad de la enzima produciéndose, a bajos valores de fuerza iónica, una disminución de las interacciones enzima-solvente y un incremento de las interacciones iónicas en el interior de la cadena que pueden desestabilizar su estructura.

El pH también afecta fuertemente la estabilidad de la enzima. La carga de los residuos aminoacídicos de la proteína depende de la concentración de protones en el medio. Valores de pH bajo o sobre el punto isoeléctrico provocan la acumulación de cargas ya sean positivas o negativas que pueden ocasionar la desestabilización de la estructura de la enzima debido a las fuerzas de repulsión.

- **Actividad**

La capacidad catalítica o actividad es la propiedad esencial de una enzima. Desde un punto de vista termodinámico la enzima, como catalizador, actúa disminuyendo la magnitud de la energía de activación que requiere una reacción de transformación de sustrato o producto. Desde un punto de vista cinético la acción de la enzima se traduce en un incremento en la velocidad de transformación de sustrato a producto.

La capacidad catalítica de la molécula enzimática reside en el centro activo que comprende un número reducido de residuos aminoacídicos, próximos en la estructura tridimensional aunque lejanos en la estructura primaria. El centro activo es una estructura compleja cuya configuración permite ubicar la molécula de sustrato en la posición correcta para que los grupos funcionales de la enzima efectúen su transformación química [1].

- **Especificidad**

Una de las propiedades más sobresalientes de las enzimas como biocatalizadores es su alta especificidad respecto al sustrato.

Dos factores estructurales son determinantes para la especificidad de la enzima. Por un lado, el sustrato posee los enlaces químicos que pueden ser atacados por los grupos funcionales del centro activo de la enzima; por otro, el sustrato posee a su vez grupos funcionales que se unen a la enzima, permitiendo su correcta ubicación en el centro activo, para que la reacción tenga lugar.

1.2.2 Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican de acuerdo a la reacción química que catalizan (IUPAC comisión de enzimas) en seis clases:

Tabla 1. Clasificación de las enzimas.

clase	Tipo de reacción	ejemplo
1. óxidorreductasas	Oxidación/reducción	Dehidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, oxigenasas.
2. transferasas	Transferencia de grupo	Transaldolasas, transcetolasas, etc.
3. hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Esterasas, proteasas, carbohidrasas, etc.
4. liasas	Reacciones de eliminación	Substrato grupo liasa
5. isomerasas	isomerización	Epimerasas, racemasas, etc.
6. ligasas	Síntesis	Ligasa X-Y

1.2.3 Oxidorreductasas

La mayoría de las oxido-reductasas son hemoproteínas. Las hemoproteínas son un grupo diverso de enzimas que desarrollan una amplia variedad de funciones en los organismos vivos. Entre estas funciones están el transporte y almacenamiento de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), el transporte de electrones y la producción de energía (citocromo), la transferencia de oxígeno (monoxigenasas), la oxidación de sustratos (peroxidasas), la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y las transformaciones sintéticas [2].

Las oxidorreductasas como lo indica su nombre son enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción; transfiriendo electrones para oxidar o reducir grupos tales como:

- Alcoholes (R-OH)
- Alquenos
- Aminas primarias (R-NH₂)
- Cofactores (NADH, NADPH)

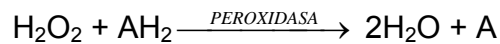
A su vez las oxidasas se clasifican en tres distintos grupos: deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas.

1.2.4 Peroxidasas

Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con un peso molecular aproximado de 42000 Da, en las cuales la porción proteica corresponde aproximadamente 34000 Da, el resto del peso molecular del grupo esta constituido por el grupo prostético (grupo hemo), dos iones calcio y algunos glicanos superficiales enlazados. Por lo general son moléculas más pequeñas que las oxidasas.

Las peroxidasas catalizan la oxidación de un buen número de sustratos por hidroperóxidos orgánicos o H₂O₂. En la reacción catalizada por la peroxidasa, el peróxido de Hidrógeno es reducido a expensas de varias sustancias que actúan como donadores de electrones tales como el ascorbato, las quinonas y el citocromo c. Este proceso comienza con una rápida reducción de un peróxido, seguida por dos oxidaciones consecutivas de un segundo y tercer sustrato (AH). En la reducción del peróxido la enzima pierde dos electrones, convirtiéndose en una especie muy reactiva debido a su elevado estado de oxidación. Esta especie adquiere un electrón a partir de un segundo sustrato generando así un nuevo intermediario, el cual a su vez, se reduce a la enzima nativa con la inevitable oxidación de otra molécula de sustrato. Todas estas transformaciones son posibles por la disposición especial del grupo hemo en el sitio activo de las peroxidasas.

La reacción catalizada por la peroxidasa es compleja, con el siguiente balance global:



- **Fuentes de la peroxidasa**

Las peroxidasas se encuentran en los reinos animal y vegetal. Debido a la presencia del grupo Hemo las peroxidasas se pueden clasificar en dos grupos: las peroxidasas presentes en tejidos animales, y las que están presentes en bacterias, hongos y plantas.

Las peroxidasas se pueden encontrar en las plantas de diferentes clases de frutas. Por ejemplo, a partir de la naranja (*Citrus sinensis*) fueron extraídas dos tipos de peroxidasa, una soluble y la otra enlazada de forma iónica [3].

Las peroxidasas han sido identificadas sobre la superficie de muchas especies de plantas. Por ejemplo, a partir de las hojas de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) fue aislada y purificada una peroxidasa aniónica con una alta termoestabilidad [4].

- **La palma real**

Es un árbol de tronco cilíndrico que alcanza alturas de 10 a 24 m. Sus hojas son plumosas, entre 2.40 y 3 m de longitud, conformada por segmentos de 75 cm de largo. Crece relativamente rápido alcanzando su máximo desarrollo en unos 10 años. Se cultiva sobre altitudes de 900 m – 1000 m sobre el nivel del mar, propagándose por semillas. Pertenece a la familia de las palmáceas, (*Palmae*). Su nombre científico es (*Roystonea regia*), en honor de un científico norteamericano que trabajó en Puerto Rico.

Las hojas de *Roystonea regia* presentan altos contenidos de enzimas peroxidadas, 700U por gramo de hoja, las cuales se mantienen constantes durante todo el año y en varias etapas del desarrollo. La actividad de las peroxidadas ha sido medida en diferentes épocas del año, encontrándose que la concentración de las enzimas es independiente de factores como la edad de la planta, condiciones climatológicas y altura de la palma, entre otras. La **figura 1** ilustra la palma real.



Figura 1. Palma real (*Roystonea regia*).

1.2.5 Peroxidasas de palma real:

Es una glicoproteína de peso molecular 51KDa, que se encuentra en mayor concentración en las hojas verdes de dicha planta. Su peso relativamente es alto en comparación con las otras peroxidadas lo que sugiere un alto grado de glicosilación. Su espectro de absorción tiene un máximo en 403 nm, conocida con el nombre de banda Soret, la cual es característica de las peroxidadas vegetales [30].

Tabla 2. Peso molecular y punto isoeléctrico de peroxidasas vegetales.

Fuente de enzima	Peso molecular (kD)	Punto isoeléctrico
Palma africana	57	3.8
Palma real	51	3.5
Alfalfa	48	9.2
Maíz	48	3.5
Rábano coreano	44	9.0
Rábano picante	44	8.9
Maní	40	8.9
Batata	40	4.5
Soya	37	4.1
Tabaco	36	3.5

1.2.5.1 Clasificación de las peroxidasas

Las peroxidasas se clasifican de acuerdo a sus propiedades estructurales, y se dividen en tres grandes superfamilias, las cuales se resumen en la tabla 3.

Tabla 3 clasificación de las peroxidasas

FAMILIA	CLASE	ORIGEN	EJEMPLO
Peroxidasas de plantas	I	Procariótico	Citocromo C peroxidasa
	II	Fúngico	Lignina peroxidasa
	III	plantas	HRP, palma real
Peroxidasas de origen animal	I	Haluro peroxidasas	Mieloperoxidasa
	II	prostaglandinas	Prostaglandina sintasa
catalasas	I	Animal	Catalasa bovina
	II	bacteriana	<i>E. Coli</i>

1.2.5.2 Propiedades catalíticas

En general, el ciclo catalítico de las peroxidasa se asemeja al descrito para la peroxidasa de rábano picante (HRP).

La gran mayoría de las peroxidasa catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y la oxidación de un amplio rango de sustratos.

En la **figura 2**, se muestra el posible mecanismo general de catálisis de las peroxidasa.

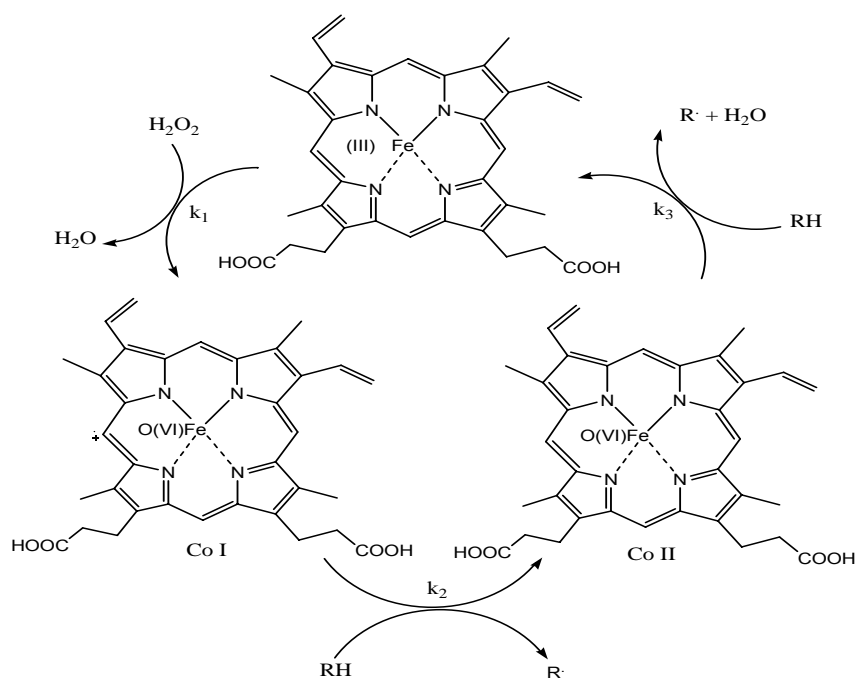


Figura 2. Mecanismo general de catálisis de las peroxidasa.

El primer paso es el rompimiento del peróxido de hidrógeno catalizado por la peroxidasa. Uno de los oxígenos del peróxido sale como agua, mientras que el otro es retenido por el grupo ferrilo. El compuesto I es conocido como catión

radical porfirínico π . El compuesto I acepta luego un electrón de la molécula del sustrato RH, produciendo el compuesto II, que contiene el grupo ferrilo, pero ya no como catión radical porfirínico. El compuesto II acepta un electrón de una segunda molécula de sustrato, regresando la enzima nuevamente a su estado nativo. La pérdida de un electrón del sustrato, acompañado de la pérdida de un protón, genera la formación de un radical. La alta reactividad y la baja selectividad asociada con los radicales orgánicos hacen que la química de los radicales sea realmente complicada [3].

Los sustratos que reducen los compuestos I y II reciben el nombre de “sustratos reductores”, y su interacción con el sitio activo de la peroxidasa tiene lugar en la posición delta al borde del grupo hemo.

1.2.5.3 Propiedades moleculares

Se han podido recolectar abundantes datos sobre la estructura de las peroxidosas gracias a la información estructural aportadas por técnicas como la difracción de rayos X.

Se ha comprobado que todas las peroxidosas, tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP) contienen ocho cisteínas, las cuales están localizadas en posiciones muy similares en la estructura primaria. De igual forma, dos histidina invariables (His42 e His170) han sido inferidas en la estructura del sitio activo, así His42 esta involucrada en la catálisis ácido/base e His170 está unida al quinto ligando del grupo hemo [3].

En la **figura 3** se muestra la estructura de la peroxidasa de HRP. Existen dos dominios bien definidos con la apoproteína o fracción proteica de la enzima. Cada dominio contiene un ión calcio, el cual suministra la estabilidad estructural y controla la actividad enzimática. Los dos dominios proporcionan una hendidura

hidrofóbica, en la cual está situado el grupo hemo. En cuanto al número de lisinas la peroxidasa presenta un número reducido, pero estas se encuentran accesibles en su gran mayoría para reaccionar con un agente bifuncional como el glutaraldehído.

En la **figura 3** se puede apreciar las 5 lisinas (en color amarillo) presentes en la peroxidasa de rábano picante (HRP) siendo estas: Lys65, Lys84, Lys149, Lys174, Lys232. Así mismo se observa el grupo Hemo (en color rojo) alejado de los residuos aminoacídicos de lisina, lo que evitaría la inactivación de la enzima durante el entrecruzamiento de estas enzimas con un reactivo bifuncional.

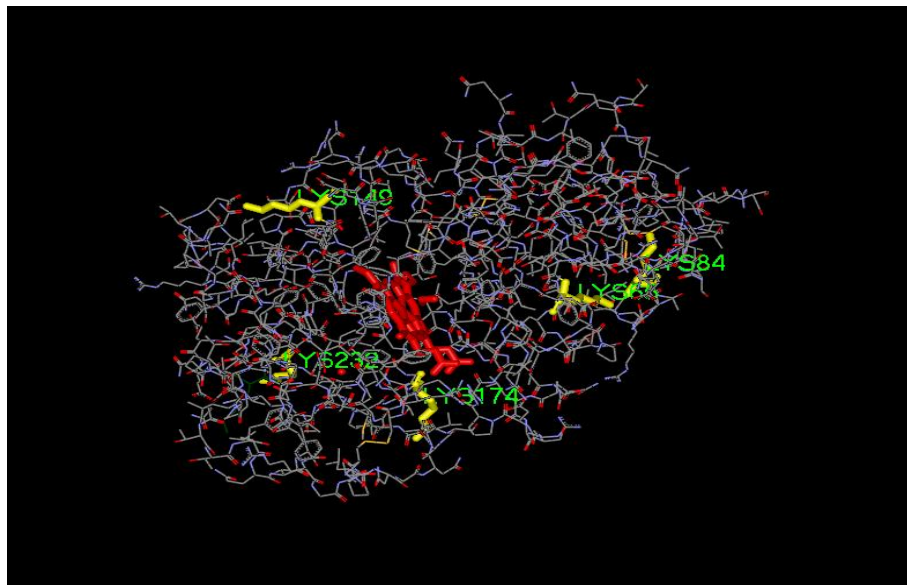


Figura 3. Estructura molecular HRP. Tomado de Protein Data Bank, Código de acceso 1W4W.pdb. Software de visualización RASMOL.

1.2.5.4 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la peroxidasa

Debido a que las peroxidases son proteínas, se ven afectadas por los cambios tanto en el pH como en la temperatura. Un cambio en el pH afecta la estabilidad, la conformación de la peroxidasa y la forma del sitio activo destruyendo las interacciones no covalentes (rompiendo los enlaces iónicos y los enlaces de hidrógeno). Un cambio en el pH produce una adición o una eliminación de H^+ de los aminoácidos de la peroxidasa. En el pH óptimo, la peroxidasa tiene una actividad catalítica máxima. El pH óptimo para cualquier peroxidasa depende del sustrato donador de hidrogeno y el buffer utilizado.

Las reacciones enzimáticas aumentan su velocidad con la temperatura, dentro de una gama limitada de valores. La temperatura a la cual las peroxidases presentan su máxima actividad depende de una serie de factores como son la pureza de la enzima y del sustrato.

La forma como el pH y la temperatura afectan la estabilidad de las peroxidases específicamente a sus estructuras secundaria y terciaria, está determinada por tres factores:

- Iones de calcio (Ca^{2+}).
- Puentes disulfuro
- Red de enlaces de hidrógeno

Se ha evaluado el efecto de la variación del pH en la estabilidad de la peroxidasa de rábano picante (HRP) por medio de diferentes técnicas espectroscópicas, encontrándose que a $pH < 4.5$, la estabilidad de la estructura secundaria disminuye notablemente [5]. Esto se debería probablemente a que la disminución

en el pH ocasiona la pérdida del grupo hemo, lo cual conlleva a una desnaturalización de la enzima.

1.2.5.5 Aplicaciones de las peroxidasas

Algunas peroxidasas de plantas han sido utilizadas exitosamente en biotecnología, síntesis orgánica y biorremediación, etc. Esta enzima es ampliamente empleada *in vitro* en el campo de la medicina, la química y la industria de alimentos, de igual manera en la biodegradación de compuestos fenólicos y aromáticos de residuos industriales [3].

Actualmente la peroxidasa tiene una gran aplicabilidad en la biotecnología, entre las que encontramos algunas como:

- **Inmunoensayos**

Los inmunoensayos están basados en el uso de marcadores para detectar reacciones inmunológicas. La peroxidasa de rábano picante (HRP) fue utilizada por primera vez como marcador de anticuerpos para la identificación y localización de antígenos. Esta tecnología encontró gran aplicación en química clínica y análisis ambiental.

Entre los inmunoensayos con enzimas el más empleado es el de ELISA, donde los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre una fase sólida para facilitar la separación de las fracciones libres y enlazadas de la reacción inmunológica [8].

- **Biosensores**

Un biosensor se define como un instrumento analítico que consisten de un componente biológico en contacto íntimo con un transductor de señal seguro, el cual convierte una señal bioquímica en una señal cuantificable.

Las peroxidasas son ampliamente utilizadas para la construcción de biosensores [9]. La inmovilización de la peroxidasa sobre la superficie de electrodos permite la construcción de biosensores para la determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos.

- **Biotransformación**

En la reacción típica de la peroxidasa, los sustratos ricos en electrones tales como los fenoles (p-cresol, guayacol, catecol) y aminas aromáticas (anilina, o-fenilendiamina, o-dianisidina) son oxidados por peróxidos por medio de una transferencia electrónica de un electrón para generar radicales.

Estas biotransformaciones catalizadas por peroxidasas conducen a la formación de productos naturales modificados con alta actividad biológica, y son bastante promisorias para ser utilizadas en la síntesis de compuestos más complejos.

1.2.6 Inmovilización de enzimas

1.2.6.1 Aspectos generales

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente, se ha ampliado esta definición a aquel proceso por el cual se

restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por medio de su unión a un soporte [6].

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

- El aumento de la estabilidad de la enzima;
- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

1.2.6.2 Métodos de inmovilización

En general los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en dos grandes categorías como lo son la inmovilización por enlace químico y la inmovilización por confinamiento.

Los métodos de inmovilización por enlace químico pueden ser divididos a su vez en dos tipos:

- 1) Enlazado o unión a un soporte
- 2) Entrecruzamiento de proteína pura.

El primer método, también denominado unión covalente, se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura

de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida, la metionina, el triptófano, arginina y el ácido aspártico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente. La principal desventaja de este método es la dilución de la actividad catalítica resultado de la introducción de una gran proporción de masa no catalítica lo que ocasiona bajos rendimientos volumétricos y de productividad [6].

El segundo método es una técnica de uso frecuente en la inmovilización de enzimas, en la cual se lleva a cabo el entrecruzamiento molecular mediante el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de proteína. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminóesteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e incluso, diaminas si están activadas con carbodimidina. El resultado del entrecruzamiento son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

La técnica de entrecruzamiento de proteínas por medio de la reacción de glutaraldehído con residuos amino reactivos sobre la superficie de la proteína fue inicialmente desarrollada en 1960 por Dossier y Richards. Sin embargo, este método de entrecruzamiento, en el cual se adicionaba directamente el glutaraldehído a la enzima, presentó severos inconvenientes, tales como una baja retención de la actividad catalítica, pobre reproducibilidad, baja estabilidad y dificultad en el manejo [7]. Posteriormente, surgió el entrecruzamiento de enzimas cristalinas, el cual fue primero aplicado para estabilizar cristales de enzima para estudios de difracción de rayos-x, presentando una desventaja inherente como lo es la necesidad de cristalizar la enzima, lo que es a menudo un procedimiento difícil.

1.2.7 Entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA)

Recientemente, se desarrolló una nueva forma de inmovilización de enzimas, llamada entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA).

Esta técnica consta de una etapa de precipitación y agregación de la enzima, la cual es inducida por la adición de sales, solventes orgánicos, polímeros no iónicos y ácidos. Esta etapa de precipitación es comúnmente utilizada como método de purificación de proteínas [7]. Estos agregados físicos son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes rediseñados cuando son dispersados en agua. La formación de estos agregados físicos es posible debido a un cambio en el estado de hidratación de las moléculas de la enzima, o por la alteración de la constante electrostática de la solución por la adición de un agente de agregación o precipitación apropiado [8].

Investigaciones recientes muestran que para concentraciones altas de precipitante los resultados obtenidos son muy buenos, lográndose un rendimiento del 100% en la actividad catalítica. Una razón para esta alta retención de la actividad es la competencia entre agregación y desnaturalización. Por el contrario, concentraciones menores del 70% v/v mostraron inactivaciones parciales debido a que la precipitación es incompleta.

Así mismo, se observó que el comportamiento catalítico de los diferentes agregados físicos depende de las propiedades de los agentes precipitantes utilizados, esto parece ser posible debido a que cada agente precipitante induce a una conformación diferente de la enzima [7].

Durante la etapa de agregación la solubilidad de la enzima en el medio circundante decrece. Cuando este proceso de agregación disminuye, la enzima puede desnaturalizarse por causa de una gran fuerza ejercida sobre su estructura.

Las observaciones anteriormente mencionadas sugieren que la formación del agregado insoluble de la enzima constituye una etapa esencial para la retención de la actividad enzimática durante el entrecruzamiento, por lo que se hace necesaria la selección adecuada del agente precipitante.

La siguiente etapa es la de entrecruzamiento del agregado físico. Este proceso consiste básicamente en la formación de enlaces covalentes entre los grupos reactivos del agente bifuncional y los residuos aminoacídicos de la enzima principalmente lisina. En esta etapa se mantienen la estructura del agregado y la actividad catalítica de la proteína individual. De forma interesante, el rendimiento de la actividad del agregado enzimático entrecruzado excede al de la enzima nativa. Este hecho experimental ha sido observado con lipasas y posteriormente con otras enzimas, y se denomina hiperactivación, al cual puede ser originada por un cambio conformacional de la proteína inducido por el estado de agregación [7].

Se conocen varios agentes entrecruzantes, siendo el glutaraldehído el más usado por su precio económico y alta versatilidad química.

Por otro lado, se hace necesario optimizar la etapa de entrecruzamiento minimizando la cantidad de agente entrecruzante, debido a que algunas enzimas son inactivadas generalmente por el glutaraldehído.

1.2.7.1 Estructura de los agregados entrecruzados enzimáticos

Las estructuras de agregados de proteínas dependen en algunos casos de la superficie hidrofóbica.

El juego entre el incremento de la energía libre para la formación de la superficie interfacial y el decrecimiento de la energía libre en la formación de sólidos gobiernan el tamaño crítico del núcleo coherentemente con la teoría clásica de

nucleación. Es así como el tamaño final del agregado de las partículas primarias se gobiernan entonces por el radio de nucleación y crecimiento, pero este puede llegar a ser pequeño.

Diferentes agregados de enzimas han sido estudiados a través del barrido con un microscopio electrónico, sobresaliendo dos tipos:

- **Agregado tipo 1**

Este tipo de agregados tiene una forma típica de “bolas”. Se han encontrado en enzimas escasamente glicosiladas y altamente lipofílicas.

Agregados de este tipo se produjeron en la lipasa de *Candida antarctica*. El diámetro de este tipo de agregados es aproximadamente de 1 μm . Cada partícula sencilla de CLEA contenía un máximo de 8×10^6 moléculas de enzima [7].

La actividad enzimática en este tipo de “bolas” no solo es fuertemente retenida, sino que pueden presentar un estado de hiperactivación reflejado por actividades que exceden el 100% de la enzima en forma soluble.

- **Agregado tipo 2**

Estos agregados presentan diámetros de aproximadamente 0.1 μm y forman ramificaciones. La lipasa de *Candida rugosa* y la R-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* son ejemplos de este tipo de agregados. Estas enzimas son glicosiladas por consiguiente tienen una superficie más hidrofílica. Una partícula de CLEA de estos agregados puede contener un máximo de 8×10^3 moléculas de enzima.

1.2.7.2 Aislamiento de los CLEA

Una de las mayores ventajas de los agregados entrecruzados es su fácil separación de soluciones acuosas. En contraste con la enzima libre, los CLEA pueden ser fácilmente separados del medio de reacción a través de una breve centrifugación recuperando completamente su actividad catalítica.

1.2.8 El glutaraldehído

1.2.8.1 Aspectos generales

Es un dialdehído lineal de 5 carbonos. Líquido aceitoso, claro e incoloro, el cual es altamente soluble en agua, alcohol y solventes orgánicos.

Se encuentra principalmente disponible como una solución acuosa ácida (pH 3.0-4.0), variando en concentración desde el 2% hasta el 70% (p/v).

Es ampliamente utilizado debido a su gran aplicabilidad y bajo costo en campos como la histoquímica, la microscopia, la esterilización química y biomédica.

En la tecnología de enzimas tiene como uso general la inmovilización de enzimas debido a su alta reactividad con los grupos amino bajo un pH neutro, generando entrecruzamientos térmica y químicamente más estables que otros aldehídos.

Se ha demostrado que en las reacciones de entrecruzamiento con monoaldehídos (formaldehído) y dialdehídos que tienen una cadena larga de 2 a 6 átomos de carbono (glioxal, malonaldehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído), son más reactivos los aldehídos de 5 carbonos, sobresaliendo entre ellos el glutaraldehído.

1.2.8.2 Comportamiento químico en soluciones acuosas

Reconocer la estructura y mecanismo del reactivo entrecruzante es importante para su uso. Sin embargo, la estructura del glutaraldehído en soluciones acuosas está sujeta a controversias. La estructura del glutaraldehído no está solo limitada a su forma monomérica, sino que también a distintas formas moleculares.

Varios estudios han demostrado que el glutaraldehído disponible comercialmente, presenta una mezcla de multicomponentes, pero saber a ciencia cierta cual de estos componentes es el más eficiente para las reacciones con las proteínas aún está en discusión.

En soluciones acuosas el glutaraldehído puede existir en su forma más simple como un dialdehído monomérico, pero también como un dímero, trímero y polímero como se puede observar en la figura 4 [9].

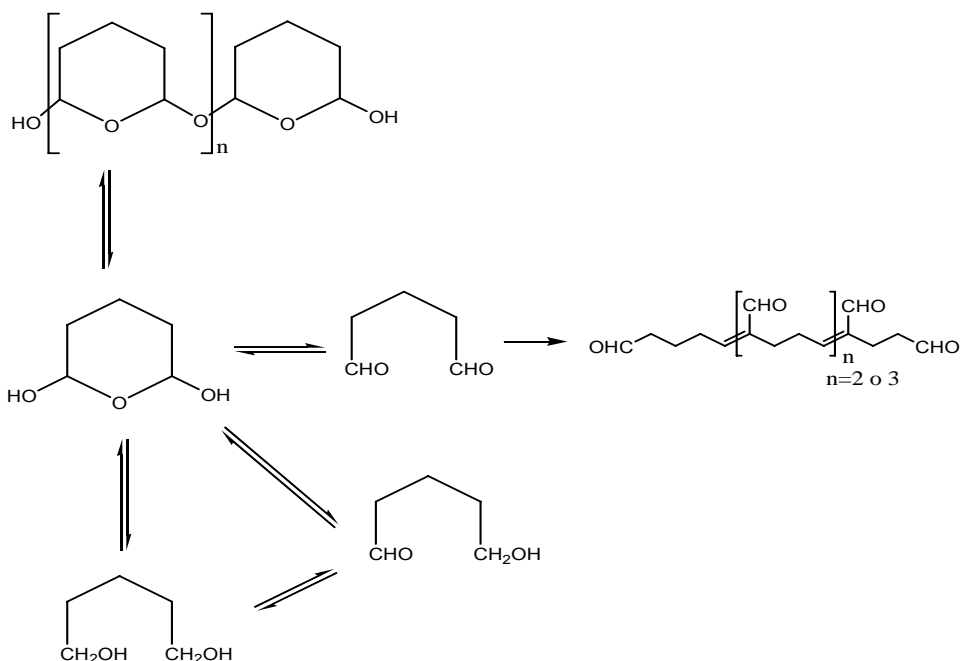


Figura 4. Posibles formas del glutaraldehído en solución acuosa

Por lo tanto la eficacia del glutaraldehído en la inmovilización y las controversias sobre su comportamiento químico pueden ser causa de sus múltiples estructuras, las cuales dependen de las condiciones de la solución.

1.2.8.3 Reacción con proteínas

El glutaraldehído es el agente entrecruzante más efectivo de proteínas, debido en gran medida a las variadas estructuras que puede tomar en solución acuosa, lo que le permite bajo determinadas condiciones de pH, temperatura y concentración reaccionar con ciertos grupos funcionales de residuos aminoacídicos de las proteínas tales como amino, tiol, fenol e imidazol porque el lado de la cadena más reactiva de los aminoácidos son nucleófilos.

La reactividad mostrada de los aminoácidos en orden decreciente frente a los aldehídos es: ϵ -amino, α -amino, guanidilo, amina secundaria y grupos hidroxilos.

Reacciona reversiblemente con grupos amino en un rango de pH entre 7 – 9, donde la reversibilidad observada es pequeña. El entrecruzamiento de proteínas con soporte (soporte sólido) o entre moléculas de proteínas (libre de soporte), generalmente implica los grupos ϵ -amino de residuos de lisina.

Los grupos amino desprotonados son muy reactivos como agentes nucleofílicos, esto se debe a que los grupos ϵ -amino de lisina tienen $pK_a > 9.5$ lo que supone que el pequeño porcentaje de amina presente en su forma desprotonada con un pH bajo es suficiente, para conducir al equilibrio ácido-base para la desprotonación de estos grupos con lo que se promueve la reacción.

Los residuos de lisina generalmente no comprometen el sitio activo catalítico, el cual permite el entrecruzamiento moderado para preservar la conformación de la proteína y su actividad biológica.

El grupo ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas reaccionan con los aldehídos formando bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono carbonilo del aldehído. Sin embargo, las bases de Schiff no son estables bajo condiciones ácidas y tienden a regenerar el aldehído y la amina. En contraste, el enlace formado por la reacción del glutaraldehído, con un grupo amino mostró estabilidad excepcional para pH y temperaturas extremas [9]. Estas bases de Schiff simples con ambos extremos de glutaraldehído monomérico pueden ser utilizadas como un mecanismo para el entrecruzamiento de proteínas.

Se han propuesto diversas alternativas de mecanismos de reacción de formación. Entre ellos el de Richards y Knowles en el cual el glutaraldehído y el grupo ϵ -amino del residuo de lisina interactúan a través de una reacción de tipo Michael como se puede observar en la reacción 2 de la figura 5.

Posteriormente, surgió un mecanismo ligeramente diferente en el cual una reacción de adición ocurría sobre la parte aldéhica del polímero α - β -insaturado (poli- glutaraldehído) para originar una base de Schiff (imina) estabilizada por conjugación, la cual se presenta en la figura a continuación (reacción 1).

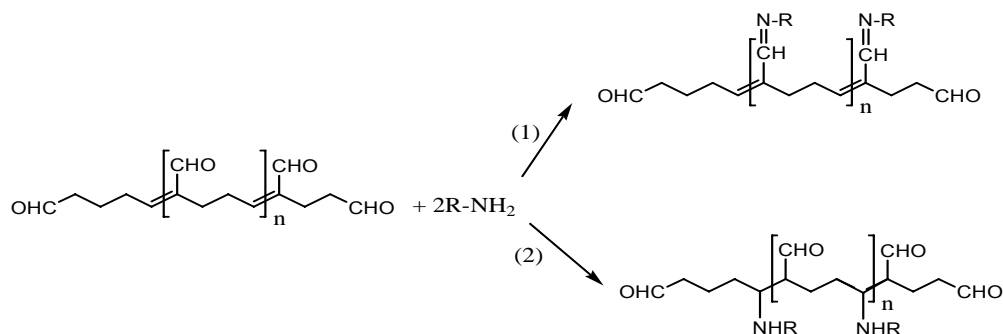


Figura 5. Reacciones del glutaraldehído con proteínas

Bajo condiciones de pH ácidas o neutras el glutaraldehído se presenta como una mezcla de monómeros y como un polímero.

Cada una de estas estructuras puede formar bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico por los residuos de lisina en la proteína como se muestra en la figura 6.

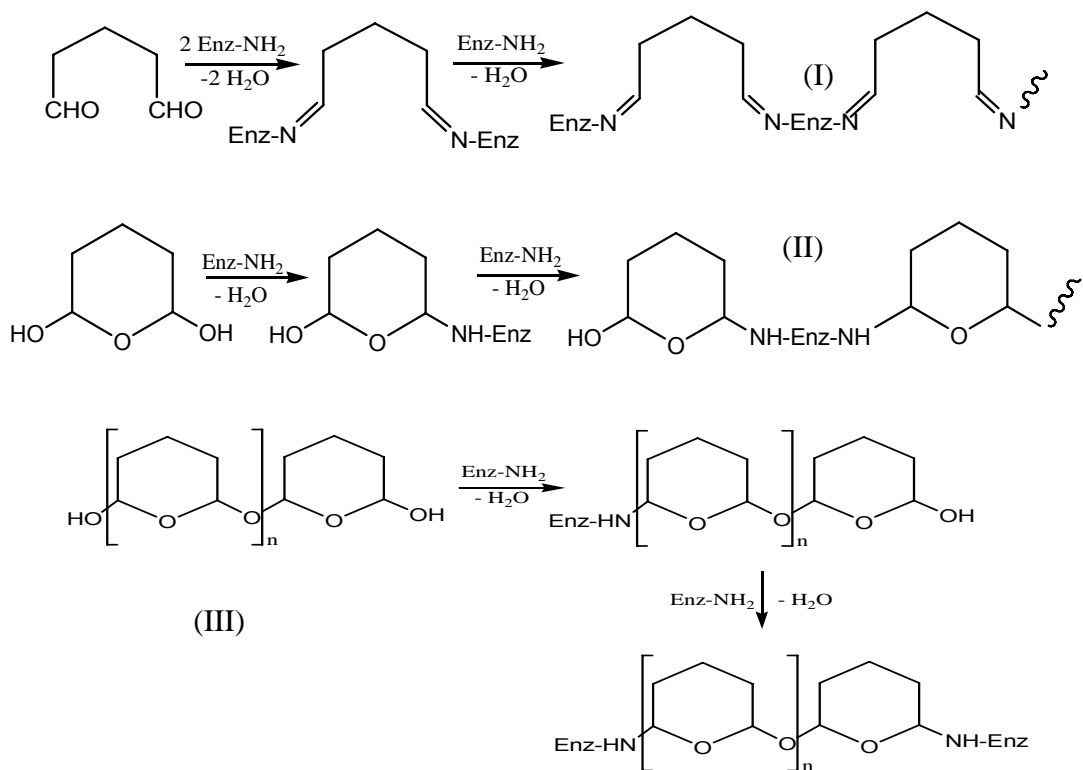


Figura 6. Reacciones del glutaraldehído con proteínas bajo condiciones ácidas y neutras.

Como se ha mencionado anteriormente, las bases de Schiff bajo condiciones ácidas son inestables, por lo que la formación de estas bases entre el grupo amino de la lisina y el aldehído libre (estructural) no es favorecida (estructura I). Esta es más favorable para la estructura del hemiacetal cíclico monomérica (II) y para las formas multiméricas (III).

1.2.8.4 Aplicación para entrecruzar enzimas

El glutaraldehído es usado como un poderoso agente entrecruzante para la inmovilización de enzimas debido a que la reacción procede o se efectúa en soluciones acuosas buffer bajo condiciones cerradas de pH, fuerza iónica y temperatura. Esencialmente se pueden usar dos métodos: i) la formación de una red tridimensional como resultado de un entrecruzamiento intermolecular y ii) el enlace con un soporte insoluble (nylon, silica fundida).

La inmovilización puede ser alcanzada para muchas enzimas en un amplio rango de condiciones, las cuales deben ser elegidas según los resultados específicos que se requieran. Estas condiciones se determinan a menudo por ensayo y error porque la insolubilización es críticamente dependiente sobre un delicado balance de factores tales como la naturaleza de la enzima, la concentración tanto de enzima como de agente entrecruzante, el tiempo de reacción, el pH y la fuerza iónica de la solución [9].

2 METODOLOGÍA

2.1 EXTRACCIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

2.1.1 Extracción

Para la extracción enzimática, se empleó el método desarrollado por Sakharov [30]. Se usaron hojas de la palma real (*Roystonea regia*) recolectadas en el área metropolitana de Bucaramanga (Santander). Las hojas fueron llevadas al laboratorio de Bioquímica e ingeniería de proteínas, en donde se les despojó de su nervadura central, se cortaron y se trituraron en molinos de granos el mismo día de su recolección. Se pesaron 400 g de triturado y se dividieron en dos porciones de igual masa, a una de estas se adicionó un buffer de fosfato (pH 4,6) en una relación 1g:4ml, agitando mecánicamente durante 4 horas. A continuación, se filtró y el sobrenadante obtenido se utilizó como solución extractora para la porción restante de triturado, repitiéndose nuevamente el procedimiento descrito anteriormente.

2.1.2 Eliminación de pigmentos

En esta etapa se utilizó el método de partición en 2 capas, para lo cual se procedió a añadir al extracto de las hojas 14% (w/v) de polietilenglicol, y se procedió a agitar hasta su completa disolución. Posteriormente, se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta 10% (w/v) y se agitó hasta que se disolvió por completo. Esta solución se dejó en reposo a temperatura ambiente hasta la formación de dos capas (aproximadamente 12 horas). A continuación se procedió a separar la capa oscura superficial de la capa clara que contiene la peroxidasa. Esta última es almacenada

a 4°C. Esta solución enzimática fue la que se utilizó para el desarrollo de los CLEAs.

2.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford [15]. Este método se utilizó por ser rápido, reproducible y sensible para cuantificar proteínas, sin interferencias por la presencia de aminoácidos y carbohidratos.

La concentración de proteínas se obtuvo por interpolación con una curva de calibrado (anexo A) que correlacionó la concentración de proteína con la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® Nova 400, utilizando como patrón la albúmina de suero de bovino (BSA). La concentración de proteínas se expresa en mg de proteína por ml de solución. Todos los análisis se desarrollaron por triplicado.

2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PEROXIDASA

La actividad catalítica de la peroxidasa se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción; utilizando como sustrato guayacol y determinando la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol, a 470 nm y utilizando como coeficiente de extinción molar del producto $5200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Preparación del sustrato

El sustrato utilizado para la determinación de la actividad catalítica de la peroxidasa se preparó adicionando a 20 ml de buffer fosfato 10 mM (pH 6.0), 20 μL de H_2O_2 al 30% (v/v) y 40 μL de guayacol [30].

Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática.

Se adicionaron 100 μ L de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) a 3.0 ml de sustrato y se siguió la reacción de formación del producto de reacción a 470 nm como se ha descrito previamente. Una unidad de peroxidasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de guayacol por minuto bajo condiciones de pH 6.0 y temperatura de 25 °C. La actividad específica fue expresada como unidades de actividad de peroxidasa por miligramo de proteína.

2.4 ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE LA PEROXIDASA DE LA PALMA REAL:

Para la elaboración de los agregados entrecruzados se mantuvieron constantes los factores que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Factores constantes en la elaboración de agregados entrecruzados.

Factor	valor constante
pH	6,0
temperatura de reacción	4 °C

Se seleccionaron etanol, acetona y polietilenglicol de peso molecular 10000 (PEG PM-10000) como agentes precipitantes y glutaraldehído como agente entrecruzante. Se realizó una selección de las variables que tenían una mayor incidencia sobre la actividad catalítica del agregado entrecruzado. Para la optimización cuantitativa de estas variables se llevó a cabo un diseño experimental factorial multinivel, el cual consistió de 27 ejecuciones para cada agente precipitante. El orden de los experimentos fue aleatorio, lo cual permitió despreciar el efecto de variables ocultas. Las variables estudiadas y la matriz del diseño se presentan en las tablas 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5. Condiciones experimentales en la selección de variables significativas de la inmovilización.

factor	nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	nivel alto (1)
Concentración precipitante (%v/v)	50	70	90
Concentración glutaraldehído (%p/v)	0,5	1	2
Tiempo de reacción (h)	6	12	18

Tabla 6. Matriz del diseño experimental

Experiencia Nº	Concentración precipitante	concentración glutaraldehído	tiempo de reacción
1	-1	0	-1
2	0	-1	-1
3	0	0	-1
4	-1	-1	1
5	1	0	1
6	0	0	0
7	-1	0	1
8	0	1	-1
9	-1	-1	-1
10	-1	0	0
11	1	-1	-1
12	-1	-1	0
13	-1	1	1
14	0	0	1
15	-1	1	0
16	-1	1	-1
17	1	1	-1
18	1	0	0
19	0	-1	0
20	0	1	1
21	1	1	1
22	1	-1	0
23	0	1	0
24	1	-1	1
25	1	1	0
26	1	0	-1
27	0	-1	1

El proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real se llevó a cabo como se describe en la figura 7.

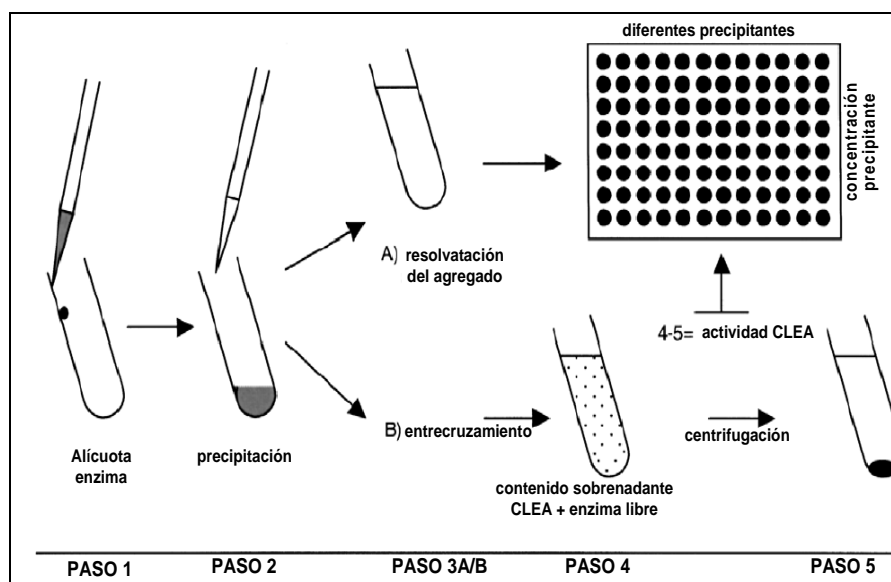


Figura 7. Elaboración de agregados entrecruzados (CLEA) [7].

Procedimiento para la elaboración de los agregados entrecruzados

Paso 1: se transfirió un volumen de 0.3 ml de la enzima en un tubo de ensayo.

Paso 2. Etapa de precipitación

Al tubo de ensayo conteniendo peroxidasa de palma real se le adicionaron 3.0 ml de agente precipitante seleccionado (etanol, acetona y polietilenglicol PM 10000), en relación, 50, 70, 90 % (v/v).

Paso 3A. Resolvatación del agregado

100 μ L del agregado de peroxidasa formado fueron resolvatados en una solución buffer de fosfato de potasio 10 mM de pH 6, su actividad catalítica se determinó tal como se describe en la sección 2.3.

Paso 3B. Entrecruzamiento del agregado formado

Al agregado de peroxidasa formado se le adicionó glutaraldehído como agente entrecruzante a concentraciones de 0,5, 1 y 2 %, el cual reaccionó con los grupos amino presentes en la superficie de la enzima, permitiendo su posterior insolubilización.

Paso 4. Medición de la actividad catalítica del agregado entrecruzado conteniendo enzima libre

De la mezcla acuosa conteniendo agregados entrecruzados de peroxidasa y enzima libre que no reaccionó con el glutaraldehído, se extrajo un volumen de 100 μ L y se diluyó en una relación de (1:100) con buffer fosfato 10 mM de pH 6, para determinar su actividad catalítica tal como se describe en la sección 2.3.

Paso 5. Determinación de proteínas y medición de la actividad catalítica del sobrenadante

Se centrifugó la mezcla acuosa conteniendo los agregados entrecruzados insolubles y la enzima libre. Se determinó la concentración de proteínas presentes tal como lo describe el método colorimétrico de Bradford [15] para evaluar el nivel de entrecruzamiento. Así mismo, se determinó la actividad catalítica como se describe en la sección 2.3.

La actividad catalítica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real se determinó como la diferencia entre la actividad catalítica del paso 4 y la actividad del paso 5.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), técnica estadística de contraste de hipótesis donde se comparan medias, para evaluar la importancia de las variables, utilizando el programa computacional de análisis estadístico STATGRAPHICS plus 5.1.

2.6 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECRUZADOS DE PEROXIDASA

A partir de los datos estadísticos obtenidos y de los gráficos de superficie de respuesta de actividad específica, se seleccionó el agente precipitante, que presentó los mejores rendimientos para la elaboración de los agregados entrecruzados y se seleccionaron las mejores condiciones para su optimización.

2.7 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECRUZADOS ELABORADOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS

Los agregados entrecruzados de la peroxidasa elaborados bajo las condiciones óptimas, fueron incubados a diferentes temperaturas (80°C, 92°C, 96°C) en 3 ml de solución buffer de fosfato 10 mM de pH 6. Periódicamente (5, 15, 30, 45 min), fueron retiradas muestras del medio de incubación a las cuales se les determinó su actividad enzimática como se describe en la sección 2.3 del presente trabajo.

3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 EXTRACCIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

Para la extracción de la peroxidasa de la palma real se usó un factor de 1 g/ 4mL entre el peso de hojas y el volumen de la solución extractora. Se usó esta relación debido a que si se utiliza un factor de relación menor, el volumen del extracto será muy alto, obteniéndose una concentración de peroxidasa muy baja. Por la misma razón, la extracción de la peroxidasa se realizó usando la misma solución extractora en las dos etapas empleadas en la extracción. Todo esto nos permitió aumentar la concentración de la peroxidasa en el extracto.

La etapa siguiente a la extracción de la peroxidasa fue la eliminación de una alta concentración de pigmentos. Se ha descrito en la literatura que la polivinilpirrolidona insoluble se puede utilizar para absorber pigmentos de plantas [16]. Sin embargo, el uso de este polímero tiene algunas desventajas experimentales. También es conocido que para separar y purificar proteínas se usa el método de partición bifásica utilizando polímeros sintéticos, por ejemplo el polietilenglicol (PEG) soluble, en presencia de una sal, la cual para nuestro caso fue el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Con este método se logró una disminución del volumen del extracto, que permitió, como se mencionó anteriormente, aumentar la concentración de peroxidasa en el extracto. Con este proceso de extracción se obtuvo una preparación de la enzima soluble que poseía una actividad específica de 910 (U/mg).

3.2 ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PEROXIDASA SOLUBLE

La actividad catalítica de la peroxidasa fue determinada para diferentes diluciones de la enzima obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Actividad catalítica de la peroxidasa soluble de la palma real

Dilución	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1/10	90	900
1/50	100	1000
1/75	75	750
1/100	90	900
1/500	100	1000
Promedio	91 ±10	910 ±102

Esto permitió determinar el rango de linealidad y el efecto de dilución de la enzima sobre la actividad catalítica de la peroxidasa de palma real

3.3 AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA UTILIZANDO ETANOL COMO AGENTE PRECIPITANTE

La elaboración de los agregados entrecruzados de peroxidasa utilizando etanol como agente precipitante se desarrolló tal como se describe en la sección 2.4 de la metodología del presente trabajo. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 8.

Tabla 8. Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados utilizando etanol como agente precipitante.

experiencia Nº	concentración precipitante	concentración glutaraldehído	tiempo reacción	Actividad específica (U/mg)
1	-1	0	-1	61
2	0	-1	-1	1700
3	0	0	-1	966
4	-1	-1	1	83
5	1	0	1	478
6	0	0	0	2000
7	-1	0	1	288
8	0	1	-1	1079
9	-1	-1	-1	34
10	-1	0	0	244
11	1	-1	-1	1018
12	-1	-1	0	61
13	-1	1	1	295
14	0	0	1	1927
15	-1	1	0	295
16	-1	1	-1	81
17	1	1	-1	459
18	1	0	0	1888
19	0	-1	0	913
20	0	1	1	780
21	1	1	1	449
22	1	-1	0	1476
23	0	1	0	600
24	1	-1	1	502
25	1	1	0	323
26	1	0	-1	1948
27	0	-1	1	904

En la **tabla 8** se observa que los valores de actividad enzimática obtenidos para los agregados entrecruzados de peroxidasa formados bajo las condiciones estudiadas, presentan en algunos casos actividades mayores que los de la enzima soluble, la cual posee una actividad de 910 U/mg, lográndose en el mejor de los casos un incremento en la actividad específica de la enzima en un factor de 2,2 veces.

Además, se determinó el rendimiento de la inmovilización de los agregados formados. Tanto la actividad específica como la cantidad de proteína contactada de la enzima soluble siempre se mantuvieron constantes en un valor de 910 U/mg y 0.1 mg respectivamente. Los rendimientos del proceso de inmovilización se presentan en la **tabla 9**.

Tabla 9. Eficiencias de la actividad específica de los agregados entrecruzados elaborados con etanol como agente precipitante.

experiencia N°	Rendimiento inmovilización (%)
1	7
2	65
3	51
4	8
5	34
6	71
7	24
8	54
9	4
10	21
11	53
12	7
13	25
14	68
15	25
16	8
17	34
18	68
19	50
20	46
21	33
22	62
23	40
24	36
25	26
26	69
27	50

De la **tabla 9** se observa que la actividad específica de los agregados entrecruzados de peroxidasa se incrementó hasta en un 71% con respecto al de la enzima soluble, cuando se usó una concentración de etanol del 70% (v/v), glutaraldehído al 1% (p/v) y un tiempo de reacción de 12 h. Se determinó la cantidad de proteína inmovilizada para las condiciones estudiadas obteniéndose rendimientos de inmovilización de proteína contactada hasta del 57%. La **tabla 10** recoge los rendimientos de entrecruzamiento de la proteína contactada en las diferentes experiencias realizadas.

Tabla 10. Porcentaje de entrecruzamiento de proteína contactada con etanol como precipitante.

experiencia N°	Rendimiento (%)
1	10
2	32
3	19
4	15
5	19
6	57
7	27
8	44
9	6
10	36
11	15
12	19
13	23
14	53
15	19
16	23
17	25
18	40
19	32
20	14
21	15
22	23
23	40
24	19
25	49
26	53
27	27

Con los datos de la tabla 8 se realizó una selección de las variables que tienen una mayor incidencia en la elaboración de los agregados entrecruzados de la enzima.

El gráfico de Pareto muestra cada uno de los efectos estimados de las variables y sus interacciones en orden decreciente de magnitud sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de peroxidasa. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado que es el efecto estimado dividido por su error estándar. Esto equivale a calcular un estadístico-t para cada efecto. La línea vertical que aparece en el gráfico permite determinar qué efectos son estadísticamente significativos en un 95% de nivel de confianza. El diagrama de Pareto se presenta en el gráfico 8.

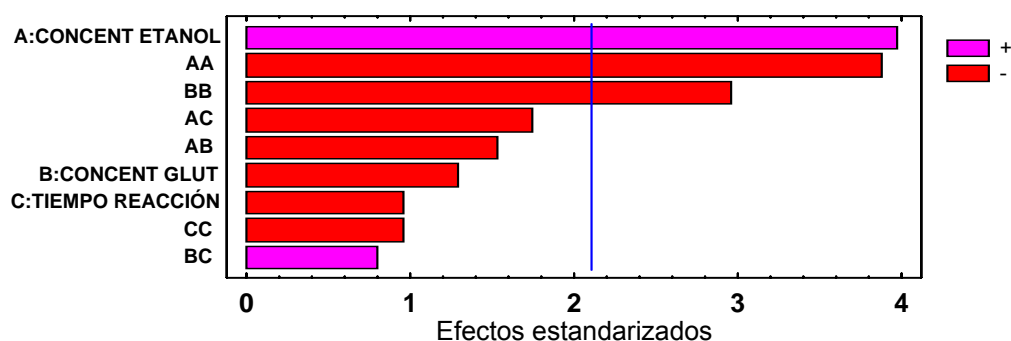


Figura 8. Diagrama de Pareto para las variables del proceso de elaboración de los agregados entrecruzados con etanol como agente precipitante.

A partir de la **figura 8** se estableció que el tiempo de entrecruzamiento no influye de forma significativa sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de peroxidasa, por tal razón no se tuvo en cuenta para el análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para probar la importancia estadística de las variables, utilizando el programa STATGRAPHICS plus 5.1 en el cual se observó que la concentración de etanol influye de manera significativa sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa. Según el ANOVA el porcentaje de contribución de esta variable es del 95%. Las interacciones presentes en la tabla anova (AA) y (BB) son propias de las interacciones de las variables concentración de etanol y concentración del glutaraldehído respectivamente, las cuales también inciden con un 95% de significancia sobre la actividad específica de los agregados. La tabla 11 resume el análisis de ANOVA.

Tabla 11. Tabla de ANOVA para las experiencias con etanol.

variable	suma de cuadrados	grados de libertad	P-valor
A: concent etanol	2,8E+06	1	0,0012
AA	2,7E+06	1	0,0015
BB	1,6E+06	1	0,0115
error total	4,9E+06	23	
total (corr)	1,2E+07	26	

Es importante señalar de la **tabla 12**, que el valor estadístico P determina el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa. Los valores p mostrados son significativos al nivel 0.05 con lo cual hay evidencia que la concentración de etanol, AA, BB, tienen efecto sobre la actividad específica.

Posterior al análisis estadístico se elaboraron los gráficos de superficie de respuesta y de superficie de contorno con el objeto de hallar la combinación de niveles en los factores que permiten maximizar la actividad específica de los agregados entrecruzados. En las figuras 9 y 10 se muestran los gráficos de superficie de respuesta y de superficie de contorno respectivamente, para los resultados obtenidos de la tabla 8.

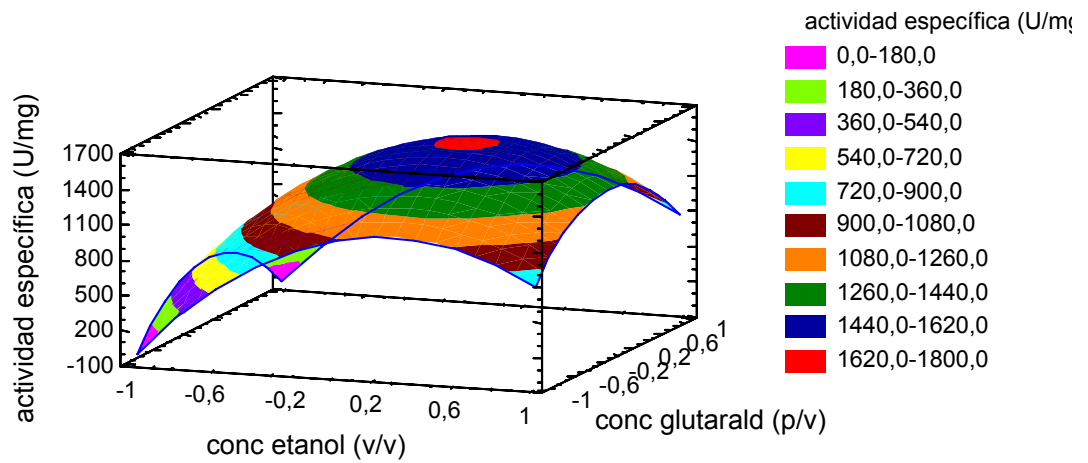


Figura 9. Superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados con etanol como agente precipitante.

La **figura 9** muestra la actividad específica estimada como una función de la concentración del etanol y la concentración del glutaraldehído. La altura de la superficie representa el valor de actividad específica.

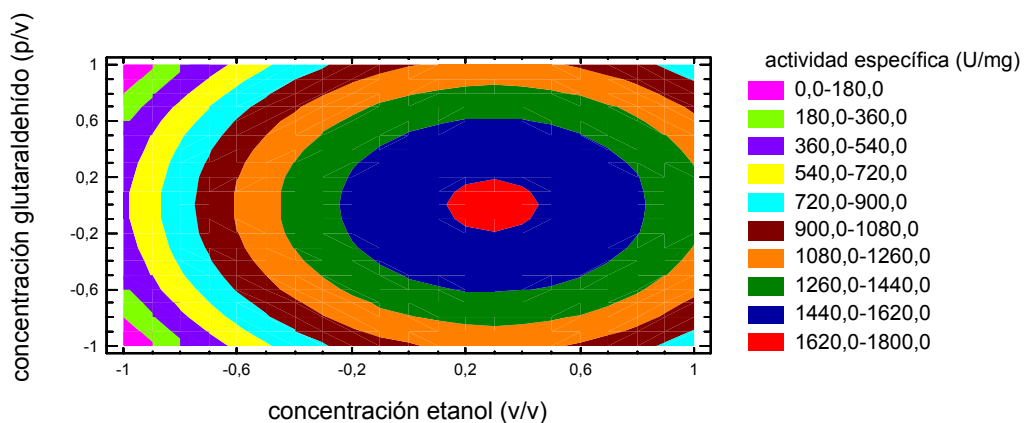


Figura 10. Contorno de superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa con etanol como agente precipitante

La **figura 10** muestra los contornos de la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa como una función de la concentración de etanol y de la concentración de glutaraldehído. Cada línea del contorno representa combinaciones de concentración de etanol y concentración de glutaraldehído que dan un valor seleccionado de actividad específica.

A partir de la **Figura 9** se realizó la estimación de las condiciones de operación óptimas, observándose que se obtiene un valor máximo de actividad específica para una concentración de etanol del 78% (v/v) y una concentración de glutaraldehído del 1.0% (p/v).

Las experiencias realizadas junto con el análisis estadístico previo, permitieron determinar que la concentración del etanol como agente precipitante incidió de manera directa sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados de la peroxidasa.

Considerando el rol que juega el agua en la biocatálisis y las interacciones enzima-solvente que mantienen la más adecuada conformación tridimensional estable del biocatalizador, parece lógico suponer que un solvente orgánico como el etanol no debería distorsionar la estructura nativa de la enzima ni las interacciones que contribuyen al mantenimiento de la conformación nativa, ya que el mismo posee la capacidad de mantener las interacciones solvofóbicas de modo semejante al agua, esto de acuerdo a lo citado por Khmelnsky y Ray [18] después de estudiar la capacidad de diferentes solventes orgánicos para establecer interacciones solvofóbicas en la formación de miscelas reversas.

En las experiencias se observó que los agregados entrecruzados de la peroxidasa elaborados con etanol al 70% (v/v) y glutaraldehído al 1% (p/v) mostraban actividades superiores al de la enzima soluble, este efecto podría deberse a que algunos alcoholes, dioles y polioles bajo determinadas condiciones actúan como

agentes estabilizantes de la estructura enzimática, lo cual se ha atribuido a su capacidad de establecer puentes de hidrógeno logrando redistribuir las interacciones críticas producto de la reducción de la capa hidratante que rodea a la enzima, según Rodger y Durrant [25] en su estudio sobre el efecto de solventes miscibles en agua sobre la actividad. Por el contrario los agregados entrecruzados elaborados con etanol al 90% (v/v) presentaron actividades inferiores a los de la enzima nativa, esto podría deberse a que el solvente orgánico reemplaza al agua en la capa superficial de la proteína y distorsiona el estado de hidratación de la molécula, en una proporción tal, que la conformación activa catalíticamente en solución no se establece, y como consecuencia de ello, la enzima se desnaturaliza y eventualmente precipita. Estos resultados están de acuerdo con los estudios llevados a cabo por Sinanoglu y Abdunur [18], quienes estimaron la capacidad de distintos solventes orgánicos para mantener interacciones solvofóbicas.

Se determinó que la interacción propia de la concentración del glutaraldehído causó un efecto significativo sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados de la peroxidasa. Las experiencias determinaron que para una baja concentración de glutaraldehído (0,5% p/v) los rendimientos de inmovilización de proteína son muy bajos, esto debido a que el número de los grupos reactivos funcionales del glutaraldehído bajo esta concentración son reducidos lo cual disminuye la posibilidad de entrecruzamiento con los residuos de lisina presentes en la peroxidasa, lo cual es acorde con lo referenciado por Brown [20] en su investigación. El incremento de la concentración del glutaraldehído hasta un 2% (p/v) permitió alcanzar mejores rendimientos de inmovilización de proteína, esto ocasionado por el incremento del número de los grupos reactivos funcionales del glutaraldehído favoreciéndose la inmovilización. Sin embargo, la actividad expresada por los agregados entrecruzados bajo esta concentración de glutaraldehído disminuía en comparación con los de la enzima soluble, lo que estaría indicando que al ir entrecruzándose una mayor cantidad de enzima, una

mayor proporción de ella no se expresaría debido a problemas estéricos o configuracionales.

3.4 AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA UTILIZANDO ACETONA COMO AGENTE PRECIPITANTE

En la elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa utilizando acetona como agente precipitante, se observó en la etapa de entrecruzamiento un cambio de color en el medio de reacción, lo que evidenció la posible formación de bases de Schiff, producto de la reacción de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de la enzima, con los grupos reactivos del glutaraldehído a través de un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono carbonilo del aldehído, esto de acuerdo a lo propuesto por Kawahara y Takaya [26].

Los agregados entrecruzados de peroxidasa obtenidos bajo las condiciones de estudio presentaron actividades enzimáticas inferiores en comparación con los de la peroxidasa soluble, esto debido a que la acetona reemplaza al agua en la capa superficial de la enzima y distorsiona el estado de hidratación de la molécula, lo que conlleva a una alteración de las interacciones (principalmente puentes de Hidrógeno) que mantienen estable a la enzima. La **tabla 12** ilustra los resultados de la actividad enzimática obtenidos para los agregados entrecruzados de peroxidasa formados.

Tabla 12. Matriz de resultados para los agregados entrecruzados elaborados con acetona como agente precipitante.

experiencia Nº	concentración precipitante	concentración glutaraldehído	tiempo de reacción	actividad específica (U/mg)
1	-1	0	-1	61
2	0	-1	-1	229
3	0	0	-1	424
4	-1	-1	1	58
5	1	0	1	7
6	0	0	0	318
7	-1	0	1	85
8	0	1	-1	0
9	-1	-1	-1	1
10	-1	0	0	178
11	1	-1	-1	4
12	-1	-1	0	36
13	-1	1	1	162
14	0	0	1	282
15	-1	1	0	669
16	-1	1	-1	165
17	1	1	-1	117
18	1	0	0	46
19	0	-1	0	500
20	0	1	1	20
21	1	1	1	19
22	1	-1	0	75
23	0	1	0	59
24	1	-1	1	40
25	1	1	0	51
26	1	0	-1	91
27	0	-1	1	124

Se comparó el rendimiento de la actividad enzimática de los agregados entrecruzados frente al de la peroxidasa soluble, corroborándose que en el proceso de inmovilización, bajo las condiciones de estudio, utilizando acetona como agente precipitante, la enzima sufrió la pérdida de su actividad. La tabla 13 detalla los rendimientos de actividad enzimática de los agregados entrecruzados.

Tabla 13. Rendimientos de la actividad enzimática de los agregados entrecruzados con acetona como agente precipitante.

Experiencia nº	Rendimiento (%)
1	6
2	20
3	32
4	6
5	1
6	26
7	9
8	0
9	0
10	16
11	0
12	4
13	15
14	24
15	42
16	15
17	11
18	5
19	35
20	2
21	2
22	8
23	6
24	4
25	5
26	9
27	12

Además, se determinó la cantidad de proteína entrecruzada para las condiciones estudiadas obteniéndose rendimientos de entrecruzamiento hasta del 62%.

La **Tabla 14** recoge los rendimientos de entrecruzamiento en las diferentes experiencias realizadas.

Tabla 14. Rendimientos de entrecruzamiento de proteína contactada con acetona como agente precipitante.

experiencia Nº	Rendimiento (%)
1	13
2	38
3	50
4	8
5	50
6	46
7	29
8	0
9	5
10	38
11	33
12	25
13	38
14	46
15	63
16	33
17	54
18	42
19	38
20	50
21	54
22	21
23	42
24	54
25	46
26	58
27	38

A partir de los resultados mostrados en la **tabla 12** se determinó a través de un gráfico de Pareto, que las concentraciones de acetona y glutaraldehído, ejercen una influencia significativa sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados de la peroxidasa. La **figura 11** muestra el gráfico de Pareto para el análisis de las variables del proceso de entrecruzamiento utilizando acetona como precipitante.

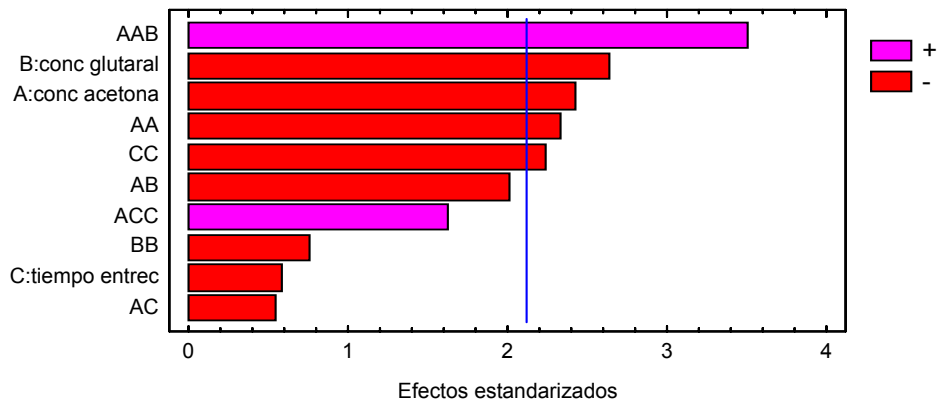


Figura 11. Diagrama de Pareto para las variables del proceso de entrecruzamiento con acetona como agente precipitante.

El análisis de varianza (ANOVA) expuesto en la **tabla 15**, muestra el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables, sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa. El valor estadístico P para cada uno de los efectos indica niveles de confiabilidad del 95%.

Tabla 15. Tabla de ANOVA para las experiencias con acetona

variable	suma de cuadrados	GI	valor-P
A:concent acetona	51584,7	1	0,0405
B:concent glutaraldehído	99691,3	1	0,0223
AA	77657,1	1	0,041
CC	72138,7	1	0,0481
ABB	175868	1	0,0036
error total	344031	21	
Total (corr.)	723415	26	

Las **Figuras 12 y 13** muestran los gráficos de superficie de respuesta y contorno respectivamente, para los resultados expuestos en la tabla 12.

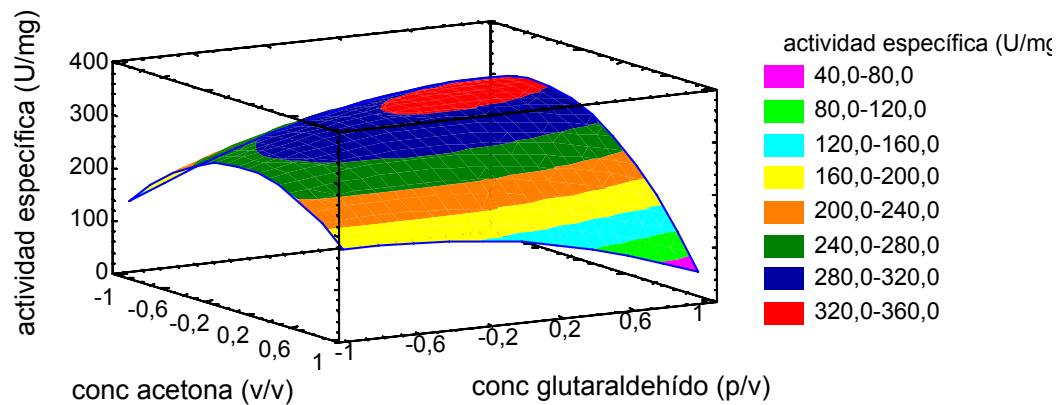


Figura 12. Superficie de respuesta para las experiencias con acetona como agente precipitante.

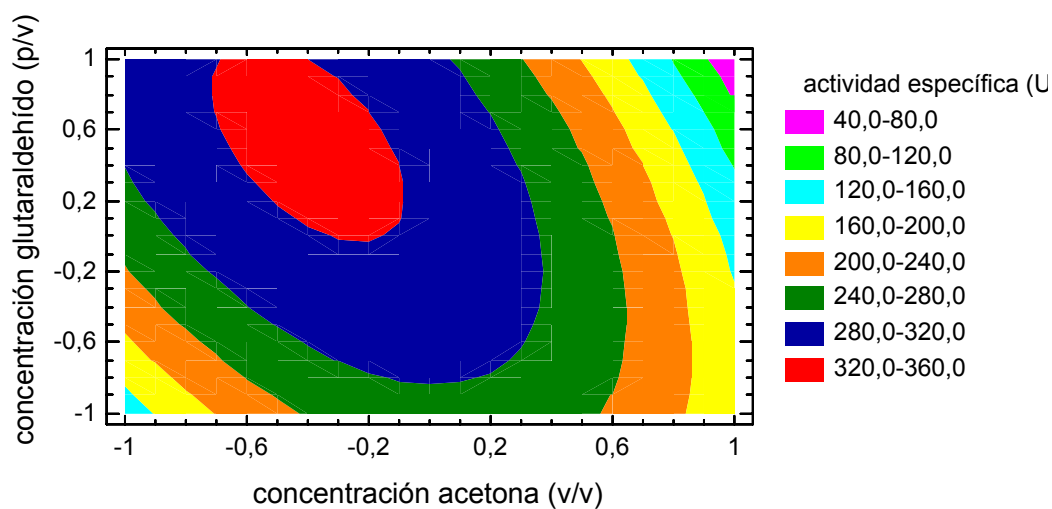


Figura 13. Contorno de superficie de respuesta para las experiencias con acetona como agente precipitante.

A partir del gráfico de superficie de respuesta (Figura 12), se corroboró que en la elaboración de los agregados entrecruzados de peroxidasa, el uso de acetona como agente precipitante causa un efecto desestabilizante en la estructura proteica de la enzima, el cual se ve reflejado en la disminución de la actividad específica del agregado formado. Es importante señalar, que una posible causa para esta desestabilización de la enzima, es la miscibilidad que presenta la acetona en el agua, lo que le permite solubilizar la capa de agua que rodea y mantiene catalíticamente activa a la enzima, lo que provocaría un cambio conformacional en la molécula de la peroxidasa. Sin embargo, este efecto se evita en parte llevando a cabo la precipitación de la proteína a bajas temperaturas, donde la estructura de la proteína presenta baja flexibilidad conformacional [27].

Según el análisis estadístico, la concentración de acetona y de glutaraldehído afectaron significativamente la actividad específica de los agregados entrecruzados de peroxidasa. Las 27 experiencias realizadas permitieron determinar que una concentración de acetona de 50% v/v no ocasionaba la precipitación de la enzima, mientras que a una mayor concentración (90% v/v), la enzima se desnaturalizaba. En cuanto a la concentración del glutaraldehído se estableció que una concentración de 0.5% (p/v) dificultaba el entrecruzamiento de los agregados físicos. Esto podría deberse a que el número de los grupos reactivos funcionales del glutaraldehído son reducidos a concentraciones bajas, lo cual disminuiría la posibilidad de entrecruzamiento con los residuos de lisina presentes en la peroxidasa. Por el contrario, la concentración al 2% (p/v) permitió alcanzar mejores rendimientos de inmovilización de proteína, debido posiblemente al incremento en el número de los grupos reactivos funcionales del glutaraldehído que favorecen el entrecruzamiento proteico. Sin embargo, la actividad expresada por los agregados entrecruzados bajo esta concentración de glutaraldehído disminuía en comparación con los de la enzima soluble, lo que estaría indicando que al ir entrecruzándose una mayor cantidad de enzima, se estaría presentando una mayor distorsión de la estructura de la proteína [19].

3.5 AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA UTILIZANDO PEG (PM 10000) COMO AGENTE PRECIPITANTE.

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos para los agregados entrecruzados de peroxidasa utilizando polietilenglicol como agente precipitante.

Tabla 16. Matriz de resultados para los agregados entrecruzados de peroxidasa utilizando PEG.

experiencia Nº	concentración PEG	concentración glutaraldehído	tiempo reacción	actividad específica (U/mg)
1	-1	0	-1	568
2	0	-1	-1	301
3	0	0	-1	669
4	-1	-1	1	522
5	1	0	1	1863
6	0	0	0	1038
7	-1	0	1	595
8	0	1	-1	124
9	-1	-1	-1	488
10	-1	0	0	592
11	1	-1	-1	1301
12	-1	-1	0	512
13	-1	1	1	178
14	0	0	1	1041
15	-1	1	0	183
16	-1	1	-1	6
17	1	1	-1	11
18	1	0	0	1997
19	0	-1	0	391
20	0	1	1	61
21	1	1	1	8
22	1	-1	0	1355
23	0	1	0	90
24	1	-1	1	1459
25	1	1	0	5
26	1	0	-1	1724
27	0	-1	1	426

A su vez, se determinó el rendimiento de la actividad específica de la peroxidasa insolubilizada bajo las condiciones de estudio frente al de la peroxidasa soluble. La **tabla 17** muestra los rendimientos de la actividad específica de los agregados entrecruzados de peroxidasa formados bajo las condiciones de estudio.

Tabla 17. Rendimiento de la actividad específica de los agregados entrecruzados con PEG como agente precipitante.

Experiencia Nº	rendimiento actividad %
1	38
2	25
3	42
4	36
5	67
6	53
7	40
8	12
9	35
10	39
11	59
12	36
13	16
14	53
15	17
16	1
17	1
18	69
19	30
20	6
21	1
22	60
23	9
24	62
25	1
26	65
27	32

Se evaluó el rendimiento del entrecruzamiento de la proteína contactada en el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados bajo las condiciones de

estudio. Los resultados mostraron que los agregados entrecruzados alcanzaron actividades específicas superiores a las de la enzima soluble, obteniéndose porcentajes de entrecruzamiento de proteína hasta de un 64%. La **tabla 18** muestra el rendimiento del entrecruzamiento de proteína contactada para cada experiencia.

Tabla 18. Rendimiento del entrecruzamiento de proteína contactada en la elaboración de los agregados entrecruzados con PEG como precipitante.

Experiencia	Rendimiento
Nº	%
1	45
2	38
3	48
4	28
5	59
6	44
7	25
8	43
9	17
10	21
11	28
12	18
13	43
14	41
15	23
16	12
17	46
18	64
19	16
20	33
21	53
22	42
23	26
24	42
25	54
26	57
27	22

A partir de los resultados mostrados en la **tabla 16**, se determinó a través de un gráfico de Pareto, que las concentraciones de PEG y glutaraldehído, ejercen una influencia significativa sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real. La **Figura 14** muestra el gráfico de Pareto para el análisis de las variables del proceso de entrecruzamiento utilizando PEG como precipitante.

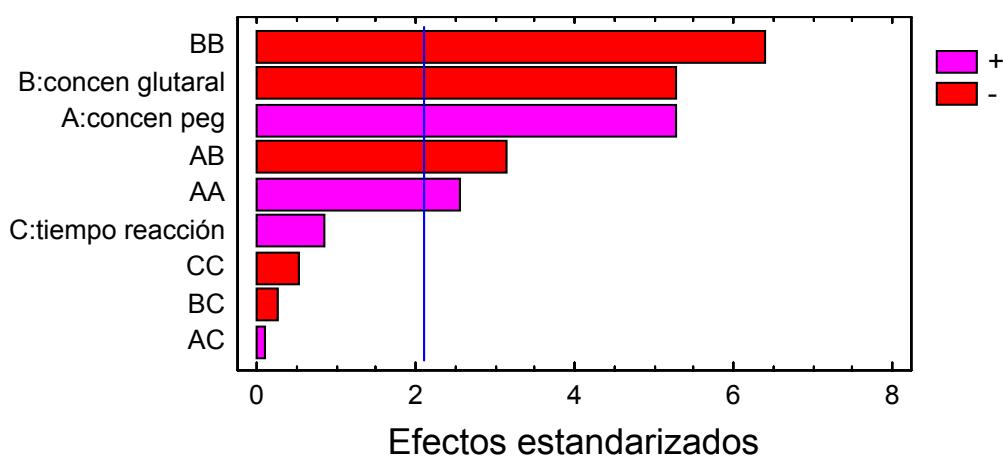


Figura 14. Diagrama de Pareto para las variables utilizadas en la elaboración de los agregados entrecruzados con PEG como agente precipitante.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los resultados mostrados en la tabla 16 a través del programa STATGRAPHICS plus 5.1. El análisis permitió determinar el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables sobre la actividad enzimática específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa. El valor estadístico P para cada uno de los efectos indica niveles de confiabilidad del 95%. La tabla 19 resume el análisis de ANOVA.

Tabla 19. Tabla ANOVA para las experiencias con PEG.

factores	suma de cuadrados	grados de libertad	valor-p
A: concentración PEG	2,05E+06	1	0,000
B: concent glutaraldehído	2,06E+06	1	0,000
AA	478838	1	0,012
AB	718341	1	0,003
BB	3,01E+06	1	0,000
error total	1,34E+06	21	
Total (corr)	9,66E+06	26	

De la tabla 19 se puede observar que los factores; concentración de PEG, concentración del glutaraldehído, interacciones AA, BB; AB presentan valores p significativos al nivel 0.05, con lo cual hay evidencia que tienen efecto sobre la actividad específica.

Las **Figuras 15** y **16** muestran la superficie de respuesta y de contorno respectivamente, para las experiencias con PEG como agente precipitante.

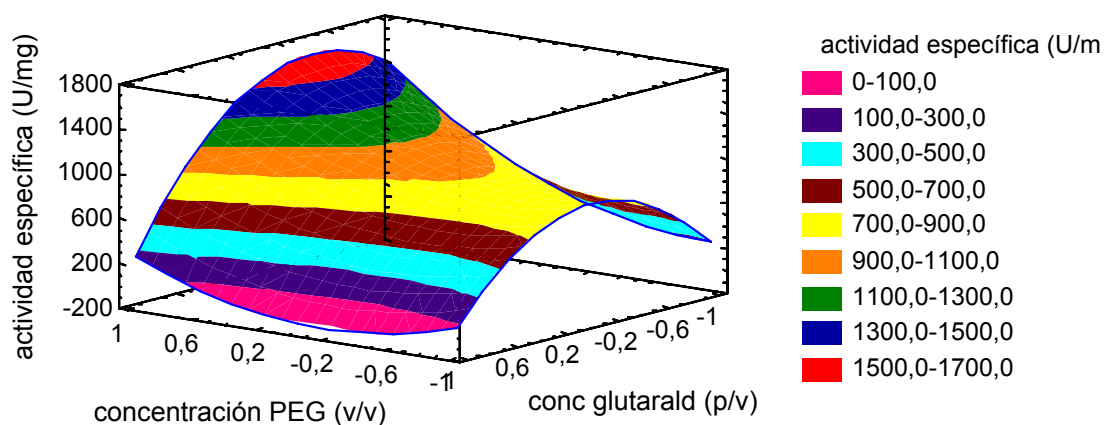
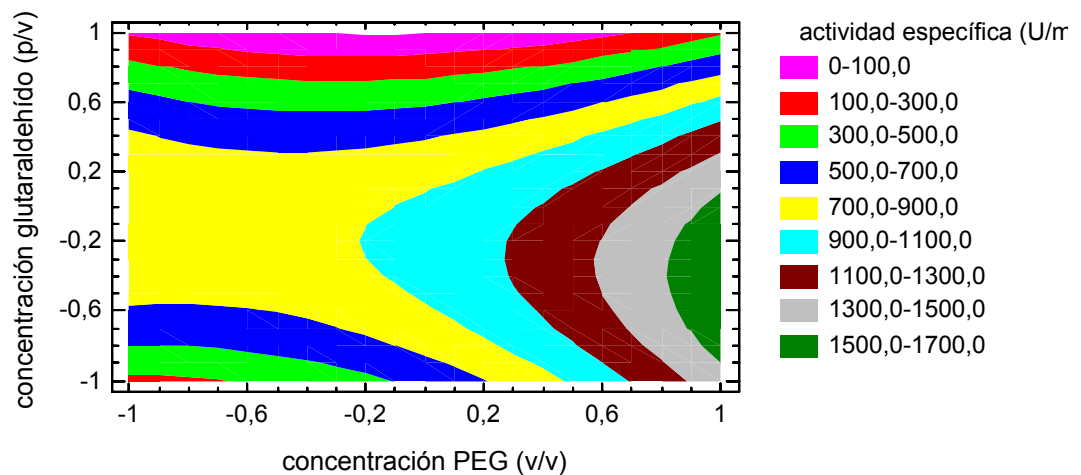


Figura 15. Superficie de respuesta para las experiencias con PEG como agente precipitante.



Figuras 16. Contorno de superficie de respuesta para las experiencias con PEG como agente precipitante.

Por inspección directa de las líneas de nivel de los gráficos 5 y 6, se observó que se obtiene un valor máximo de actividad específica para una concentración de polietilenglicol del 90% (v/v) y una concentración de glutaraldehído del 0,8% (p/v).

En la elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa, la concentración del polietilenglicol influyó de manera significativa, lo cual se evidenció en la actividad enzimática de los agregados entrecruzados formados. Además, se observó que los agregados entrecruzados elaborados bajo una concentración del PEG de 50% (v/v) presentaban actividades específicas inferiores en comparación con los de la enzima soluble. Esto es posiblemente ocasionado por una baja precipitación de la enzima, lo cual dificultó el entrecruzamiento con el glutaraldehído. Por el contrario, los agregados entrecruzados elaborados con PEG al 90% (v/v) presentaron buenos rendimientos de actividad específica, con una alta precipitación de la enzima, lo cual permite el entrecruzamiento óptimo con el glutaraldehído. Esto permite evitar distorsiones en

la estructura nativa de la enzima y favorecer las interacciones que contribuyen al mantenimiento de la conformación nativa, ya que el PEG posee la capacidad de mantener las interacciones solvofóbicas de modo semejante al agua, lo cual es atribuido a su capacidad de establecer puentes de Hidrógeno. Estos resultados son coherentes con estudios realizados de síntesis o hidrólisis de penicilina G con penicilina acilasa de *Kluyvera citrophila* en glicerol, los cuales mostraron un aumento en sus actividades de síntesis de antibióticos al incrementar la concentración del poliol [27].

Es importante señalar, que la concentración de glutaraldehído influyó de manera significativa en la elaboración de los agregados entrecruzados de peroxidasa, lo cual concuerda con el estudio realizado por Brown [20], en el cual se reportó que una baja concentración del glutaraldehído no forma suficientes entrecruzamientos con los agregados formados por la precipitación de la enzima, en cuanto una concentración elevada ocasiona distorsiones en la estructura de la enzima a causa de los múltiples entrecruzamientos que disminuyen la accesibilidad y acomodación del sustrato en el sitio activo de la enzima, lo cual se ve representado en una pérdida de la actividad enzimática.

3.6 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE PEROXIDASA

A través de los gráficos de superficie de respuesta y de superficie de contorno mostrados en la sección 3.4, se estimó la combinación de niveles en los factores que permiten maximizar la actividad específica de los agregados entrecruzados. Se determinó que para una concentración de etanol del 78% (v/v) y de glutaraldehído del 1% (w/v), se obtendría la máxima actividad específica de los agregados entrecruzados. Para la validación de esta aproximación, se elaboraron los agregados entrecruzados de la peroxidasa bajo estas condiciones

obteniéndose una actividad específica de 2011 U/mg, con lo cual se corroboró el aumento de la actividad del agregado en comparación con la enzima soluble.

3.7 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS ELABORADOS BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMOS

Previo al análisis de la termoestabilidad de los agregados entrecruzados de la peroxidasa, se determinaron las constantes de inactivación de la enzima soluble para determinadas temperaturas. Los resultados permitieron establecer que la enzima soluble empieza a inactivarse a una temperatura de 80°C. La **tabla 20**, muestra los valores de la constante de inactivación para la peroxidasa soluble a diferentes temperaturas.

Tabla 20. Constantes de inactivación de la peroxidasa soluble a diferentes temperaturas.

temperatura (°C)	$k_{inactiv}$ (seg ⁻¹)
80	$6,80 \times 10^{-3}$
90	$1,86 \times 10^{-2}$
91	$3,40 \times 10^{-2}$
92	$14,6 \times 10^{-2}$
96	$29,8 \times 10^{-2}$

Con el conocimiento que la enzima soluble se empieza a inactivar a los 80°C, se tomó esta temperatura como punto de partida para la evaluación de la estabilidad térmica de los agregados entrecruzados. Posteriormente, se evaluó la estabilidad a 92°C y 96°C. La **figura 17** muestra la cinética de inactivación de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real, elaborados bajo las condiciones óptimas, frente a la temperatura.

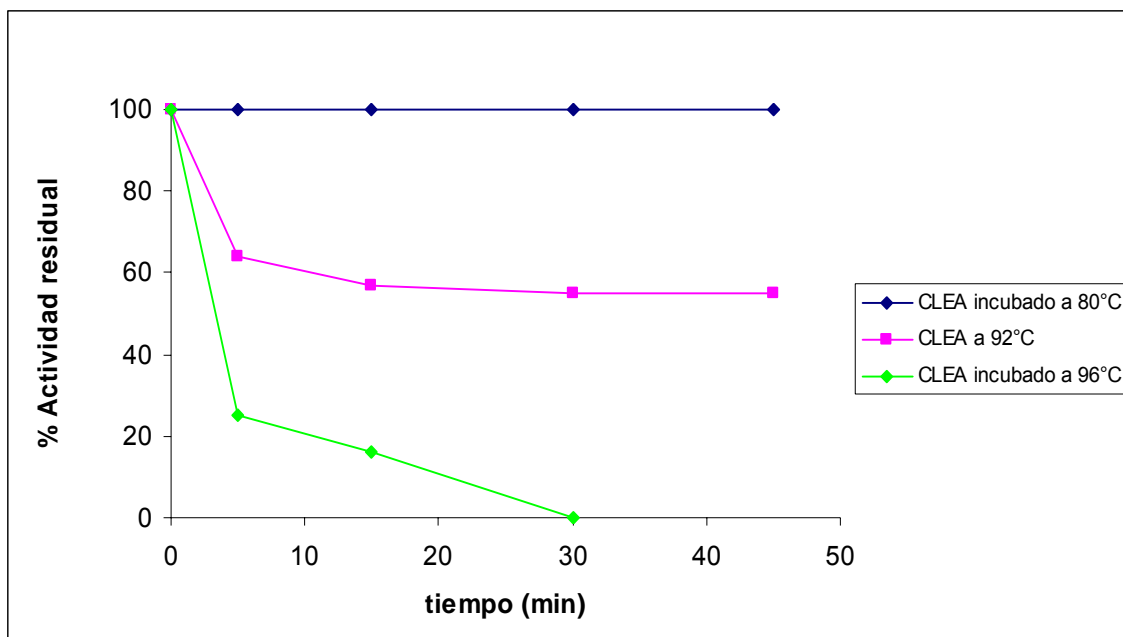


Figura 17. Estabilidad térmica de los agregados entrecruzados de peroxidasa de la palma real a diferentes temperaturas.

De la **figura 17**, se aprecia que los agregados incubados a una temperatura de 80°C conservaron totalmente su actividad original. Con el aumento de la temperatura de incubación a 92°C los CLEA mantuvieron el 55% de su actividad original luego de 45 minutos de calentamiento, reduciéndose la constante de inactivación en un factor de 4×10^4 en comparación con la de la enzima soluble.

La inactivación total de los agregados entrecruzados de la peroxidasa se presentó luego de 30 minutos de calentamiento a 96°C, temperatura bajo la cual la enzima soluble no presentaba actividad.

A 92°C y 96°C, se encontró que los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real obedecen una cinética de primer orden con valores de la constante de inactivación de $3,60 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ y $15,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

Así por ejemplo, los agregados entrecruzados de la peroxidasa mostraron un incremento de 40 veces en la estabilidad térmica en comparación con el de la peroxidasa soluble a una temperatura de 92°C. Este aumento de la estabilidad puede ser ocasionado por el entrecruzamiento intermolecular e intramolecular del glutaraldehído con las moléculas de la enzima, lo que ocasiona una conformación estructural más rígida que hace más resistente a la enzima a cambios conformacionales producidos por la temperatura. La **figura 18** elucida la estabilidad de la enzima soluble y la de los agregados entrecruzados de la peroxidasa para las diferentes temperaturas a las cuales fueron incubados.

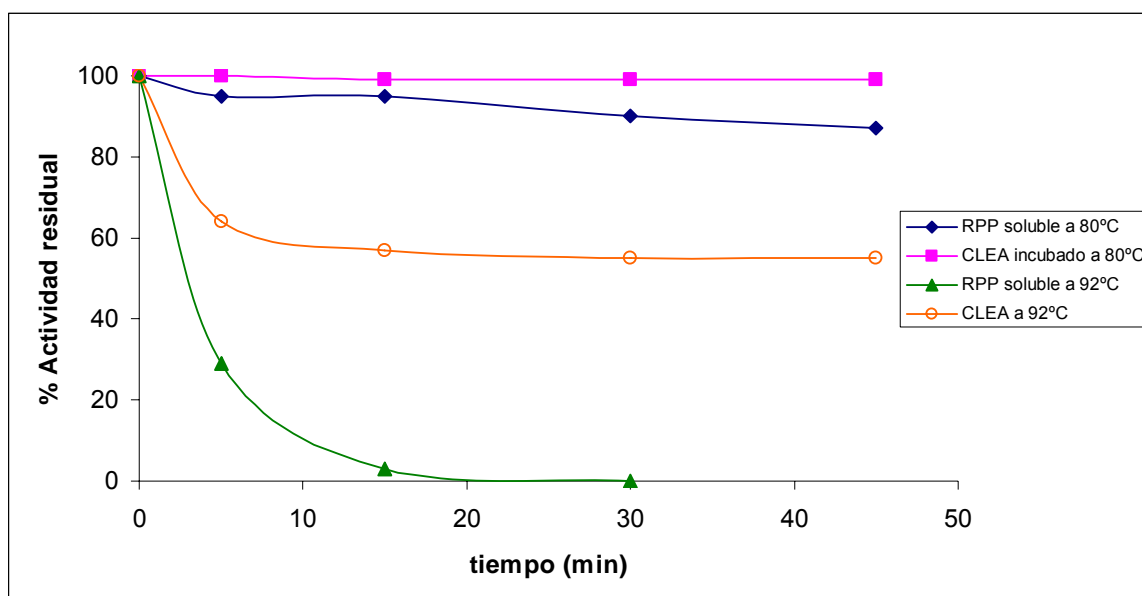


Figura 18. Comparación de la estabilidad térmica de la enzima soluble frente a los agregados entrecruzados de la peroxidasa.

4 CONCLUSIONES

- ✓ Los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*), mostraron un incremento significativo en su actividad específica y estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble.
- ✓ En el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa se estableció que la concentración del agente precipitante (etanol, acetona y polietilenglicol) y la concentración del glutaraldehído como agente entrecruzante, ejercieron una influencia significativa (estadístico $P < 0.05$) sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados formados.
- ✓ El tiempo de reacción de entrecruzamiento del glutaraldehído con los agregados físicos formados en la etapa de precipitación, no influye en el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa.
- ✓ La combinación de niveles en los factores permitió optimizar la elaboración de los agregados entrecruzados. Se determinó que para una concentración de etanol del 78% (v/v) y de glutaraldehído del 1% (p/v) se obtendría la máxima actividad enzimática de los agregados entrecruzados.
- ✓ Los agregados entrecruzados de la peroxidasa se elaboraron bajo las condiciones óptimas estimadas, obteniéndose una actividad específica de 2011 U/mg para el CLEA, con lo cual se corroboró el aumento de la actividad específica del agregado en comparación con la enzima soluble.

- ✓ Los agregados entrecruzados de la peroxidasa elaborados bajo las condiciones óptimas, presentaron una estabilidad térmica superior al de la enzima soluble. Los agregados incubados a una temperatura de 80°C conservaron totalmente su actividad original; al aumentar la temperatura de incubación a 92°C los CLEA mantuvieron el 55% de su actividad luego de 45 minutos de calentamiento.

- ✓ Los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real obedecen una cinética de primer orden a temperaturas de 92° y 96°C, con valores de la constante de inactivación de $3,6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ y $15,34 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto de la concentración de proteína, la temperatura y la velocidad de agitación de la reacción, en la elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*), para determinar la influencia de estos factores sobre la actividad enzimática de los agregados formados.

Realizar un estudio de la efectividad de los agregados entrecruzados de la peroxidasa en la biodegradación de colorantes en efluentes contaminados y en la biotransformación de otras moléculas orgánicas, tales como hidrocarburos poliaromáticos, fenoles, entre otros.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ILLANES Andrés. Biotecnología de enzimas. Ediciones universitarias de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile, (1994), 225-249.

- [2] HINER, N.; HERNANDEZ, J.; ARNAO, B.; GARCIA, F.; ACOSTA, M. “Comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available Horseradish peroxidase isoenzymes A and C”. *Biotech and Bioeng.* (1996), (50), 655-662.

- [3] CASTILLO, John. “Separación y caracterización de las isoenzimas de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*)”. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander, 2001.

- [4] CASTILLO, A.; ARIZA, J. “Extracción y purificación de las peroxidases de las hojas de palma de aceite (*Elais guineensis*) y palma real (*Roystonea regia*)”. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander, 2000.

- [5] CHATTOPADHYAY, K.; MAZUNDAR, S. “Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH”. *Biochemistry.* (2000), (39), 263-270.

- [6] ARROYO, Miguel. "Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications". *Ars Pharmaceutica*. (1999) (39:2), 23-39.
- [7] SHELDON, R.; VAN RANTWIJK, F.; SCHOEVAART, R. "Preparation, Optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)". *Biotechnology and Bioengineering*. (2004) (87:6).
- [8] CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier free?" *Curr opin Biotechnol*. (2004) (14:4), 387-394.
- [9] MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C. "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking". *Biotechniques*. (2004) (37), 790-802.
- [10] GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S. "Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase". *Food Chemistry*, 2005.
- [11] CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. "Cross-linked Enzyme Aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase". *Organic letters*. (2000) (2:10), 1361-1364.

- [12] WILSON, L.; BETANCOR, L.; FERNANDEZ-LORENTE, M. "Cross-linked Aggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure". *Biomacromolecules*. (2004) (5:3).
- [13] CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.; LOPEZ-SERRANO, P. "Cross-linked Enzyme Aggregates with enhanced activity: application to lipases". *Biotechnology letters*. (2002) (24), 1379-1383.
- [14] CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.; VAN LANGEN, L. "Cross-linked Aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics". *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. (2001) 665-670.
- [15] BRADFORD, M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". *Anal. Biochem.* (1976) (72), 248-254.
- [16] CLEMENTE, E.; "Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges". *Phytochemistry*.(1998) (49:1), 29-36.
- [17] KAUL, A.; PEREIRA, R.; ASENJO, J y MERCHUCK, J. "Kinetics of phase separation for polyethylene glycol-phosphate two -phase systems". *Biotechnol and bioeng.* (1995) (48), 246-256.

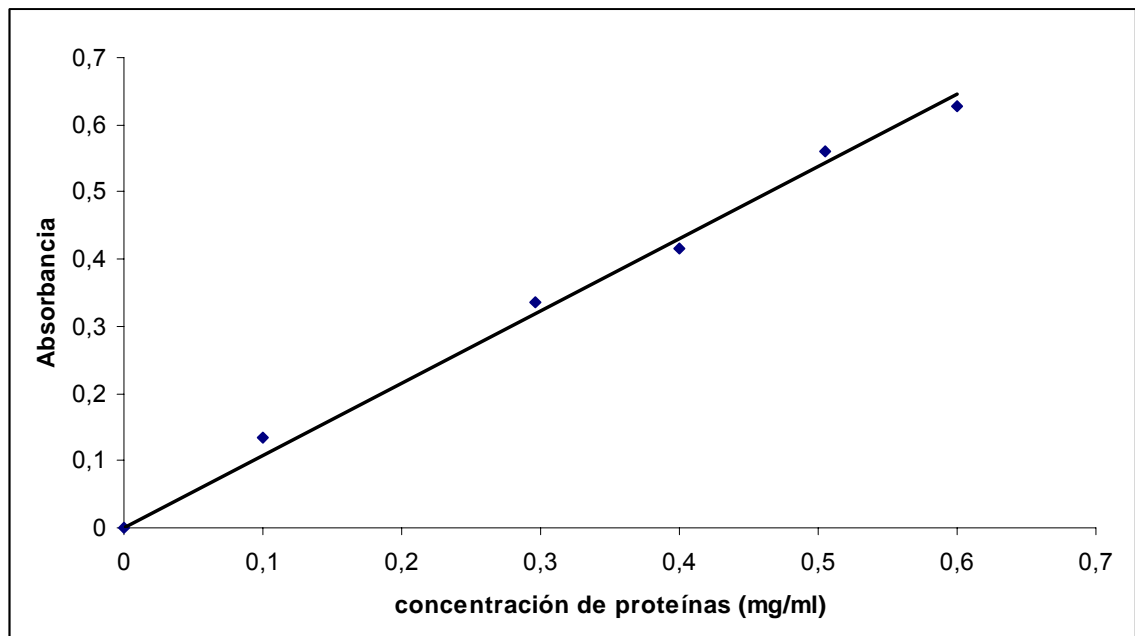
- [18] KHMELNITSKY, Y.L, LEVASHOV, A.V, KLYACHKO, N.L Y MARTINEK, K. "Engineering Biocatalytic systems in organic media with lower water content". Enzyme microb. Technol., (1988) (10), 710-724.
- [19] CHUI, W.K AND WAN, L. S. "Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres". Journal microencapsulation. (1997) (14), 51-61.
- [20] BROWN, G.B. "Chemically aggregated enzymes", Methods in enzymology, academic press. (1976) 263-280.
- [21] MOIRA, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. "Crude aminoacylase from *Aspergillus sp.* Is a mixture of hydrolases". Biotechnology and bioengineering. (2003) (84:6).
- [22] GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S.K. "Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase". Food chemistry xxx. (2005), 1-5.
- [23] RICHARDS, F. M. y KNOWLES J. "Glutaraldehyde as a protein cross-linkage reagent". J. Mol. Biol. (1968) (37), 231-233.

- [24] WALT, D. R. y V. AGAYN. "The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde". Trends Anal. Chem. (1994) (13), 425-430.
- [25] RODGER, P.; DURRANT, I.; y BEYNON, R. "Effect of water miscible organic solvents on activity and thermostability of thermolysin". Elsevier science publishing company, inc. Nueva York. (1987), 405-409.
- [26] KAWAHARA, J.; ISHITAWA, T.; UCHIMARU, T.; TAKAYA, H. "Chemical cross-linking by glutaraldehyde between amino groups: Its mechanism and effects". Polymer modification, plenus press, Nueva York. (1997), 119-131.
- [27] GUISAN, J.; BLANCO, R. "Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of penicillin acylase from *Kluyvera citrophila*". Elsevier science publishing company Inc, Nueva York. (1987), 331-337.
- [28] SAKHAROV, I.; BAUTISTA, G. "Peroxidasas de plantas tropicales". Revista colombiana de química. (1999), (28:1).
- [29] MORENO, J.; VERA, D. "Correlación de los parámetros bioquímicos de la peroxidasa, polifenol oxidasa y fenoles, como contribución a la alta selección de nuevos genotipos de cacao con alta resistencia a monoanálisis". Tesis de grado. Universidad industrial de Santander. (2002).

- [30] SAKHROV, I.; VESGA, M.; GALAEV, I.; SAKHAROVA, y otros. "Peroxidases from royal palm tree *Roystonea regia*: Purification and properties". Plant science. (2001) (161), 853-860.
- [31] BOX, G.; HUNTER, W. "Statistics for experimenters. An introduction to design, data análisis, and model building". Editorial John Wiley & sons, Inc. nueva Jersey. (1993), 215-291.
- [32] MONTGOMERY, D. "Diseño y análisis de experimentos". Editorial limusa, segunda edición. España. (2002).

ANEXO A

Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.



$$\text{proteína(m g/ml)} = \frac{\text{absorbancia}}{1,077}$$

ANEXO B

Calculo de la actividad específica de la peroxidasa soluble de la palma real (*Roystonea regia*).

La actividad específica de la peroxidasa soluble se determino así:

$$\text{actividad específica (U/mg)} = m \frac{10^6}{\epsilon_{\text{producto}}} \frac{V_t}{V_m} \frac{d}{C_{\text{prot}}}$$

Donde:

- m : Pendiente (mol/L.min)
- ϵ : Coeficiente de extinción molar del guayacol, $5200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- V_t : volumen total de reacción (ml).
- V_m : Volumen de solución enzimática (ml).
- D : factor de dilución de la solución enzimática.
- C_{prot} : concentración de proteína en la solución enzimática.
- U : se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar $1 \mu\text{mol}$ guayacol por minuto bajo condiciones de pH 6.0 y temperatura de 25°C .

La actividad específica de los agregados entrecruzados se determino de igual forma que la enzima soluble

ANEXO C

Calculo de la actividad específica de los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*).

$$\text{Actividad del CLEA (U)} = A_{\text{etapa 4}} - A_{\text{etapa 5}}$$

Donde:

- $A_{\text{etapa 4}}$: Actividad del agregado entrecruzado + enzima libre que no fue entrecruzada.
- $A_{\text{etapa 5}}$: Actividad del sobrenadante conteniendo solo enzima libre.

La actividad en cada etapa se determinó de forma similar a la mostrada en el anexo B, teniendo en cuenta la concentración de proteína entrecruzada y la concentración de proteína en el sobrenadante.