

**ELABORACIÓN DE DERIVADOS INMOVILIZADOS DE
GLUCOAMILASA *Streptomyces rubiginosus* MEDIANTE
ENTRECRUZAMIENTO DE AGREGADOS DE ENZIMA Y
FORMACIÓN DE ENLACE COVALENTE SOBRE SOPORTE**

LAURA TERESA CHAPARRO LEAL

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad De Ciencias

Escuela De Química

Bucaramanga

2009

**ELABORACIÓN DE DERIVADOS INMOVILIZADOS DE
GLUCOAMILASA DE *Streptomyces rubiginosus* MEDIANTE
ENTRECRUZAMIENTO DE AGREGADOS DE ENZIMA Y
FORMACIÓN DE ENLACE COVALENTE SOBRE SOPORTE**

LAURA TERESA CHAPARRO LEAL

Trabajo de grado presentado para optar al título de Química

Director

RODRIGO TORRES SAEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Facultad De Ciencias

Escuela De Química

Bucaramanga

2009

*A Dios por guiarme, protegerme y sostenerme siempre
A mis padres y a mi hermana por ser mi apoyo y mi mayor alegría.
A las fresitas por ayudarme y entenderme durante esta etapa
A Ricardo por su amor incondicional, su paciencia
y por abrirme las puertas de su corazón.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mi hermana por su amor, por su apoyo incondicional, por tanta paciencia y porque son lo más bello que tengo en la vida.

Al profesor Rodrigo Torres por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y por todos los conocimientos que me aportó.

Al profesor Daniel Molina por permitirme ser parte del macroproyecto de la yuca, por todos los conocimientos que me transmitió y por su inmensa colaboración.

A Oveimar por tantas cosas que me enseñó, por esa enorme paciencia que tuvo con la pupila y por su gran disposición.

A toda mi familia por creer siempre en mí, a Silvis y Gueyler por tantos momentos bonitos gracias por su apoyo incondicional.

A cesar Bernal mil gracias por todas las veces que estuvo ahí, por enseñarme su perfeccionada técnica de electroforesis, por alentarme en una de las partes más difíciles de mi carrera a seguir adelante.

A Sese por su lealtad y amistad sincera, a Andre por su paciencia y comprensión, a Didi por escucharme y por hacerme reír una y otra vez, a Pilariquis por entenderme y por abrirme un pedacito de su corazoncito.

A Mago Melendez por toda su colaboración durante la carrera por tantas explicaciones y por su amistad.

A Ricardo por su entrega incondicional, por permitirme compartir con él mis triunfos, por quererme, por apoyarme, por ser mi mejor amigo.

RESUMEN

TITULO:

ELABORACIÓN DE DERIVADOS INMOVILIZADOS DE GLUCOAMILASA *Streptomyces rubiginosus* MEDIANTE ENTRECruzAMIENTO DE AGREGADOS DE ENZIMA Y FORMACIÓN DE ENLACE COVALENTE SOBRE SOPORTE.*

Chaparro Leal Laura Teresa**.

Palabras claves: enzima, glucoamilasa, agregados entrecruzados (CLEAs), glutaraldehído, sulfato amonio, 2-butanol, diseño experimental, Eupergit C.

Las enzimas son potentes catalizadores Biológicos, que participan en la mayoría de los procesos del metabolismo celular. Sin embargo, debido a propiedades como alta selectividad y especificidad, estas pueden ser utilizadas en una gran variedad de procesos industriales. Un ejemplo de ello lo constituye la obtención de jarabes de glucosa mediante la hidrólisis enzimática de diferentes clases almidón utilizando glucoamilasa como biocatalizador para este proceso.

Para el desarrollo de este proyecto, se llevaron a cabo dos técnicas de insolubilización de enzimas para brindar rigidez a la glucoamilasa y para separarla fácilmente de su medio de reacción. Una de ellas consistió en la elaboración de agregados entrecruzados de enzima, la cual se llevo a cabo mediante un diseño experimental multifactorial multinivel (3^3) en el que se utilizó sulfato de amonio y 2-butanol como agentes precipitantes y glutaraldehído como agente entrecruzante. Por otra parte la segunda técnica de insolubilización, consistió en la inmovilización de la enzima sobre un soporte activado con grupos epóxido denominado Eupergit C.

Los factores principales que afectan la actividad catalítica, fueron determinados y comparados para la enzima soluble e inmovilizada, estableciéndose que el proceso de insolubilización afecto fuertemente la cáatalas enzimática y la estabilidad de la enzima.

*Proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITTLE:

PREPARATION OF IMMOBILIZED GLUCOAMYLASE *Streptomyces rubiginosus* DERIVATIVES, BY COVALENT SUPORT ATACHMENT AND CROSS-LINKING ENZYME AGGREGATES.*

Chaparro Leal Laura Teresa**

Keywords: enzyme, glucoamylase, Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs), glutaraldehyde, ammonium sulfate, 2-butanol, experimental design, Eupergit C.

Enzymes are powerful biological catalysts, which are involved in most processes of cell metabolism. However, due to properties such as high selectivity and specificity, these can be used in a wide variety of industrial processes. An example is the acquisition of glucose syrups by enzymatic hydrolysis of starch using glucoamylase as the biocatalyst for this process.

In the development of this project two techniques for the immobilization of glucoamylase were used to provide it rigidity and for an easy separation of the reaction media. One of these methods was the cross-linking of the enzyme aggregates, which was carried out through a multilevel multifactorial experimental design (3³) using ammonium sulfate and 2-butanol as the precipitants agents and glutaraldehyde as the cross-linker. Furthermore, the second insolubilisation technique consisted of an immobilization of the enzyme on a support activated with epoxide groups called Eupergit C.

The main factors affecting the catalytic activity were determined and compared to the soluble and immobilized enzyme, establishing that the process of enzyme insolubilisation strongly affects enzymatic activity and stability.

* Degree of Project.

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

Contenido

INTRODUCCION	1
1. MARCO DE ANTECEDENTES.....	3
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Reseña histórica	7
2.2. Enzimas.....	8
2.3. Glucoamilasa	8
2.3.1. Estructura y mecanismo de la enzima	9
2.3.2. Factores que afectan la catálisis de la glucoamilasa.....	11
2.3.3. Procesos industriales	14
2.4. Inmovilización de enzimas	15
2.4.1. Métodos de Inmovilización de enzimas.....	15
2.5. Entrecruzamiento de agregados de enzima (CLEA)	17
2.5.1. Generalidades del glutaraldehído.....	18
2.5.2. Generalidades de los agentes precipitantes.....	19
2.6. Entrecruzamiento sobre soportes activados con grupos epóxido.....	21
2.7. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Presencia y Ausencia de SDS (PAGE nativa) ..	22
2.7.1. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.....	23
2.7.2. Electroforesis con SDS (SDS-PAGE)	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. Análisis de Proteína	24

3.2. Determinación de la Actividad Enzimática de la Glucoamilasa	24
3.3. Entrecruzamiento Intermolecular de Glucoamilasa	25
3.4. Procedimiento para la elaboración de agregados entrecruzados	28
3.4.1. Análisis Estadístico de los Resultados	29
3.5. Inmovilización Sobre Soportes Activados Con Grupos Epóxidos (Eupergit C)	30
3.5.1. Determinación del pH y la fuerza iónica para llevar a cabo la inmovilización sobre el soporte Eupergit C.....	30
3.6. Determinación de los parámetros que afectan la actividad Catalítica de la Glucoamilasa.....	31
3.6.1. Estimación de la influencia del pH sobre la actividad catalítica.....	31
3.6.2. Determinación de la cinética de Michaelis- Menten	31
3.6.3. Evaluación de la estabilidad térmica para la glucoamilasa soluble y entrecruzada ..	31
3.7. Determinación de Glucosa Mediante el Kit de la Glucosa Oxidasa	32
3.7.1. Obtención de las muestras para ser analizadas por el kit de glucosa	32
3.7.2. Determinación de la cantidad de glucosa presente en los productos de hidrólisis de las dextrinas de almidón.	32
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
4.1. Agregados Entrecruzados de Glucoamilasa Utilizando Sulfato de Amonio Como Agente Precipitante.....	34
4.2. Agregados Entrecruzados de Glucoamilasa Utilizando 2-Butanol Como Agente Precipitante	42
4.3. Determinación de la Actividad Catalítica de la Glucoamilasa Soluble y Entrecruzada Bajo Diferentes Valores de pH	48
4.3.1. Determinación del pH	48
4.3.2. Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax para la Enzima soluble y entrecruzada.	50
4.3.3. Comparación de la Estabilidad Térmica de la Enzima Soluble Frente a la Enzima Entrecruzada.	54
4.4. Inmovilización Sobre Soporte Activado Con Grupos Epóxido.....	58

4.5. Electroforesis de Glucoamilasa (<i>Streptomyces Rubiginosus</i>) en Geles de poliacrilamida (SDS/PAGE y PAGE)	61
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFIA	67
ANEXO A	71
ANEXO B	72
ANEXO C	73
ANEXO D	74

Lista de Figuras

Figura 1	Estructura “ribbon” 3D de la glucoamilasa. Glu 179 (rojo) ácido catalítico y Glu 400 (amarillo) base catalítica. Tomado de Protein Data Bank. Software de visualización Rasmol. Código de acceso 3GLY.pdb.10
Figura 2	Mecanismo de reacción de hidrólisis del almidón catalizado por la enzima glucoamilasa. (Flechas indican movimiento de los electrones, líneas punteadas indican formación de puentes de Hidrógeno.) [26].....10
Figura 3	Etapas en la elaboración de los agregados entrecruzados de enzima.17
Figura 4	Enzima glucoamilasa, en rojo se muestran los restos de lisina de la enzima. Tomado de Protein Data Bank. Software de visualización Rasmol. Código de acceso 3GLY.pdb18
Figura 5	Posibles formas del glutaraldehído en solución acuosa [30].....19
Figura 6	Efecto desnaturante de los solventes orgánicos provocados por un cambio en el estado de hidratación de las enzimas.20
Figura 7	Método de inmovilización de las enzimas sobre soportes activados con grupos epóxido. Inicialmente se lleva a cabo una adsorción hidrofóbica sobre la matriz del soporte, seguida por la formación de enlaces covalentes entre la enzima y los grupos epóxido.....22
Figura 8	Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor.....25
Figura 9	Proceso de elaboración de agregados entrecruzados de glucoamilasa.28
Figura 10	Efectos estimados para cada variable evaluada en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados utilizando sulfato de amonio como agente precipitante. 39
Figura 11	Microscopia confocal de barrido. (A) CLEAs con sulfato de amonio al 40%p/v. (B) CLEAs con sulfato de amonio al 80%p/v. [41].....40
Figura 12	Superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa con sulfato de amonio como agente precipitante.41
Figura 13	Contorno de superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa con sulfato de amonio como agente precipitante. .42
Figura 14	Se representa una partícula de CLEA en donde las moléculas de BSA (en violeta) dificultan el acceso del almidón a las moléculas de enzima (en blanco).43
Figura 15	Estimación de los factores influyentes en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados de glucoamilasa utilizando 2-butanol como agente precipitante.47

Figura 16	Actividad residual para la enzima soluble y entrecruzada a diferentes valores de pH. (En azul se muestra el comportamiento de los elaborados entrecruzados de glucoamilasa y en rojo el de la enzima soluble).....	49
Figura 17	Representación de Lineweaver-Burk para la enzima soluble	52
Figura 18	Representación de Lineweaver-Burk para la enzima entrecruzada	53
Figura 19	Actividad residual vs tiempo para la enzima soluble.....	56
Figura 20	Actividad residual vs tiempo para la enzima entrecruzada	56
Figura 21	Comparación de la cinética de inactivación para la enzima soluble y entrecruzada. Las líneas continuas representan la actividad para la enzima soluble y las líneas punteadas la actividad residual para la enzima entrecruzada.....	57
Figura 22	Efecto del pH en el proceso de inmovilización de la glucoamilasa sobre soportes activados con grupos epóxido. Las actividades determinadas corresponden a la enzima presente en el sobrenadante, donde la actividad inicial fue 43,3 (U/mg)....	58
Figura 23	Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización de la glucoamilasa sobre soportes activados con grupos epóxidos. Las actividades determinadas corresponden a la enzima presente en el sobrenadante, donde la actividad inicial fue 43,3 (U/mg).....	59
Figura 24	Electroforesis SDS/PAGE (izquierda) y PAGE,(derecha) para la glucoamilasa proveniente de la cepa fúngica (<i>Streptomyces Rubiginosus</i>).....	62
Figura A 1	Curva de calibración Bradford.....	71
Figura B 1	Curva de calibración de DNS	72

Lista de Tablas

Tabla 1	Parámetros constantes en el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de enzima.	25
Tabla 2	Condiciones de ensayo de las variables seleccionadas que influyen en el proceso de inmovilización utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.	26
Tabla 3	Condiciones de ensayo de las variables seleccionadas que influyen en el proceso de inmovilización utilizando 2-butanol como agente precipitante	26
Tabla 4	Matriz del diseño Experimental	27
Tabla 5	Preparación del blanco, patrón y la muestra.	33
Tabla 6	Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados Utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.	35
Tabla 7	Producción de glucosa utilizando la enzima soluble y entrecruzada, y como sustrato almidón soluble y de dextrinas obtenidas del proceso de licuefacción de almidón crudo.	37
Tabla 8	Estimación efectos significativos en el entrecruzamiento de agregados de glucoamilasa utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.	38
Tabla 9	Valores óptimos para el proceso de elaboración de agregados entrecruzados de glucoamilasa utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.	41
Tabla 10	Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados Utilizando 2-butanol como agente precipitante.	44
Tabla 11	Actividades específicas obtenidas para los CLEAs elaborados sin adición de proteína inerte.	45
Tabla 12	Estimación efectos significativos en el entrecruzamiento de agregados de glucoamilasa utilizando 2-butanol como agente precipitante.	46
Tabla 13	Valores de actividad específica para la glucoamilasa bajo diferentes condiciones de pH.	49
Tabla 14	Valores de actividad específica para la enzima soluble y entrecruzada variando la concentración de almidón soluble.	51
Tabla 15	Inverso de la actividad de la glucoamilasa, a diferentes concentraciones de almidón soluble.	52
Tabla 16	Parámetros cinéticos Km y Vmax para la enzima soluble y entrecruzada.	53

Tabla 17	Constantes de inactivación de la enzima soluble y los CLEAs	55
Tabla 18	Porcentaje de inmovilización bajo diferentes valores de pH y expresión de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada.	60
Tabla 19	Porcentaje de inmovilización bajo diferentes valores de fuerza iónica y expresión de la actividad catalítica para la glucoamilasa inmovilizada.	60

INTRODUCCION

Las propiedades catalíticas de las enzimas son de gran interés industrial debido esencialmente a su elevada especificidad y selectividad, y debido a que son pocos los catalizadores sintéticos que logran reunir en uno solo todas las ventajas inherentes a estos biocatalizadores. Las enzimas pueden ser usadas en una gran diversidad de aplicaciones industriales, tales como; desarrollo y producción de nuevos fármacos, producción de biocombustibles, hidrólisis de almidón en industria cervecera, en procesos medioambientales, industria del papel, de los detergentes, de producción de alimentos, entre otras.

Hoy en día, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías y avances en el campo de la producción de los biocombustibles; ya que en algunos años se prevé una inminente escasez del petróleo y por ende, se necesita encontrar nuevos recursos que suplan las necesidades energéticas y mitiguen los efectos ambientales que provocan actualmente los combustibles fósiles.

En este marco, la producción de biocombustibles, tales etanol y butanol a partir de sacarosa o almidón (por ej. yuca amarga) se constituye en una buena alternativa para disminuir el uso indiscriminado de combustibles fósiles y la contaminación ambiental. El almidón es un sustrato muy interesante debido a su alto contenido en carbohidratos que pueden ser transformados en glucosa para una posterior fermentación y producción de alcoholes que puedan reemplazar a la gasolina.

Para llevar a cabo la transformación del almidón de la yuca amarga hasta glucosa son importantes dos enzimas llamadas; alfa-amilasa y glucoamilasa. La alfa-amilasa rompe el almidón en dextrinas en un proceso denominado licuefacción, mientras que la glucoamilasa rompe estas dextrinas en un proceso denominado sacarificación, en el que se genera la glucosa que posteriormente se puede utilizar para la fermentación alcohólica.

Una vez que la glucoamilasa ha efectuado la catálisis es difícil poder reciclarla, debido a que ésta es altamente soluble en el medio de reacción; además, no puede ser utilizada por largos periodos de tiempo porque sufre una pronta inactivación.

Debido a la necesidad de reciclar las enzimas y de mejorar sus propiedades catalíticas, se han explorado las tecnologías de insolubilización (por ej. Inmovilización) de los catalizadores biológicos. De esta manera, en los procesos donde participa la enzima es posible separar fácilmente los biocatalizadores de los medios de reacción y eventualmente mejorar sus propiedades catalíticas.

La inmovilización sobre soportes y el entrecruzamiento de proteína pura son técnicas que se han venido desarrollando desde hace muchas décadas, y que han permitido solucionar los inconvenientes que se presentan al trabajar con las enzimas en forma soluble.

Por esta razón, la glucoamilasa ha sido inmovilizada mediante el entrecruzamiento de proteína pura y sobre soporte, en espera de poder reciclar y mejorar las propiedades catalíticas de la enzima sometiéndola a estos procesos.

1.MARCO DE ANTECEDENTES

La glucoamilasa ha sido utilizada durante décadas como el biocatalizador que permite la transformación de gran cantidad de carbohidratos en productos con alto valor agregado, tales como jarabes de glucosa, glucosa cristalina; endulzantes de bebidas que se comercializan a nivel industrial y recientemente ha sido empleada para la obtención de jarabes que son sometidos a una fermentación alcohólica [1,2,3].

Por esta razón, la enzima ha venido siendo objeto de estudio desde hace mucho tiempo, durante el cual se han desarrollado diversas técnicas de inmovilización para facilitar su separación del medio de reacción y posterior reutilización; y para mejorar sus propiedades catalíticas de actividad y estabilidad.

En el año 2002, Tanriseven Aziz y col [4], inmovilizaron la enzima mediante un método que combinaba la adsorción del catalizador en almidón de maíz gelificado y posteriormente su encapsulación en fibras de alginato, reteniéndose el 22% de la actividad relativa y siendo activa durante 21 días sin pérdidas de la actividad enzimática.

A su vez, en el año 2002, D' Souza S.F. y col [5], inmovilizaron la glucoamilasa sobre tela de algodón recubierta con polietilenimina (PEI) en la cual se efectuó la adsorción de la enzima y posteriormente su entrecruzamiento con glutaraldehído al 0,2% (p/v). La enzima inmovilizada se utilizó en un biorreactor para llevar a cabo la hidrólisis continua de almidón, y fue posible trabajarlo durante aproximadamente 21 días con una retención del 70% de la actividad inicial del biocatalizador.

Posteriormente, en el año (2004) Torres y col, [6] inmovilizaron la glucoamilasa mediante adsorción iónica en soportes DEAE-agarosa, agarosa Q1A y agarosa EC-EP3 recubierta con polietilenimina. La estabilidad de la enzima fue mejorada, y se alcanzaron valores de actividad de 750 IU/g en la hidrólisis del almidón.

EN el 2004, Emilia Abraham Tholath y col [7], desarrollaron unos elaborados entrecruzados de cristales de enzima pura (CLECs), que consistían en purificar y cristalizar inicialmente la enzima para posteriormente entrecruzarla con glutaraldehído. La enzima entrecruzada retuvo el 98,6% de su actividad a 70°C durante 1 hora, el 77% de la actividad a 80°C durante 1 hora y el 51,4% de la actividad a 90°C durante 30 minutos. Los CLECs de glucoamilasa alcanzaron una actividad específica de 0,0687 IU/mg bajo las condiciones óptimas con almidón como sustrato.

Por otra parte, en el año 2005, Park Daewon y col [8], coinmovilizaron la glucoamilasa y alfa-amilasa en soportes de sílica gel y DEAE-celulosa, los cuales se encapsularon en fibras de alginato. Posteriormente, los soportes se recubrieron con polietilenimina y también mediante silanización para proporcionarles una superficie hidrofílica e hidrofóbica respectivamente. Durante esta investigación, se lograron mejores resultados con los soportes cuya superficie era hidrofílica, reteniéndose el 92,3% de la actividad de las enzimas coinmovilizadas incluso después de 10 veces de reutilización.

Dudra Hamerska Agnieszka y col [9], en el año 2007, inmovilizaron la glucoamilasa sobre soportes de N-isopropilacrilamida, 2-hidroxietilmetacrilato o glicidil metacrilato, activados con grupos amino; estos soportes son termo sensitivos pues al ser enfriados se hinchan y actúan como una bomba succionando la enzima, que luego es entrecruzada con glutaraldehído a los grupos amino del soporte. La enzima entrecruzada fue más estable comparándola con su forma soluble, siendo posible almacenarla por periodos de tiempo superiores a 1 mes.

Milosavic N y col [10], en el año 2007, inmovilizaron la glucoamilasa mediante su porción glicosilada, oxidándola inicialmente con peryodato de sodio y posteriormente entrecruzada covalentemente a esferas macroporosas de poli(GMA-co-EGDMA) ionizados. La actividad específica obtenida para la enzima inmovilizada fue 1100U/mg y fue probada en un biorreactor durante 4 semanas produciendo 1300Kg de glucosa por litro sin disminución de la actividad.

Posteriormente en el año 2008, Tanriseven Aziz y col [11], inmovilizaron la glucoamilasa en partículas de gelatina activadas con poliglutaraldehído, obteniéndose un rendimiento del 85% de entrecruzamiento, siendo activa enzima durante 30 días. A su vez, el biocatalizador retuvo el 90% y 75% de su actividad original durante 60 y 90 días respectivamente.

La técnica de entrecruzamiento de proteína pura, ha venido siendo ampliamente investigada en el campo de la biotecnología, ya que ha mostrado mejores resultados con respecto a los tradicionales procesos de inmovilización sobre soportes.

Wilson y col [12], en el año 2004, inmovilizaron dos enzimas multiméricas (tetrámeros de dos catalasas), haciéndolas precipitar con etilenglicol, dimetil éter, metanol, entre otros solventes y posteriormente entrecruzándolas con glutaraldehído. Mediante esta investigación se concluyó que la estructura cuaternaria de las enzimas pudo ser estabilizada mediante el proceso de entrecruzamiento, y se pudo eliminar la dependencia de la estabilidad de las enzimas multiméricas en forma soluble de su concentración.

Yu H.W y col [13], en el año 2006, realizaron la elaboración de agregados entrecruzados de lipasa de *Candida rugosa*, precipitándola con sulfato de amonio y posteriormente entrecruzándola con glutaraldehído. Los derivados entrecruzados de lipasa retuvieron el 86% de la actividad original de la lipasa, y su enantioselectividad fue 1,8 veces mayor que la registrada para la enzima soluble.

En el año 2008, Sangeetha K y col [14], inmovilizaron la subtilisina mediante el entrecruzamiento de sus agregados proteicos, precipitándola inicialmente con sulfato de amonio, polietilenglicol y adicionando surfactantes como Tween 20 y Tritón X-100, y consecutivamente entrecruzando los agregados con glutaraldehído. Mediante esta técnica pudieron mejorar la estabilidad de la enzima frente a la temperatura y los solventes orgánicos.

Wilson Lorena y col [15], en el año 2009, precipitaron la penicilina – acilasa, adicionando alcohol *terc*-butílico seguido del entrecruzamiento de la enzima con glutaraldehído. Esta enzima es muy importante porque puede catalizar la hidrólisis

y síntesis de antibióticos de tipo β -lactámico. Las actividades obtenidas para estos dos procesos fueron 708 y 325 IU/mg respectivamente y la enzima entrecruzada conservó el 90% de su actividad inicial después de 170 horas de operación.

Aunque el entrecruzamiento de enzimas ha demostrado ser una poderosa herramienta en la insolubilización de estos biocatalizadores, a veces, mediante esta técnica, no se obtienen aumentos considerables en la estabilidad de la enzima. Estos cambios son posibles de lograr mediante el uso de soportes de inmovilización, ya que en algunas ocasiones las condiciones de entrecruzamiento son muy drásticas para los biocatalizadores.

Por esta razón, también se implementó la inmovilización de la glucoamilasa sobre un polímero activado con grupos epóxido (Eupergit C) para comparar estos derivados inmovilizados con los agregados entrecruzados.

Mateo Cesar y col [16], en el año 2000, inmovilizaron tres enzimas diferentes, lipasa, penicilina G acilasa, y β -galactosidasa, sobre soportes activados con grupos epóxido. Estos soportes fueron modificados químicamente al ser activados con otro tipo de moléculas como grupos polarizados o metales que facilitaron la adsorción sobre el soporte. Para las tres enzimas inmovilizadas en este estudio se retuvo aproximadamente un 70% de la conformación inicial.

En el año 2006, Knezevic Zorica y col [17], desarrollaron cuatro métodos de inmovilización para la lipasa sobre el soporte Eupergit C, en el cual se llevaron a cabo algunas modificaciones al incluirle grupos que fomentaran un mayor grado de entrecruzamiento. Finalmente se obtuvo una retención de la actividad de la enzima de un 43% con respecto a la actividad original.

Mislovicová D y col [18], en el año 2007, inmovilizaron la glucosa oxidasa sobre Eupergit C y Eupergit CM; la enzima inmovilizada sobre Eupergit C pudo ser reutilizada durante 45 ciclos de operación, en los cuales solo perdió el 2% de su actividad inicial, además el catalizador retuvo un 94% de su actividad catalítica al ser almacenado durante 140 días a 4^oC.

2.MARCO TEÓRICO

2.1. Reseña histórica

La aplicación de las enzimas en los bioprocesos, ha venido siendo utilizada desde tiempos inmemorables. Por ejemplo, el hombre ha utilizado empíricamente la fermentación alcohólica (un proceso enzimático) desde el año 6000 A.C.

La primera teoría general sobre la catálisis enzimática fue conocida en 1835, gracias a J.J Berzelius, quien señaló que la hidrólisis del almidón con la diastasa de la malta se efectuaba con mayor eficacia mediante este proceso que por tratamiento con ácido sulfúrico.[19].

Posteriormente en 1860 Louis Pasteur reconoció que la fermentación es catalizada por enzimas y afirmó que éstas se encontraban ligadas de una forma confusa con las estructuras y la vida de las células de la levadura [19].

Hacia el año 1897, Buchner hizo un extracto de levadura que trituró en agua y luego filtró. El filtrado de este extracto, sin células, era capaz de transformar la glucosa en CO₂ y alcohol, y por ende dedujo que del filtrado se había extraído una substancia causante de la fermentación que denominó zimos (en la levadura) y de acá se acuñó el término enzima. [20]

A pesar de estos avances, no fue sino hasta 1926 que se logró el aislamiento de los primeros cristales de la enzima llamada Ureasa por J.B Sumner, el cual logró demostrar que los cristales obtenidos estaban compuestos por moléculas de proteína. Sin embargo, estas observaciones no fueron tenidas en cuenta sino hasta el año 1935 en donde Northrop aisló la pepsina, tripsina y quimotripsina en forma cristalina quedando esclarecida la naturaleza proteica de las enzimas. [20].

Actualmente se han aislado más de 2000 enzimas diferentes, y su estudio constituye todo un desafío para el campo de la biotecnología.

2.2. Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos, que participan en la gran mayoría de los procesos del metabolismo celular. Su función principal es reducir la energía de activación de todas las reacciones químicas que participan en los procesos biológicos.

En muchos aspectos, las enzimas son biocatalizadores casi ideales, debido a su elevada especificidad (molecular y quiral), alta eficiencia en la conversión enzima sustrato, elevada actividad en condiciones suaves de trabajo y biodegradabilidad.

2.3. Glucoamilasa

La glucoamilasa (1,4- α -D-glucan-glucohidrolasa), también denominada amiloglucosidasa, es una de las enzimas más importantes que participan en el proceso de degradación del almidón, el cual se lleva a cabo en dos etapas básicas en las que se combina la acción de dos enzimas. Durante la primera fase, la enzima α -amilasa rompe los enlaces α -1,4 de las moléculas del almidón limitándolo a centenares de dextrinas en un proceso denominado licuefacción; posteriormente, en una segunda fase, la glucoamilasa toma los extremos no reductores de las dextrinas producidas en la etapa anterior y las degrada hasta glucosa [11, 21].

Una de las ventajas de llevar a cabo la hidrólisis del almidón mediante la vía enzimática, es que la glucoamilasa es capaz de romper los enlaces α -1,4 y α -1,6 del almidón (aunque éstos con una menor rapidez), lo que permite obtener rendimientos elevados en el proceso de sacarificación [22].

La transformación química del almidón es de especial importancia para la producción de jarabes de glucosa, glucosa cristalina y producción de fructosa, los

cuales se utilizan en la industria de los alimentos donde a diario se fabrican miles de toneladas de productos que necesitan ser procesados con edulcorantes.

Adicionalmente, la glucosa ha sido una de las principales materias primas en el campo de los biocombustibles, en donde diariamente se buscan nuevas fuentes del carbono que puedan ser útiles para la producción de energía [23].

2.3.1. Estructura y mecanismo de la enzima

La glucoamilasa es una enzima que posee una estructura variada dependiendo del origen de proveniencia, las que son de origen fúngico como la *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*, se encuentran naturalmente en tres isoenzimas denominadas AMG1, AMG2 y GACD. La AMG1 posee en total 616 residuos aminoacídicos y presenta una estructura en forma de mancuerna, en la que los dos pesos representan el dominio catalítico (aminoácidos 1-440) y el dominio enlazante del almidón (aminoácidos 509-616) respectivamente; ambos dominios están conectados por un puente o-glicosilado (región 441-508) compuesto principalmente por residuos aminoacídicos de serina y treonina [24].

La AMG2 posee exclusivamente la región comprendida por el dominio catalítico y el puente o-glicosilado presentando un total de 512 aminoácidos. En el dominio catalítico se encuentra el sitio activo de la enzima y los residuos aminoacídicos que participan directamente en la catálisis del sustrato.

La tercera Isoenzima GACD menos frecuente que las dos anteriores, está compuesta por el dominio catalítico y solo una parte del puente O-glicosilado [24].

La importancia del dominio enlazante del almidón, ha sido ampliamente estudiada y se sabe que este permite la degradación del almidón crudo; por ende la AMG2 que no posee este dominio solo es capaz de degradar el almidón soluble [7, 24].

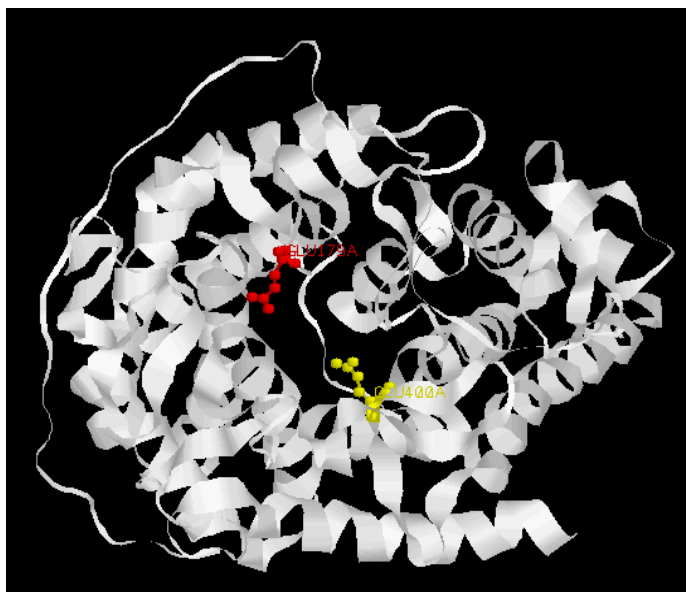


Figura 1 Estructura “ribbon” 3D de la glucoamilasa. Glu 179 (rojo) ácido catalítico y Glu 400 (amarillo) base catalítica. Tomado de Protein Data Bank. Software de visualización Rasmol. Código de acceso 3GLY.pdb.

En el sitio activo de la glucoamilasa, se encuentran dos residuos ácidos que son los directos responsables de la catálisis de la enzima, GLU 179 que se ha reconocido en general como el ácido catalítico y GLU 400 que se comporta como la base catalítica. El sitio activo de la glucoamilasa se ilustra en la Figura 1 [25, 26].

Mecanismo de reacción

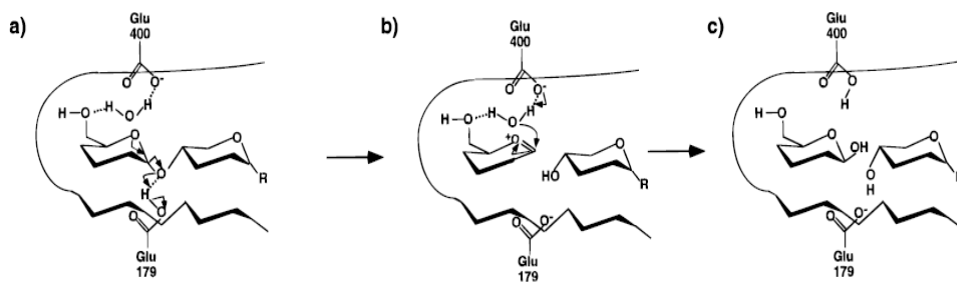


Figura 2 Mecanismo de reacción de hidrólisis del almidón catalizado por la enzima glucoamilasa. (Flechas indican movimiento de los electrones, líneas punteadas indican formación de puentes de Hidrógeno.) [26]

El mecanismo de reacción de la glucoamilasa que se muestra en la Figura 2 corresponde a las siguientes etapas:

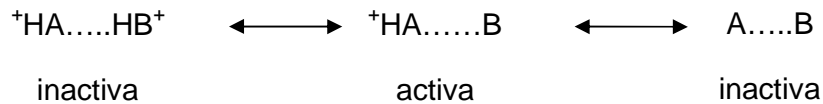
- a) El glu 179 actúa como el ácido catalítico, protonando el oxígeno glicosídico, mientras el glu 400 actúa como la base catalítica sustrayendo un protón del agua.
- b) Posteriormente, el grupo hidroxilo nucleófilico, ataca el carbono glicosídico resultando en la inversión de la configuración del carbono anomérico. Durante esta etapa se forma un ion oxocarbonio intermediario.
- c) Se obtiene β -D-glucosa producto de la hidrólisis del almidón [24, 25].

En realidad el mecanismo de la glucoamilasa es bastante flexible, pues la enzima no solo puede catalizar almidón, sino también otro tipo de glúcidos o moléculas como el paranitrofenil α -D-glucósido [24].

2.3.2. Factores que afectan la catálisis de la glucoamilasa.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la velocidad de reacción de una enzima, puede sugerir que tipo de residuos aminoacídicos iónicos se encuentran presentes en su sitio activo. Generalmente, la sensibilidad al pH refleja alteraciones en el estado de ionización de uno o más residuos que participan en la catálisis. Habitualmente se pueden conocer los efectos del pH trazando una gráfica de este vs la velocidad de reacción, obteniéndose a menudo una gráfica en forma de campana en donde el punto máximo representa el pH óptimo de la enzima. El comportamiento sigmoideal de la actividad enzimática al variar el pH se puede explicar considerando que la curva ascendente es causada por la desprotonación de un aminoácido del sitio activo y que la curva descendente es causada por la desprotonación de un segundo aminoácido del sitio activo. Por lo tanto, la gráfica en forma de campana en realidad es el solapamiento de dos titulaciones. [26]



Los puntos de inflexión de estas dos curvas se aproximan a los valores de pKa de los residuos ionizables. En el pH óptimo (la mitad del camino entre los valores de pKa), el mayor número de moléculas de enzima se encuentran en la forma activa.[26]

Por otra parte, el pH también puede afectar la estabilidad de la enzima, pues la carga de los residuos aminoacídicos de la proteína depende de la concentración de protones en el medio. Los valores de pH que provoquen acumulación de cargas (negativas o positivas) por debajo o por encima del punto isoeléctrico pueden provocar desestabilización de la enzima debido a fuerzas de repulsión [27].

Efecto de la concentración de sustrato.

A principios del siglo XX, investigadores de varios laboratorios analizaron los efectos de las variaciones de las concentraciones del sustrato con el fin de derivar las expresiones de velocidad para los procesos enzimáticos.

Durante estos estudios se realizaron dos observaciones importantes, la primera es que a concentraciones elevadas de sustrato la enzima se encuentra saturada con éste, por ende el valor de la velocidad de reacción permanece constante e independiente de la concentración de sustrato, al valor que se obtiene en este punto se le conoce como velocidad máxima.

La segunda observación es que a concentraciones bajas de sustrato la reacción es de segundo orden con respecto a la concentración de sustrato y de enzima. En un punto intermedio la reacción es de orden fraccionario pues se va haciendo dependiente de la concentración (orden 1) hasta que ya no depende de ésta (orden 0) [19, 26].

La descripción de la cinética de una enzima mediante el modelo anteriormente explicado se denomina cinética de Michaelis – Menten en honor a los científicos que desarrollaron este modelo, pero no todas las enzimas presentan este comportamiento frente a los cambios de concentración de sustrato; de hecho hoy en día se conoce una gran cantidad de modelos que describen el comportamiento de muchas enzimas que no siguen la cinética de Michaelis- Menten.

La glucoamilasa, es una de las enzimas que se puede describir bajo este modelo cinético y por ello se definen algunos conceptos sobre el mismo.

- V máxima (Vmax)

cuando se efectúa una reacción enzimática y se aumenta progresivamente la concentración del sustrato, la velocidad tiende crecer hasta un punto en que se hace constante, debido a que el biocatalizador se ha saturado con el sustrato, y en este punto en que se hace constate se obtiene la máxima velocidad de reacción. La velocidad máxima tiene unidades de U/mg de enzima [20].

- Constante de Michaelis Km

La constante de Michaelis posee muchos significados, por ejemplo Km es la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial de la reacción es igual a la mitad de la velocidad máxima.

Quizá la definición más interesante sobre la constante de Michaelis, es que ésta es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato, mientras más pequeña sea la constante Km, más firmemente se fijará el sustrato a la enzima [26].

Los parámetros Km y Vmax se pueden calcular fácilmente graficando el inverso de la concentración de sustrato vs el inverso de la actividad específica de la enzima, obteniéndose una línea recta descrita por la siguiente expresión.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{\max}} * \frac{1}{[s]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

La cual tiene la forma de una recta $Y = mX + b$

Donde K_m/V_{\max} es la pendiente de la recta y $1/V_{\max}$ es el intercepto con el eje y.

Esta expresión es una transformación de la ecuación original de Michaelis-Menten y se denomina representación de Lineweaver-Burk [19].

Efecto de la temperatura

Las enzimas adquieren su estructura tridimensional gracias a las interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y enlaces covalentes entre los residuos de cisteína presentes en la molécula. La mayoría de estas interacciones, son fáciles de alterar si se aplican condiciones diferentes a las que favorecen la conformación más estable de la enzima; un aumento en la temperatura por ejemplo, produce un aumento en la energía vibracional de las moléculas lo cual ocasiona la ruptura de las interacciones básicas que permiten mantener la estructura tridimensional de la enzima. Por otra parte, si la temperatura es disminuida puede que no se favorezca la adecuada configuración del sitio activo para llevarse a cabo la catálisis [27].

2.3.3. Procesos industriales

En términos de cantidad, actualmente la producción industrial de jarabes de glucosa a partir del almidón es una de las áreas más amplias de la biocatálisis. Aproximadamente 10×10^6 toneladas de jarabe de glucosa son producidas anualmente mediante procesos utilizando glucoamilasa soluble, y se espera que la producción aumente debido a la necesidad de mayores cantidades de jarabes de fructosa y a los aumentos en la producción de biocombustibles [28].

Debido a la creciente demanda en la producción de glucosa, se han llevado a cabo amplias investigaciones en materia de inmovilización de la enzima, para poder utilizarla en procesos que permitan obtener mayores rendimientos. [28].

2.4. Inmovilización de enzimas

Se entiende por enzima inmovilizada, aquella que es física o químicamente asociada a una matriz o soporte que no es esencial para su actividad catalítica. Aunque el soporte no necesariamente debe ser insoluble en el medio de reacción, se prefiere con esta característica con el fin de poder recuperar fácilmente el biocatalizador [27].

Cuando la enzima es confinada a un soporte, esta puede interactuar con el sustrato pero está separada de la fase en que este se encuentra [28].

Las ventajas que se han obtenido con el proceso de inmovilización de las enzimas, son principalmente un aumento en la estabilidad de los biocatalizadores, reutilización de las enzimas durante varios ciclos lo cual representa un ahorro a nivel industrial y la implementación de procesos que permitan obtener mayores rendimientos y en algunas ocasiones aumentos en la actividad catalítica.

2.4.1. Métodos de Inmovilización de enzimas

Existen en la actualidad diversos métodos de inmovilización de enzimas, siendo de mayor importancia para el presente trabajo, los que se llevan a cabo a través de enlace químico covalente, especialmente la inmovilización sobre soporte y el entrecruzamiento de proteína pura.

Inmovilización mediante enlace covalente

El enlace covalente se produce entre los grupos funcionales de un soporte activado y los residuos aminoacídicos más reactivos de la enzima, como por ejemplo ,los que contienen grupos -OH, -SH, -NH₂, -COOH. En este método el

soporte usualmente no es regenerable y las pérdidas de la actividad por inmovilización son elevadas. La ventaja principal de esta forma de inmovilización es que la estabilidad del catalizador se ve aumentada considerablemente [27].

Entrecruzamiento proteico

El entrecruzamiento molecular mediante reactivos bifuncionales como (glutaraldehído y diisocianato) es una técnica de uso frecuente en la inmovilización de enzimas. El reactivo bifuncional puede actuar agregando moléculas proteicas entre si hasta la formación de partículas insolubles [27].

El desarrollo de esta técnica se ha llevado a cabo desde los años 60, en donde inicialmente se prepararon CLEs (cross linked enzymes), los cuales fueron realizados básicamente por la adición de un agente bifuncional sobre la enzima soluble, obteniéndose derivados difíciles de manipular y con poca reproducibilidad, motivo por el cual se desarrolló la técnica del entrecruzamiento de cristales puros de proteína (CLECs), en la cual la enzima era inicialmente purificada y cristalizada, para su posterior entrecruzamiento. Las partículas obtenidas mediante esta técnica demostraron retener la actividad total de las enzimas ensayadas, buena reproducibilidad, aumento en la estabilidad y fácil separación del medio de reacción. La mayor desventaja que posee esta técnica es el tedioso proceso de purificación y cristalización de la enzima [29].

Con el fin de superar estos inconvenientes surge la técnica de entrecruzamiento de agregados de proteína, (CLEAs), en la cual se adicionaba inicialmente un solvente orgánico, sal, o un polímero no iónico, que permitieran la agregación de la enzima, proceso mediante el cual se obtiene una pre purificación y posteriormente el entrecruzamiento de los agregados con un reactivo bifuncional. Los elaborados entrecruzados obtenidos bajo esta metodología presentaron las mismas ventajas obtenidas para los CLECs; quedando superado el inconveniente de tener que purificar la enzima mediante un procedimiento más exhaustivo [29].

2.5. Entrecruzamiento de agregados de enzima (CLEA)

La elaboración de agregados entrecruzados de enzima, ha sido una de las técnicas más exitosas e investigadas durante las últimas décadas, debido a las evidentes ventajas que presenta sobre los métodos tradicionales de inmovilización.

La técnica es muy sencilla, y en ella se puede combinar una serie de modificaciones que permiten obtener mejores resultados para los procesos de biotransformación.

Básicamente esta metodología consta de dos etapas como se aprecia en la Figura 3. La primera es la precipitación de la enzima mediante la adición de solventes orgánicos, sales y polímeros no iónicos a la solución de la enzima soluble, de esta forma las moléculas de enzima se precipitan y agregan conservando su estructura tridimensional; una característica de estos agregados es que pueden redisolverse en agua fácilmente. La segunda etapa consta de la adición de un reactivo bifuncional como el glutaraldehído, el cual forma preferentemente enlaces covalentes con los residuos de lisina de la enzima [29].

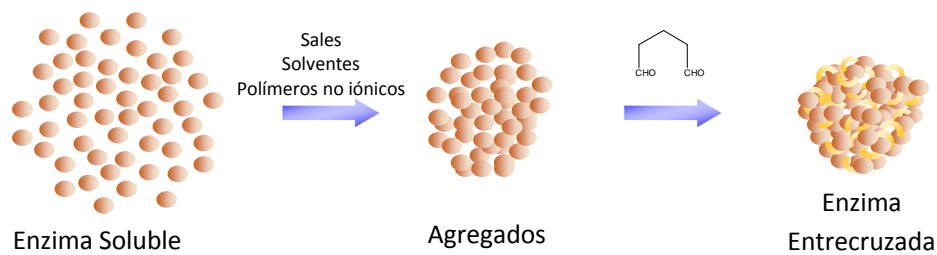


Figura 3 Etapas en la elaboración de los agregados entrecruzados de enzima.

Esta metodología le confiere a las enzimas la misma estabilidad que se logra con un soporte, mejora en muchos casos la actividad catalítica, es fácil de utilizar, es económica y muy versátil; pero no todos los biocatalizadores pueden ser insolubilizados de esta manera, debido al efecto que el agente precipitante y entrecruzante pueden causar sobre la estructura de la enzima.

Muchos son los factores que influyen en la elaboración de los agregados entrecruzados, destacándose entre los más importantes el pH, la temperatura, la concentración de enzima la elección del agente precipitante y el agente entrecruzante, además de estos parámetros es muy importante la cantidad de residuos de lisina (Lys) que posee la enzima, ya que estos son los que principalmente interactúan con el glutaraldehído que es el agente entrecruzante más utilizado en los procesos de elaboración de los CLEAs [29].

En la Figura 4 se exhiben los residuos Lisina de la glucoamilasa.



Figura 4 Enzima glucoamilasa, en rojo se muestran los restos de lisina de la enzima. Tomado de Protein Data Bank. Software de visualización Rasmol. Código de acceso 3GLY.pdb

2.5.1. Generalidades del glutaraldehído

El glutaraldehído es un dialdehído de 5 carbonos, incoloro, aceitoso y soluble en agua y solventes orgánicos [30].

El glutaraldehído puede presentar en solución acuosa, al menos 13 estructuras diferentes dependiendo de las condiciones de pH, concentración y temperatura. Las estructuras del glutaraldehído en solución acuosa incluyen formas monoméricas, poliméricas, aldehídos α,β -insaturados y varias formas cíclicas, algunas de las cuales se presentan en la Figura 5. El mecanismo mediante el cual reacciona el glutaraldehído con los grupos amino de las proteínas aun no está claro, algunos estudios revelan que diferentes mecanismos de reacción tienen lugar simultáneamente. El glutaraldehído reacciona mejor a valores de pH neutro debido a que a valores bajos los grupos amino con los que interacciona están mayoritariamente protonados [11].

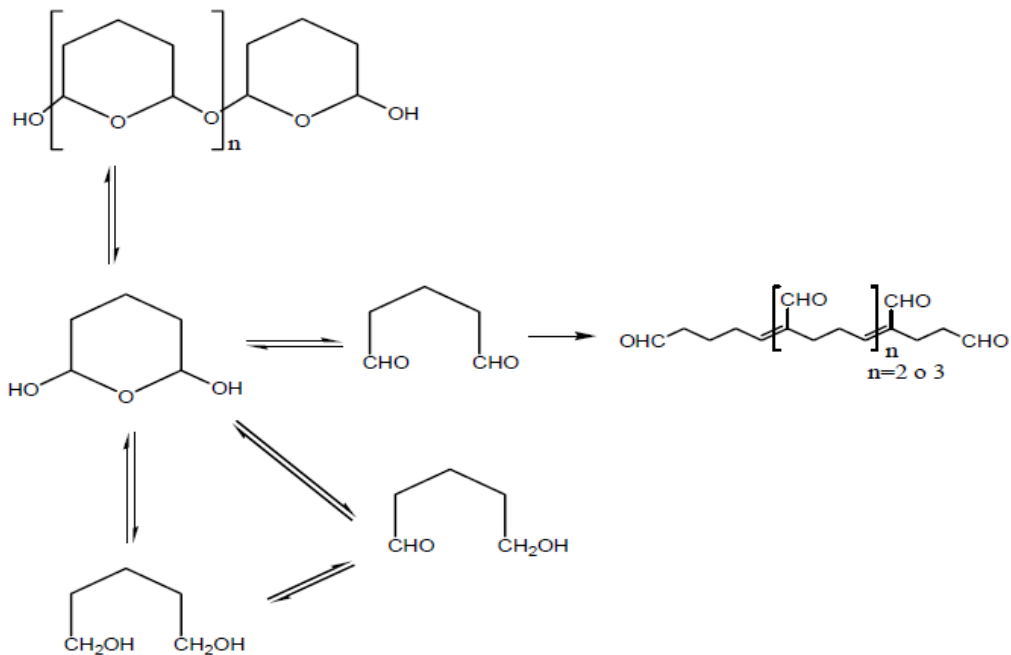


Figura 5 Posibles formas del glutaraldehído en solución acuosa [30].

2.5.2. Generalidades de los agentes precipitantes

Varias consideraciones deben ser estudiadas a la hora de elegir un agente precipitante adecuado para llevar a cabo la primera etapa en la elaboración de los agregados entrecruzados.

En general los solventes orgánicos pueden presentar efectos desestabilizantes sobre las enzimas.

Los resultados más favorables para las enzimas se han obtenido utilizando solventes hidrofóbicos, debido al efecto inactivante de los solventes hidrofílicos que solubilizan la capa de agua que rodea la enzima y que mantiene su conformación activa [27]. A este efecto se le conoce como un cambio en el estado de hidratación de la enzima que puede llevar a su consecuente desnaturalización como se observa en la Figura 6 [31]

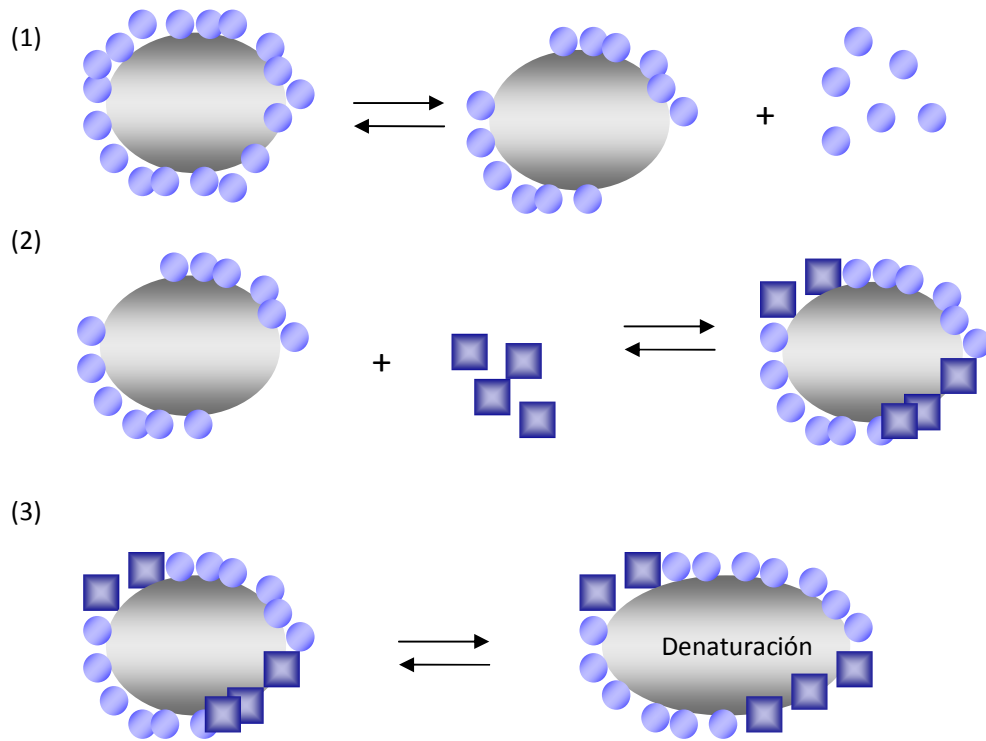


Figura 6 Efecto desnaturante de los solventes orgánicos provocados por un cambio en el estado de hidratación de las enzimas.

Etapas de la Figura 6

- 1) Deshidratación: desplazamiento de las moléculas de agua inducido por solventes orgánicos.

- 2) Interacciones enzima-solvente producidas por el desplazamiento de las moléculas de agua.
- 3) Cambio en la conformación nativa de la enzima ocasionando la desnaturalización.

2.6. Entrecruzamiento sobre soportes activados con grupos epóxido.

Los soportes activados con grupos epóxido, parecen ser sistemas casi ideales en el desarrollo de sencillos protocolos para la inmovilización de enzimas. Los grupos epóxido son bastante estables a pH neutro y pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo.

Una característica importante de los grupos epóxido, es que estos reaccionan con diferentes grupos nucleofílicos como los amino, hidroxilo, tiol, entre otros, formando enlaces extremadamente fuertes (aminas secundarias, éteres, y tioéteres) [16].

La inmovilización sobre soportes activados con grupos epóxido, requiere de una alta fuerza iónica del medio y pHs cercanos a 7. Esto se debe a que la inmovilización de las enzimas sobre este tipo de soportes se lleva a cabo en dos etapas: la primera es una adsorción mediante interacciones hidrofóbicas que se llevan a cabo sobre el soporte (ello no quiere decir sobre los grupos epóxido), las cuales se ven favorecidas bajo condiciones de fuerzas iónicas altas. La segunda etapa consta de la formación de enlaces covalentes entre los grupos nucleofílicos de la enzima y los grupos epóxido que se encuentran sobre el soporte, estas interacciones se ven favorecidas por un pH de 7 o cercano al mismo.[16, 29]. El esquema de la inmovilización de una enzima sobre soportes activados con grupos epóxido se presenta en la Figura 7.

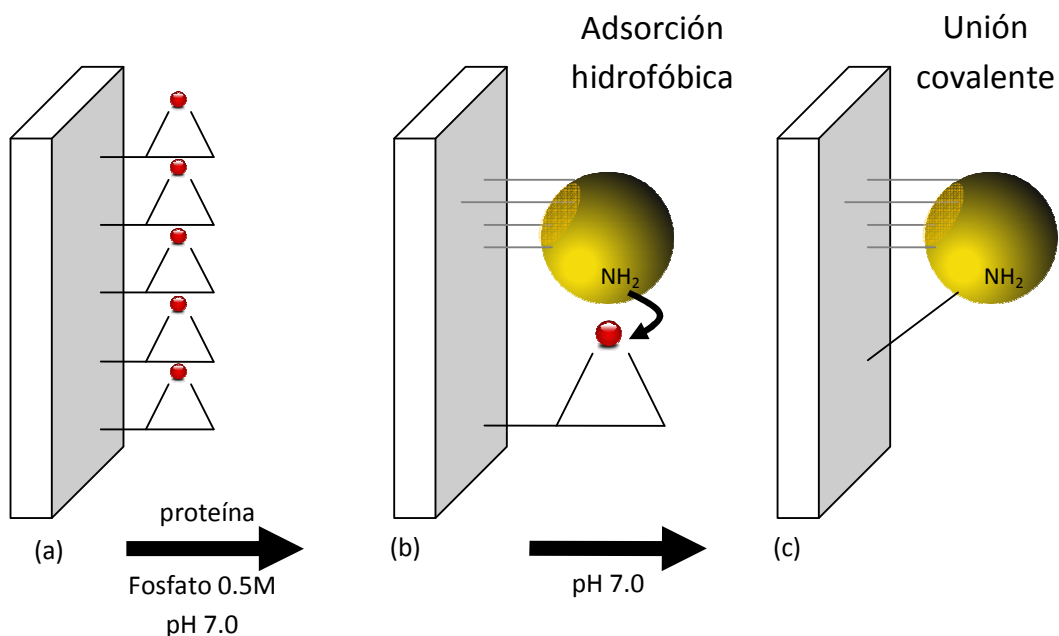


Figura 7 Método de inmovilización de las enzimas sobre soportes activados con grupos epóxido. Inicialmente se lleva a cabo una adsorción hidrofóbica sobre la matriz del soporte, seguida por la formación de enlaces covalentes entre la enzima y los grupos epóxido.

No todas las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre los soportes que contienen grupos epóxido, debido a las exigentes condiciones que requiere el método. Para superar estos inconvenientes este tipo de soportes se ha modificado adicionando grupos sobre la matriz que favorezcan la etapa de adsorción, sin necesidad de utilizar condiciones drásticas que puedan causar la desnaturalización de las enzimas [16, 29].

2.7. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Presencia y Ausencia de SDS (PAGE nativa)

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, cuyo principio consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular. Para controlar el avance de la separación de las moléculas en la matriz y establecer un patrón de fragmentos, las moléculas deberán ser teñidas con diferentes colorantes. Estos pasos facilitan la visualización de las moléculas a manera de simples bandas las cuales son posteriormente analizadas e interpretadas [32].

2.7.1. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible, además, se forman geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempos prolongados. Adicionalmente tienen la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro [33].

Cuando se realiza una electroforesis nativa, existe el inconveniente de que las moléculas que tienen masas moleculares muy similares migran de forma diferente debido a que poseen relaciones carga/masa distintas.

2.7.2. Electroforesis con SDS (SDS-PAGE)

El SDS, es un detergente cuya estructura es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3 - \text{Na}^+$, el cual desnaturaliza las proteínas alterando su estructura terciaria y cuaternaria, este se une a las moléculas de proteína en una relación de una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena polipeptídica, y le aporta a la proteína una carga negativa proporcional a su masa, de esta manera las moléculas de las proteínas adquieren una relación carga/masa aproximadamente uniforme, de modo que se puede asumir que la distancia de migración en el gel está vinculada mayoritariamente a la longitud de la cadena desplegada de la proteína y a su masa molecular[33].

3. METODOLOGIA

3.1. Análisis de Proteína

La determinación de proteína, se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford [34]. 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 en una curva de calibrado (anexo A) que correlacionó la concentración de proteína con la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic 20 Génesis, 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 [34].

3.2. Determinación de la Actividad Enzimática de la Glucoamilasa

La determinación de la actividad de la glucoamilasa, se llevó a cabo utilizando como sustrato almidón soluble a una concentración de 10mg/ml a diferentes tiempos de reacción para determinar el rango de linealidad. Para cuantificar los azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis del almidón, se utilizó el método colorimétrico del DNS, el cual se basa en la reacción de oxido-reducción del ácido 3,5- dinitrosalicílico con los azúcares reductores [35].

El ácido de color amarillo es reducido cambiando su coloración a rojo pardo. Los datos se interpolaron en la curva de calibración mostrada en el anexo B, la cual se realizó utilizando glucosa comercial con concentraciones entre 0.01 y 1mg/mL, cuantificando a 540nm en un espectrofotómetro marca Spectronic 20 génesis.

Los ensayos enzimáticos fueron realizados a 55°C con agitación constante y se utilizó un Buffer de acetato de Sodio 50mM a pH 4,7. Para establecer el rango de linealidad de la enzima se utilizaron diluciones de la enzima 1/10 1/20 1/40 1/80 y

1/100 de una solución original que contenía 3mg de enzima sólida por ml de solución. [36].

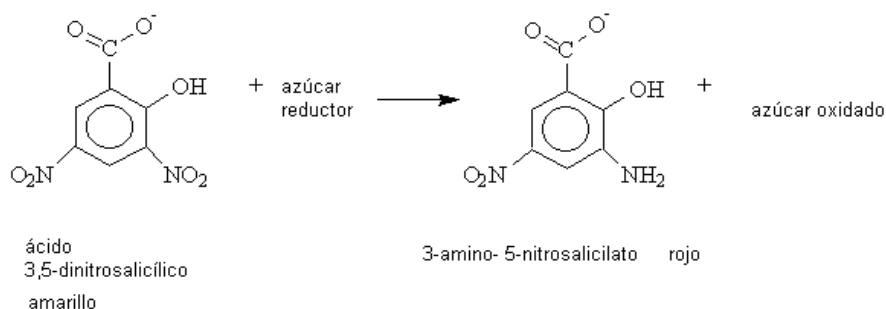


Figura 8 Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor.

Una unidad (U) de glucoamilasa, se definió como la formación de 1µmol de glucosa por minuto. La actividad específica de la enzima fue expresada en unidades de glucoamilasa por mg de proteína (U/mg) [37].

3.3. Entrecruzamiento Intermolecular de Glucoamilasa

Para la elaboración de agregados entrecruzados de enzima, se mantuvieron constantes los parámetros mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1 Parámetros constantes en el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de enzima.

FACTOR	VALOR CONSTANTE
pH	4.7
Temperatura	4°C
Tiempo de reacción	3h
Concentración de agente protector (glucosa)	1mg/mL
Fuerza iónica	0,05M.

Se seleccionó el sulfato de amonio y 2-butanol como agentes precipitantes, debido a que el primero es una sal y el segundo un solvente orgánico, lo que asegura unas condiciones de inmovilización totalmente diferentes para la enzima y se eligió al glutaraldehído como agente entrecruzante.

Se escogieron como las variables de mayor incidencia en el proceso de inmovilización, la concentración de agente precipitante, concentración de agente entrecruzante y concentración de la enzima. Las concentraciones utilizadas para cada una de las variables se presentan en la Tabla 2 y Tabla 3

Para determinar el impacto de las variables escogidas sobre el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados, se desarrolló un diseño experimental multinivel, el cual constaba de 27 ensayos por cada agente precipitante, tal como se describe en la Tabla 4

Tabla 2 Condiciones de ensayo de las variables seleccionadas que influyen en el proceso de inmovilización utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.

<i>factor</i>	<i>Nivel bajo</i> (-1)	<i>Nivel medio</i> (0)	Nivel alto (1)
Agente precipitante %p/v	5	12,5	20
Agente entrecruzante %p/v	0.5	1,25	2
Proteína [mg/mL]	20	30	40

Tabla 3 Condiciones de ensayo de las variables seleccionadas que influyen en el proceso de inmovilización utilizando 2-butanol como agente precipitante

<i>factor</i>	<i>Nivel bajo</i> (-1)	<i>Nivel medio</i> (0)	Nivel alto (1)
Agente precipitante %v/v	50	70	90
Agente entrecruzante %p/v	0.5	1,25	2
Proteína [mg/mL]	20	30	40

Tabla 4 Matriz del diseño Experimental

Ensayo N°	Concentración precipitante	Concentración Glutaraldehído	Concentración proteína
1	1	0	0
2	0	-1	-1
3	0	0	-1
4	1	-1	-1
5	1	1	0
6	0	1	1
7	-1	-1	-1
8	1	1	1
9	-1	-1	1
10	1	-1	0
11	-1	1	0
12	-1	-1	0
13	-1	0	1
14	1	-1	1
15	0	0	0
16	-1	0	-1
17	-1	1	1
18	0	1	-1
19	0	-1	1
20	0	-1	0
21	1	0	1
22	1	1	-1
23	0	0	1
24	-1	1	-1
25	1	0	-1
26	0	1	0
27	-1	0	0

3.4. Procedimiento para la elaboración de agregados entrecruzados

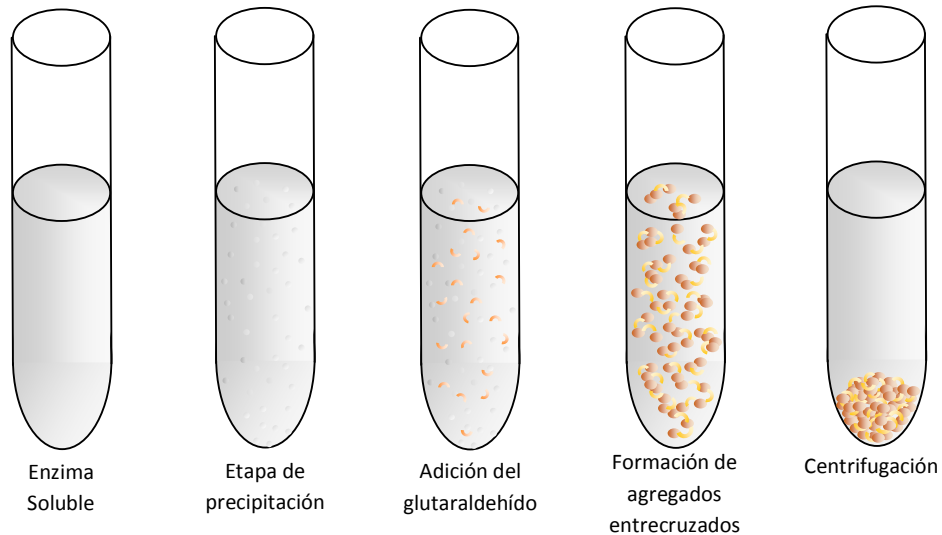


Figura 9 Proceso de elaboración de agregados entrecruzados de glucoamilasa.

El proceso de elaboración de agregados entrecruzados, se llevó a cabo como se muestra en la Figura 9, como se describe por Sheldon y col [38]. Las etapas involucradas son:

1) *Etapa de protección*

Se adicionó un volumen de 0.3ml de enzima soluble a un tubo de ensayo que contenía previamente 0,3ml de agente protector (glucosa) del sitio activo de la enzima.

2) *Etapa de precipitación*

Al tubo de ensayo que contenía la solución anterior, se adicionaron 3mL de agente precipitante (sulfato de amonio o 2-butanol) con la concentración que se indicaba en cada caso de la matriz del diseño experimental.

3) *Entrecruzamiento de la enzima agregada*

Adición del reactivo bifuncional glutaraldehído en relación (0.5%, 1,25%, 1.5%p/v) sobre la enzima precipitada.

4) *Medición de la actividad catalítica del agregado entrecruzado conteniendo enzima libre*

De la mezcla acuosa conteniendo agregados entrecruzados de glucoamilasa y enzima libre que no reaccionó con el glutaraldehído, se extrajo un volumen al cual se le determinó la actividad tal como se describe en la sección 3.2. La actividad volumétrica obtenida en esta etapa se multiplicó por el volumen de enzima utilizado en el ensayo para obtener las unidades contactadas en el mismo.

5) *Determinación del contenido de proteína y de la actividad del sobrenadante*

Se centrifugó la mezcla acuosa que contenía los agregados entrecruzados y la enzima libre que no reaccionó, y del sobrenadante se tomó una alícuota a la cual se le determinó la cantidad de proteína presente según el método descrito en la sección 3.1, adicionalmente se determinó la actividad de la enzima presente en el sobrenadante como se describe en la sección 3.2. La actividad volumétrica obtenida en esta etapa se multiplicó por el volumen de enzima utilizado para determinar las unidades contactadas en este.

La actividad catalítica de la enzima entrecruzada se determinó mediante la diferencia entre las unidades obtenidas en las etapas 4 y 5 dividida entre la diferencia de proteína determinada en estas mismas etapas.

3.4.1. 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.

3.5. Inmovilización Sobre Soportes Activados Con Grupos Epóxidos (Eupergit C)

La inmovilización sobre soportes activados con grupos epóxido se llevó a cabo preparando una suspensión de 15mg de enzima en 20ml de de buffer acetato a un pH de 7, 0,5M, a la cual se le adicionaron 4g del soporte Eupergit C. La mezcla fue agitada durante 1 hora y posteriormente almacenada durante 72 horas a temperatura ambiente, agitándola ocasionalmente. Posteriormente, la fase sólida fue separada de la líquida por filtración y lavada varias veces con buffer acetato de concentración 20mM y pH 7 [39].

3.5.1. Determinación del pH y la fuerza iónica para llevar a cabo la inmovilización sobre el soporte Eupergit C

Variación del pH

La inmovilización se llevó a cabo como se describió en la sección 3.5 variando el pH entre 4,7, 6 y 7 aumentando el tiempo de inmovilización a 8 horas.

Variación de la fuerza iónica

La inmovilización se realizó de la misma forma en que se describe en la sección 3.5, variando la fuerza iónica del medio entre 0,1; 0,5 y 1M ampliando el tiempo de inmovilización a 9 horas.

Para monitorear el proceso de inmovilización de la glucoamilasa sobre el Eupergit C, se tomaron alícuotas del sobrenadante de la suspensión a diferentes horas, a las cuales se les determinó la actividad y la cantidad de proteína según como se describe en la sección (3.2 y 3.1)

3.6. Determinación de los parámetros que afectan la actividad Catalítica de la Glucoamilasa

Se realizó la evaluación de los parámetros pH, temperatura y concentración de almidón soluble, que afectan la actividad catalítica de la glucoamilasa. Estos procedimientos se llevaron a cabo de la misma forma tanto para la enzima soluble, como para la entrecruzada.

3.6.1. Estimación de la influencia del pH sobre la actividad catalítica

La determinación de la influencia del pH sobre la actividad catalítica de la glucoamilasa, se determinó incubando la enzima en un rango de pH cuyos valores se variaron de la siguiente manera (pH 2; 3; 4; 4,7; 5; 6; 7). Posteriormente, se cuantificó la actividad de la enzima soluble y entrecruzada tal como se indica en la sección 3.2

3.6.2. Determinación de la cinética de Michaelis- Menten

La cinética de Michaelis Menten se determinó dejando constante la concentración de enzima y variando la concentración de almidón soluble y para cada valor de sustrato, se determinó la actividad catalítica.

3.6.3. Evaluación de la estabilidad térmica para la glucoamilasa soluble y entrecruzada

La estabilidad de la glucoamilasa frente a los cambios térmicos, se determinó incubando la enzima a diferentes temperaturas (50, 55, 60 y 70°C) durante 3 horas, entre las cuales periódicamente se tomaron alícuotas y se les determinó la actividad catalítica.

3.7. Determinación de Glucosa Mediante el Kit de la Glucosa Oxidasa

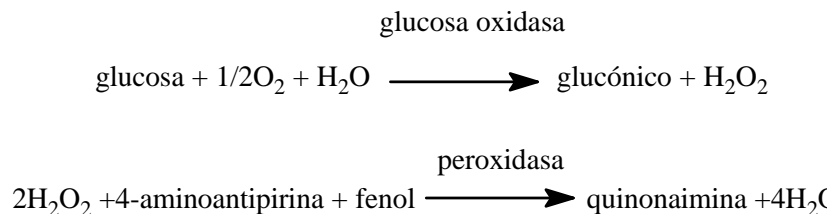
3.7.1. Obtención de las muestras para ser analizadas por el kit de glucosa

Se llevó a cabo la hidrólisis del almidón por parte de la glucoamilasa tal como se describe en la sección 3.2, a partir de dos sustratos diferentes, uno de ellos fueron las dextrinas obtenidas mediante el proceso de licuefacción del almidón crudo por parte de la alfa-amilasa, y el otro sustrato utilizado fue el almidón soluble que se utilizó para todos los ensayos realizados en este proyecto.

Los productos de la hidrólisis de los sustratos utilizados se recogieron para ser analizadas mediante el kit de glucosa.

3.7.2. Determinación de la cantidad de glucosa presente en los productos de hidrólisis de las dextrinas de almidón.

La glucosa presente en la muestra se determinó mediante una serie de reacciones acopladas un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, estas reacciones se muestran a continuación.



Descripción de los reactivos utilizados en el kit de la glucosa oxidasa.

A. Reactivo: fosfatos 100mmol/L, fenol 5mmol, glucosa oxidasa >10U/ml, peroxidasa >1U/ml, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L pH 7,5.

S. Patrón: patrón de glucosa/urea/creatinina. Glucosa 100mg/dL (5,55mmol/L), urea 50mg/dL, creatinina 2mg/dL. Patrón primario acuoso.

Procedimiento:

1. Atemperar el reactivo.
2. Se prepara el reactivo, la muestra y el patrón tal como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5 Preparación del blanco, patrón y la muestra.

	<i>Blanco</i>	<i>Patrón</i>	<i>Muestra</i>
Patrón S	-	10 μ L	-
muestra	-	-	10 μ L
Reactivo A	1,0ml	1,0ml	1,0ml

3. agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente (16 - 25°C) o durante 5 minutos a 37°C.
4. Leer la absorbancia del patrón y de la muestra a 500nm frente al blanco. El color es estable durante al menos 2 horas.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Agregados Entrecruzados de Glucoamilasa Utilizando Sulfato de Amonio Como Agente Precipitante.

La elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa se llevó a cabo tal como se describe en la sección 3.4, del presente trabajo y los resultados se muestran en la Tabla 6.

De la Tabla 6 se puede observar que los valores de actividad catalítica obtenidos para los agregados entrecruzados de glucoamilasa elaborados bajo las diferentes condiciones de estudio, muestran un drástico descenso de la actividad catalítica en comparación con los valores obtenidos para el biocatalizador en forma soluble. Esto se evidencia en la disminución de la actividad para los agregados entrecruzados en un factor aproximadamente de 15 con respecto a la enzima soluble cuyo valor de actividad fue de 43U/mg.

Las causas que conducen a un descenso en la actividad catalítica, cuando la enzima se somete al proceso de entrecruzamiento, se podrían explicar de varias maneras, una de ellas es la forma que adquieren las partículas de los agregados entrecruzados, la cual puede ser principalmente de dos clases; forma de bolas y forma de clusters. Las primeras permiten una mayor superficie de contacto con el sustrato y por ende una mayor catálisis. Los clusters son conglomerados de partículas de CLEA, en los cuales no se facilita el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima debido al impedimento estérico que unas partículas ejercen sobre otras y por ende se ve reducido el proceso de catálisis [29].

Por otra parte, las partículas de CLEA están conformadas por moléculas de enzima que se encuentran en el interior y exterior de su estructura, siendo estas últimas las que presentan un mayor grado de distorsión en su conformación tridimensional, lo cual en ciertas ocasiones desfavorece la catálisis debido a que las moléculas periféricas son las que entran en mayor contacto con el sustrato [40].

Tabla 6 Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados Utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.

<i>Experiencia Nº.</i>	<i>concentración sulfato amonio (%p/v)</i>	<i>concentración glutaralhido (%p/v)</i>	<i>concentración enzima (mg/ml)</i>	<i>Actividad especifica (U/mg)</i>
1	-1	-1	-1	0,178
2	-1	1	1	0,010
3	0	1	1	0,077
4	-1	1	0	0,367
5	1	0	0	0,207
6	0	0	1	0,024
7	1	0	1	0,053
8	-1	-1	1	0,137
9	1	1	-1	1,614
10	-1	0	-1	0,781
11	0	-1	0	0,332
12	0	1	-1	0,975
13	0	0	-1	2,436
14	-1	-1	0	0,340
15	-1	0	1	0,092
16	1	-1	0	3,131
17	1	1	1	0,130
18	1	0	-1	4,051
19	1	1	0	5,289
20	0	-1	1	0,037
21	0	0	0	2,723
22	1	-1	1	0,163
23	0	-1	-1	1,611
24	-1	0	0	0,190
25	0	1	0	0,098
26	-1	1	-1	0,609
27	1	-1	-1	0,699

Actividad específica para la enzima soluble 43U/mg

Cuando la enzima se somete al proceso de entrecruzamiento, esta adquiere una nueva conformación debido a la rigidez que obtiene al formar enlaces covalentes con las moléculas de glutaraldehído; esta nueva conformación hace que el sustrato no pueda acceder fácilmente al sitio activo de la enzima provocándose un descenso en la actividad catalítica [29].

El rol que juega el sustrato es de gran importancia en el proceso de la catálisis, debido a que el almidón es muy voluminoso y por esta razón las moléculas de enzima que se encuentran hacia la parte interna de los CLEAs no alcanzan a interactuar con el polisacárido, desperdiándose gran parte de su actividad. [7, 40].

Adicional al efecto que el tamaño del almidón ocasiona sobre la actividad catalítica, para el caso específico de la glucoamilasa se sabe que esta puede producir mayores rendimientos de glucosa si hay una mayor cantidad de dextrinas, debido a que hay un aumento en la disponibilidad de extremos no reductores. [24, 25]

Para estudiar el efecto del tamaño del sustrato y de una mayor disponibilidad de extremos no reductores sobre la enzima soluble y entrecruzada se determinó la cantidad de glucosa producida por la amiloglucosidasa a partir de almidón soluble disponible comercialmente y a partir de dextrinas de almidón crudo que fueron sometidas al proceso de licuefacción por parte de la alfa-amilasa, los resultados se muestran en la Tabla 7.

Comparando la cantidad de glucosa que se puede obtener a partir de la enzima soluble y los agregados entrecruzados, se evidencia una acentuada caída en la producción de glucosa por parte de la enzima entrecruzada, lo cual permite afirmar que parte de este descenso se debe al difícil acceso del sustrato a todas las moléculas de enzima que conforman las partículas de los CLEA.

Tabla 7 Producción de glucosa utilizando la enzima soluble y entrecruzada, y como sustrato almidón soluble y de dextrinas obtenidas del proceso de licuefacción de almidón crudo.

<i>SUSTRATO</i>	<i>Producción de glucosa a partir de glucoamilasa</i>	
	<i>soluble</i> <i>(mg de glucosa/mg</i> <i>enzima*h)</i>	<i>entrecruzada</i> <i>(mg de glucosa/mg</i> <i>enzima *h)</i>
Dextrinas de almidón soluble comercial	162,125	2,82
Dextrinas de almidón licuado	640,70	2,97

Tiempo de reacción: 0,67 horas.

Volumen de enzima soluble y entrecruzada: 500 µL

Volumen de ensayo 6 ml

mg de enzima soluble utilizada: 0,6 mg

mg de enzima entrecruzada utilizada: 2,65 mg

concentración de sustrato: 10 mg/ml

Al comparar los resultados obtenidos para la obtención de glucosa a partir de almidón soluble comercial y de dextrinas resultantes del proceso de licuefacción, se observa un claro aumento en la producción de glucosa a partir de estas últimas, tanto para la enzima soluble como para los agregados entrecruzados ratificando el hecho de que a una mayor disponibilidad de extremos no reductores se mejora la catálisis de la glucoamilasa. [24, 25]

Con los resultados obtenidos en el diseño experimental utilizando sulfato de amonio como agente precipitante, se realizó un análisis de varianza ANOVA con el fin de determinar la significancia estadística de cada uno de los factores en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados.

De la Tabla 8 se determinó que la concentración del sulfato de amonio y de enzima, ejercen una influencia significativa en el proceso de elaboración de los CLEAs de glucoamilasa puesto que se obtuvo un valor de $P = 0,03$ y $P = 0,0348$ respectivamente para un intervalo de confianza del 95%.

El diagrama de Pareto (Figura 10) elucida la significancia de cada uno de los factores. En él se aprecia 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 glucoamilasa. La línea vertical que aparece en el gráfico permitió determinar qué efectos son estadísticamente significativos en un 95% de nivel de confianza.

Tabla 8 Estimación efectos significativos en el entrecruzamiento de agregados de glucoamilasa utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Valor de P</i>
A	8,86725	1	0,0300
B	0,35884	1	0,6398
C	8,31403	1	0,0348
AA	0,03721	1	0,8799
AB	0,61229	1	0,5420
AC	1,83129	1	0,2968
BB	0,52331	1	0,5726
BC	0,05739	1	0,8511
CC	2,52551	1	0,2233
Error	26,8736	17	

A: Concentración de sulfato de amonio

B: Concentración de glutaraldehído

C: Concentración de enzima

Las concentraciones de sulfato de amonio estudiadas para este diseño experimental fueron 5, 12,5 y 20%.p/v. Dichas concentraciones fueron seleccionadas debido a que previamente se realizó un barrido a concentraciones superiores al 50% p/v, determinándose que ocasionaban una inactivación parcial y en algunos casos total de la enzima, debido probablemente a la interacción de

los iones amonio con los aminoácidos ácidos del sitio activo de la enzima, los cuales se bloquean y por ende no se lleva a cabo la hidrólisis del almidón [13, 41]

Gráfico de Pareto estandarizado para actividad específica:

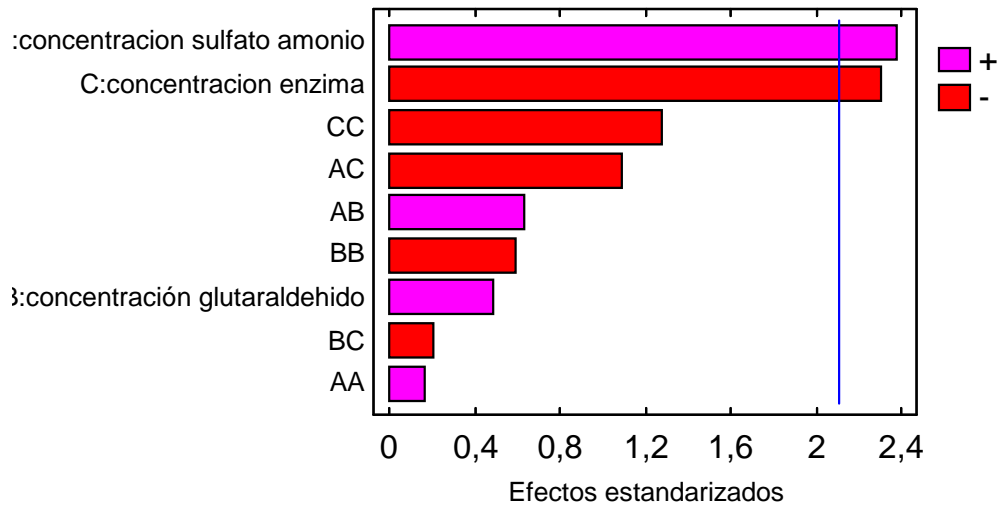


Figura 10 Efectos estimados para cada variable evaluada en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.

Teniendo en cuenta las bajas fuerzas iónicas utilizadas para llevar a cabo la precipitación de la enzima, se puede afirmar que estas influyeron desfavorablemente en el proceso de catálisis del almidón, ya que estudios realizados para otras enzimas muestran que bajas concentraciones de la sal (iguales o inferiores a 40%) ocasionan baja precipitación de la proteína formándose agregados de tamaños poco apropiados para ejercer la catálisis [13, 41].

La concentración de sulfato, también influye en la forma que adquieren los agregados entrecruzados, ya que bajas concentraciones de sulfato generan partículas con forma semejante a la de los granos de maíz con poca porosidad entre ellas, lo cual ocasiona una difícil acceso del sustrato. En cambio se ha visto que para concentraciones altas de sulfato de amonio, las partículas de CLEA son más uniformes y presentan una mayor porosidad [41], que facilita el acceso del almidón. Para ilustrar lo anteriormente dicho se presentan las fotos obtenidas por Burcu Selin Aytar y col [41], 2008, para la enzima tirosinasa utilizando bajas y altas concentraciones de sulfato de amonio. Por último se sabe que el sulfato de amonio es una sal que ocasiona cambios en el estado de hidratación de las

moléculas lo cual ejerce una distorsión en la estructura de la enzima que puede ocasionar su consecuente denaturación [19].

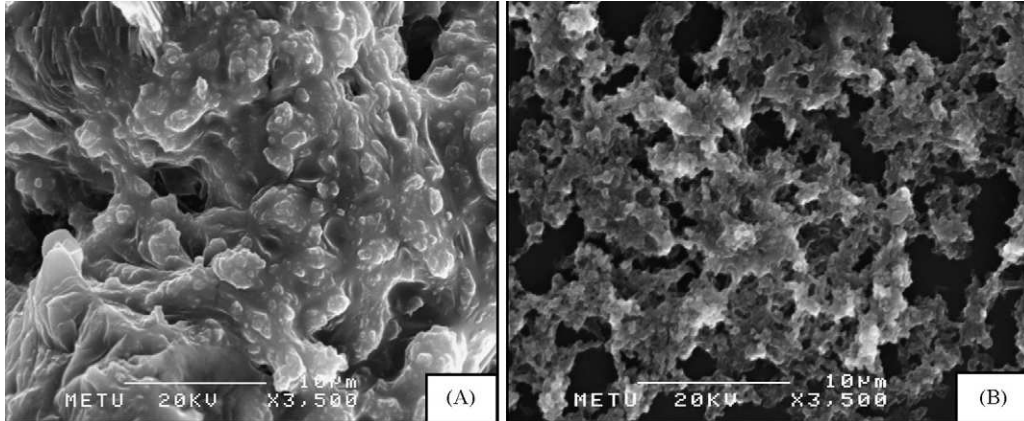


Figura 11 Microscopia confocal de barrido. (A) CLEAs con sulfato de amonio al 40%p/v. (B) CLEAs con sulfato de amonio al 80%p/v. [41]

La formación de CLEA con tamaños adecuados para la catálisis, también se ve influenciada por la cantidad de proteína disponible para precipitar y entrecruzar, debido a que a mayor cantidad de moléculas de enzima, habrán mayores posibilidades de entrecruzamiento [13, 15].

Aunque los preparados enzimáticos utilizados en el diseño fueron altamente concentrados (20, 30 y 40mg/ml), estos ocasionaron como se evidenció en el análisis estadístico pérdidas en la actividad catalítica de los elaborados entrecruzados, debido probablemente a impedimentos estéricos que son ocasionados por una elevada disponibilidad de moléculas de enzima y por el tamaño que estas poseen [28].

Posterior al análisis estadístico, se elaboraron los gráficos de superficie de respuesta y superficie de contorno con el objetivo de hallar la combinación de niveles en los factores que permiten maximizar la actividad específica de los agregados entrecruzados. En las Figuras 12 y 13 se muestran los gráficos de superficie de respuesta y superficie de contorno respectivamente para los resultados obtenidos en la Tabla 6.

SUPERFICIE DE RESPUESTA

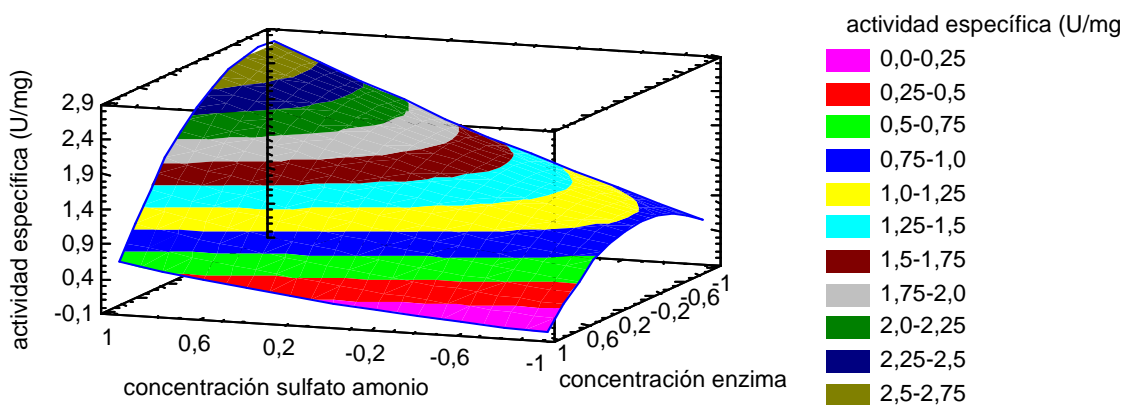


Figura 12 Superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa con sulfato de amonio como agente precipitante.

La Figura 12 muestra la actividad específica estimada como una función de la concentración de sulfato de amonio y de enzima. La altura de la superficie representa el valor de actividad específica.

Tabla 9 Valores óptimos para el proceso de elaboración de agregados entrecruzados de glucoamilasa utilizando sulfato de amonio como agente precipitante.

<i>Variables evaluadas en el proceso de entrecruzamiento de proteína</i>	<i>Valores óptimos predichos por el statgraphics</i>
Conc sulfato de amonio	20%p/v
Conc enzima	21,4mg/ml
Conc glutaraldehído	1,75%p/v

De la Figura 12 se determinó por interpolación la combinación de factores que permite la maximización de la actividad catalítica de los CLEAs de glucoamilasa. La Tabla 9 muestra las condiciones óptimas de cada factor para el proceso de elaboración de agregados entrecruzados.

CONTORNO DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA

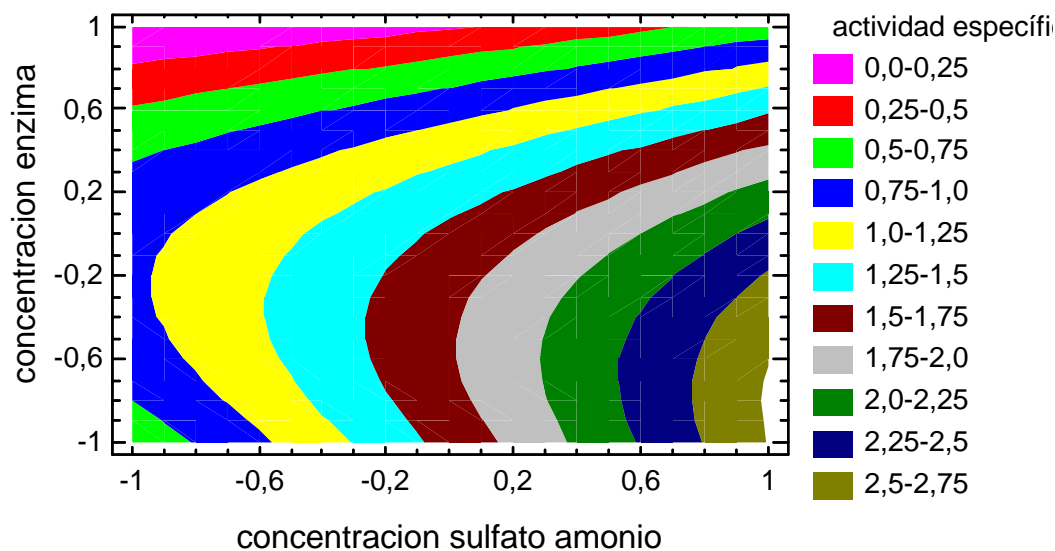


Figura 13 Contorno de superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa con sulfato de amonio como agente precipitante.

La Figura 13 muestra los contornos de la actividad específica de los agregados entrecruzados de glucoamilasa como una función de la concentración de sulfato de amonio y de enzima. Cada línea del contorno representa combinaciones de concentración de sulfato de amonio y de enzima que dan un valor seleccionado de actividad específica.

4.2. Agregados Entrecruzados de Glucoamilasa Utilizando 2-Butanol Como Agente Precipitante

Los agregados entrecruzados de amiloglucosidasa utilizando 2-butanol como agente precipitante fueron realizados según como se describe en la sección 3.4 del presente trabajo.

En la Tabla 10 se puede observar que en el proceso de entrecruzamiento de la enzima utilizando 2-butanol como agente precipitante no mejoró ni mantuvo la actividad catalítica de la enzima y que por el contrario se observó un fuerte descenso para la misma.

Esta disminución de la actividad, se debe a que se obtuvo una baja precipitación para la enzima bajo las diferentes condiciones de estudio establecidas para el 2-butanol. Con el objetivo de eliminar este inconveniente se adicionó una proteína inerte como el BSA con el fin de aumentar la cantidad de agregados físicos formados y aumentar el número de lisinas que favorecerían el posterior entrecruzamiento con el glutaraldehído [42]. Sin embargo, los resultados obtenidos para las experiencias mostraron actividades inferiores comparadas con las actividades de los CLEAs obtenidos en ausencia de BSA y aun más en comparación con la de la enzima soluble.

Esta disminución de la actividad de los CLEAs con BSA puede ser ocasionada posiblemente a que este alimentador proteico inerte provoca impedimentos estéricos, ya que no permite que las moléculas de enzima interactúen con el sustrato, esto se puede elucidar en la Figura 14, que representa una partícula de CLEA que contiene moléculas de enzima y de BSA en su estructura.

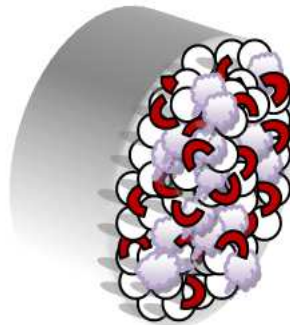


Figura 14 Se representa una partícula de CLEA en donde las moléculas de BSA (en violeta) dificultan el acceso del almidón a las moléculas de enzima (en blanco).

Para determinar la influencia de la adición de una proteína inerte sobre los CLEAs de glucoamilasa se realizó un screening, en el que no se adicionó el alimentador proteico. En la Tabla 11 se muestran los resultados más importantes obtenidos para estos ensayos.

Tabla 10 Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados Utilizando 2-butanol como agente precipitante.

<i>experiencia</i> N0	<i>conc.</i> butanol	<i>conc. Agente</i> entrecruzante	<i>CONC</i> enzima	<i>Actividad</i> Específica
1	-1	1	1	0,057
2	0	0	1	0,960
3	0	0	0	0,035
4	1	0	1	0,002
5	1	1	-1	0,007
6	0	-1	-1	0,015
7	0	-1	0	0,026
8	0	-1	1	0,012
9	-1	-1	-1	0,049
10	1	1	1	0,024
11	0	1	1	0,097
12	1	0	-1	0,015
13	-1	1	0	0,045
14	-1	-1	1	0,009
15	0	0	-1	0,110
16	0	1	-1	0,695
17	-1	0	-1	0,036
18	1	-1	-1	0,273
19	-1	0	1	0,045
20	1	0	0	0,025
21	-1	1	-1	0,025
22	1	1	0	0,216
23	1	-1	0	0,005
24	-1	-1	0	0,025
25	1	-1	1	0,003
26	-1	0	0	0,031
27	0	1	0	0,023

Tabla 11 Actividades específicas obtenidas para los CLEAs elaborados sin adición de proteína inerte.

<i>Experiencia NO</i>	<i>Concentración 2-butanol %v/v</i>	<i>Concentración Glutaraldehído %p/v</i>	<i>Concentración Enzima mg/ml</i>	<i>Actividad Específica U/mg</i>
1	50	0,5	20	1,23
2	70	1,25	30	1,54
3	90	2	40	0,98
4	70	2	20	1,66
5	90	0,5	40	0,78
6	50	2	30	1,36
7	70	1,25	20	1,19
8	50	2	40	1,83

De la Tabla 11 se puede observar que para casi todos los agregados entrecruzados de enzima, se obtuvo una actividad mayor que para los elaborados realizados bajo las condiciones del diseño experimental los cuales contenían BSA, Ratificándose el hecho de que el alimentador proteico influyó de forma desfavorable la catálisis enzimática. Sin embargo, en la Tabla 11 también se observa que los valores obtenidos para la actividad catalítica de la glucoamilasa entrecruzada sin BSA, siguen siendo muy bajos en comparación con la enzima soluble. Este hecho muestra que la principal causa en el descenso de la actividad no se debe a la influencia de la adición de una proteína inerte, sino a otros factores que tienen un mayor impacto como el solvente orgánico utilizado para llevar a cabo la precipitación.

Los solventes orgánicos proporcionan condiciones desfavorables para las enzimas, debido a que estas poseen aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran plegados hacia dentro de la molécula del biocatalizador y aminoácidos hidrofílicos que se encuentran rodeando la superficie externa de este, por ende si se altera el microambiente acuoso de las enzimas al exponerlas a un solvente orgánico como el 2-butanol, se promueve el desplegamiento de los residuos hidrofóbicos causando cambios conformacionales desfavorables para la enzima [43].

El microambiente acuoso de las enzimas es de gran importancia, debido a que este les permite mantener una cierta flexibilidad y conformación adecuada para la catálisis. Cuando este microambiente se ve alterado, la enzima pierde parte de esta flexibilidad necesaria para mantener su conformación tridimensional y así verse afectada la actividad catalítica [43], teniendo en cuenta que el solvente elegido es un alcohol y que este puede establecer puentes de hidrogeno con el agua que rodea la enzima, se esperaría que estas interacciones agua-solvente estén afectando la conformación nativa de la enzima [7].

Con los resultados obtenidos en el diseño experimental utilizando 2-butanol como agente precipitante, se realizó un análisis de varianza ANOVA con el fin de determinar la significancia estadística de cada uno de los factores en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12 Estimación efectos significativos en el entrecruzamiento de agregados de glucoamilasa utilizando 2-butanol como agente precipitante.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Valor de P</i>
A	0,00346	1	0,8088
B	0,03305	1	0,4579
C	0,00007	1	0,9730
AA	0,17724	1	0,0965
AB	0,00051	1	0,9259
AC	0,00597	1	0,7507
BB	0,01672	1	0,5960
BC	0,00461	1	0,7801
CC	0,04703	1	0,3775
Error total	0,97370	17	

A: concentración de 2-butanol

B: concentración de glutaraldehído

C: concentración de enzima

De la Tabla 12 se puede inferir, que ninguno de los factores evaluados en la elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa utilizando 2-butanol como agente precipitante fue significativo para el proceso, ya que no se presentaron valores de P inferiores a 0,05.

La Figura 15 muestra el diagrama de Pareto que ilustra 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 glucoamilasa. La línea vertical que aparece en el gráfico permite determinar qué efectos son estadísticamente significativos en un 95% de nivel de confianza.

Gráfico de Pareto estandarizado para actividad específica

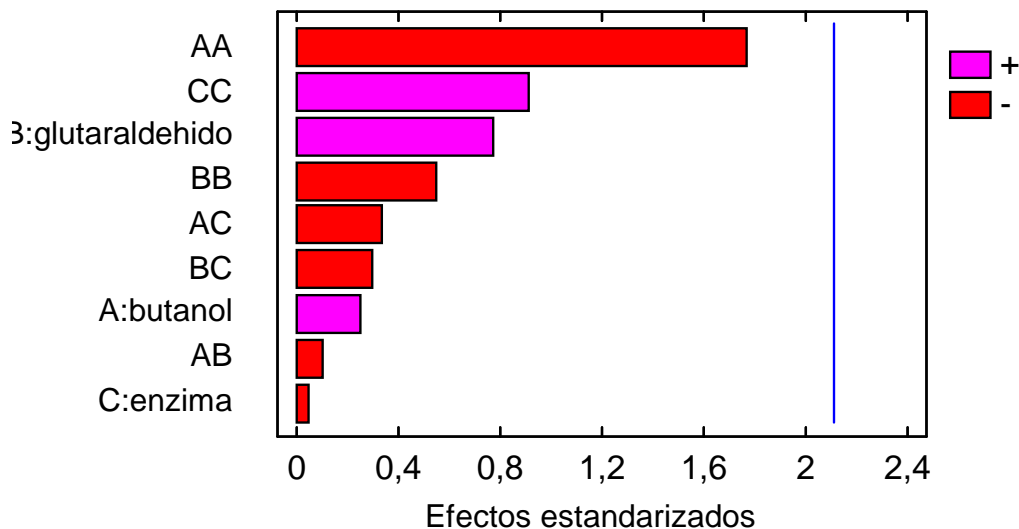


Figura 15 Estimación de los factores influyentes en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados de glucoamilasa utilizando 2-butanol como agente precipitante.

El anterior análisis estadístico permite concluir que al no ser significativa ninguna de las variables estudiadas en el proceso, la variación de los resultados obtenidos al realizar cada uno de los ensayos de la matriz del diseño experimental, se debe a la presencia de variables aleatorias que son inherentes a cualquier procedimiento experimental que se lleve a cabo. Debido a que ninguna de las variables evaluadas mostró un efecto significativo, se podría concluir que estas no influyen en el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados utilizando 2-butanol como agente precipitante.

Posterior al análisis estadístico realizado para los datos obtenidos en los diseños experimentales anteriormente planteados, se eligieron los valores óptimos mostrados en la tabla 9 para el proceso de elaboración de agregados entrecruzados de glucoamilasa con sulfato de amonio como agente precipitante, ya que mediante este procedimiento se obtuvieron mejores rendimientos que en el que se utilizó 2-butanol como agente precipitante.

Los estudios de pH, cinética y estabilidad térmica se realizaron con CLEAs elaborados bajo las condiciones óptimas descritas en la tabla 9.

4.3. Determinación de la Actividad Catalítica de la Glucoamilasa Soluble y Entrecruzada Bajo Diferentes Valores de pH

4.3.1. Determinación del pH

La determinación de la actividad catalítica de la enzima soluble y entrecruzada para diferentes valores de pH, se determinó como se indica en la sección 3.6.1.

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad específica para la enzima soluble y entrecruzada, se muestran tabulados y graficados en la Tabla 13 y Figura 16 respectivamente.

Mediante estos ensayos se pudo establecer que el pH es un parámetro de enorme importancia para la catálisis que efectúa la glucoamilasa, ya que se observa una marcada variación entre los valores de actividad específica obtenidos tanto para la enzima soluble como la entrecruzada. La importancia de este parámetro radica principalmente en la influencia que poseen los iones H^+ para alterar las cargas eléctricas de los grupos polarizados que posee la enzima, así como una variación en el estado de ionización de los aminoácidos que participan en la catálisis enzimática [40, 44].

Tabla 13 Valores de actividad específica para la glucoamilasa bajo diferentes condiciones de pH.

pH	Actividad Específica	
	enzima soluble %actividad residual	enzima inmovilizada %actividad residual
2	—	—
3	31,28	—
4	35,37	43,24
4.7	100	100
5	69,38	51,35
6	59,19	48,65
7	42,30	29,73

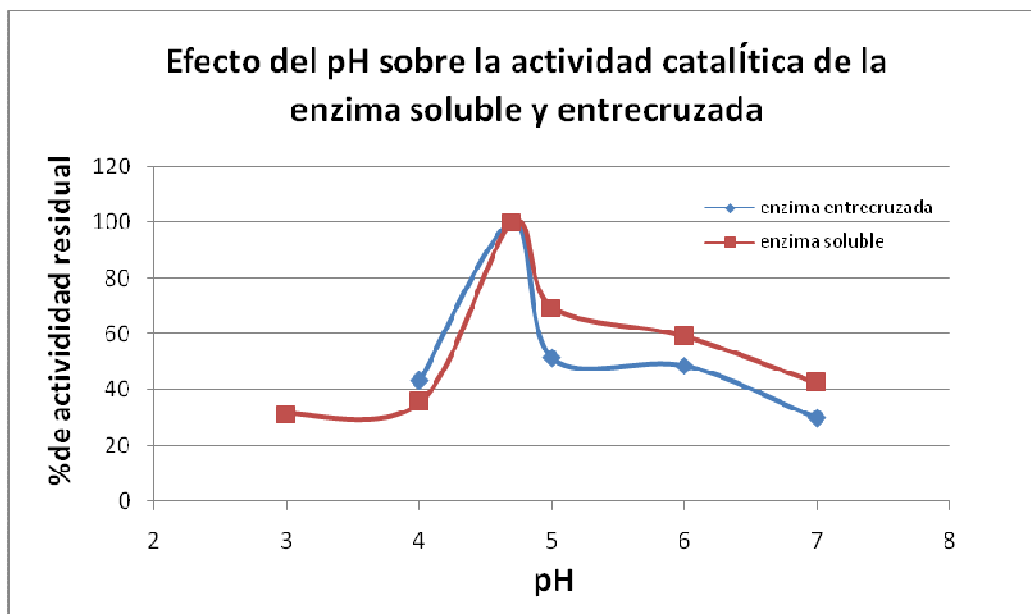


Figura 16 Actividad residual para la enzima soluble y entrecruzada a diferentes valores de pH. (En azul se muestra el comportamiento de los elaborados entrecruzados de glucoamilasa y en rojo el de la enzima soluble).

Al analizar los resultados obtenidos para las actividades de la enzima soluble y entrecruzada bajo diferentes valores de pH, se observa que los agregados

entrecruzados de glucoamilasa no alcanzan a registrar actividad a pH 3, como si lo registra la enzima soluble. Este comportamiento se debe principalmente a los cambios conformacionales que sufre la enzima al ser entrecruzada, ya que esta no posee la misma flexibilidad que presenta en su forma nativa; por otra parte se especula que al efectuarse el proceso de entrecruzamiento la mayor parte de los residuos de lisina se encuentran formando enlaces covalentes con las moléculas de glutaraldehído y como resultado de esto se presenta un exceso de cargas negativas sobre la superficie de la enzima [14], este efecto altera las interacciones electrostáticas necesarias para la conservación de la estructura terciaria del biocatalizador.

4.3.2. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para la Enzima soluble y entrecruzada.

La determinación de los parámetros cinéticos de un biocatalizador es de enorme importancia, ya que permiten conocer que tan afín es el catalizador con el sustrato que se desea transformar y con qué rapidez lo hace.

Con el propósito de determinar estos parámetros, se evaluó la actividad de la enzima soluble y entrecruzada manteniendo constante su concentración de proteína y variando la de del almidón soluble.

La determinación de estos parámetros, se realizó teniendo en cuenta que la glucoamilasa presenta una cinética de Michaelis Menten [8].

Los resultados obtenidos para la actividad específica de la enzima soluble y entrecruzada, se muestran en la Tabla 14.

De esta grafica se observa que tanto para la enzima soluble como para la entrecruzada la actividad crece hasta cuando la concentración de almidón soluble se hace 15mg/ml y posteriormente comienza a descender; esto quiere decir que el sitio activo de la enzima ya se ha saturado con el sustrato a esta

concentración y consecuentemente la velocidad máxima de catálisis comienza a verse casi constante debido a que toda la enzima ya se encuentra formando el complejo enzima-sustrato y no se puede transformar una mayor cantidad de almidón [19, 26].

Tabla 14 Valores de actividad específica para la enzima soluble y entrecruzada variando la concentración de almidón soluble.

Concentración de dextrinas de almidón comercial (mg/ml)	Actividad Específica	
	enzima soluble (U/mg proteína)	enzima entrecruzada (U/mg CLEA)
3	37.10	0.07
5	53.44	0.10
10	64.93	0.20
15	72.88	0.31
30	59.63	0.19
50	60.51	0.12
70	41.96	0.12

Cabe destacar que ésta no es la concentración a la cual se obtiene la mayor velocidad de catálisis de la glucoamilasa, debido a que esta crece asintóticamente con respecto a la concentración de sustrato y no es posible determinar exactamente este valor aunque, se sabe que se encuentra alrededor de 15mg/ml [28].

En las figuras 17 y 18 se muestra la representación de LINEWEAVER-BURK) en la cual se grafica el inverso de la actividad específica vs el inverso de la concentración de almidón soluble.

Tabla 15 Inverso de la actividad de la glucoamilasa, a diferentes concentraciones de almidón soluble.

$1/[dextrinas]$ mg/ml	$1/V$ E soluble [U/mg]	$1/V$ E inmovilizada [U/mg]
0.33	0.027	13.99
0.20	0.019	9.95
0.10	0.015	5.04
0.07	0.014	3.23

Para realizar esta representación gráfica, se utilizaron las concentraciones de 3, 5, 10 y 15mg/ml, debido a que estos son los valores que muestran el ascenso lineal de la actividad para la enzima soluble y para los agregados entrecruzados. Estos valores se muestran en la Tabla 15.

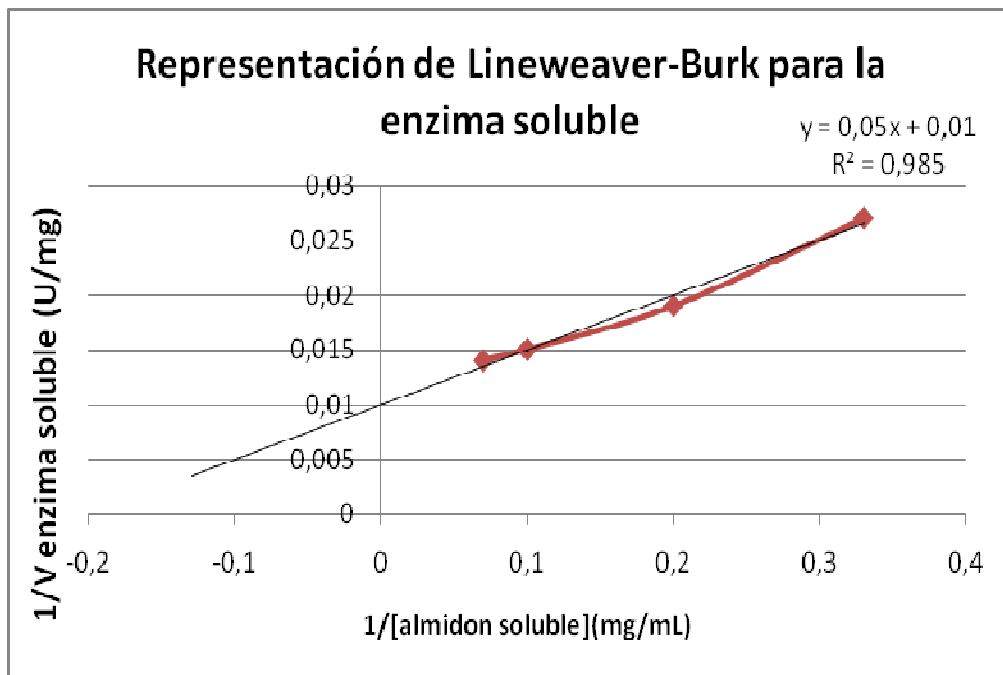


Figura 17 Representación de Lineweaver-Burk para la enzima soluble

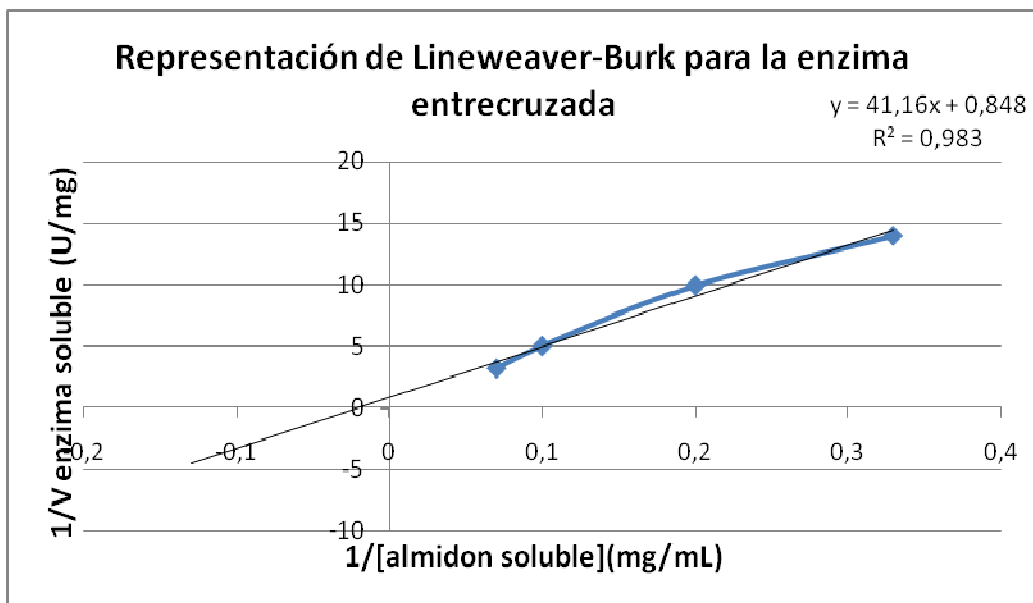


Figura 18 Representación de Lineweaver-Burk para la enzima entrecruzada

El parámetro V_{max} , representa la máxima velocidad obtenida, cuando la enzima está completamente saturada con su sustrato [44]; por otra parte está establecido en muchos cursos de enzimología básica, que K_m es una medida inversa de la afinidad de una enzima por el sustrato [28]; es decir, cuanto más pequeña es la constante de Michaelis K_m más alta será la afinidad de la enzima por su sustrato, en otras palabras el complejo ES estará más fuertemente enlazado y rara vez se disociará sin llevarse a cabo la transformación y dar lugar al producto.

Tabla 16 Parámetros cinéticos K_m y V_{max} para la enzima soluble y entrecruzada.

<i>Parámetro cinético</i>	<i>Enzima soluble</i>	<i>Enzima entrecruzada</i>
K_m (mg/ml)	4.76	40.63
V_{max} (U/mg)	98.04	1.01

De los valores de la Tabla 16 se puede ver claramente que con el proceso de entrecruzamiento de la glucoamilasa, la velocidad de catálisis del almidón disminuye drásticamente desde 98.04 hasta 1.01U/mg, así como también la constante de afinidad de la enzima por el almidón soluble desciende desde 0,21 hasta 0.025; luego se puede especular que la fuerza del complejo enzima-sustrato

para la enzima entrecruzada no es suficientemente fuerte como para llevarse a cabo una adecuada transformación del sustrato [7, 28]; este fenómeno entonces se refleja en el descenso de la actividad de la glucoamilasa en su forma entrecruzada comparada con la enzima en solución.

Esta disminución en la actividad de del biocatalizador en forma entrecruzada, se debería principalmente a las limitaciones difusionales que conlleva el proceso de entrecruzamiento [13, 40, 41], ya que el sustrato no puede acceder a las moléculas de enzima que se encuentran hacia la parte interna de las partículas de los CLEAs, debido a que el almidón es muy voluminoso y también a que posiblemente el tamaño de partícula de los CLEA es muy grande. Por ende se sospecha que solo las moléculas que están hacia la parte más externa del CLEA son las que logran interactuar con las dextrinas de almidón, desperdiciándose así una gran cantidad de moléculas de enzima que no alcanzan a realizar la catálisis, situación que no se presenta en la enzima soluble debido a que todas las moléculas de la enzima tienen igual oportunidad de interactuar con el sustrato [15].

4.3.3. Comparación de la Estabilidad Térmica de la Enzima Soluble Frente a la Enzima Entrecruzada.

Para determinar el efecto de la temperatura, en la estabilidad de la enzima, se incubó la enzima soluble y entrecruzada, a varias temperaturas (50°C, 55°C, 60°C y 70°C) durante tres horas de calentamiento. Se eligieron estas temperaturas, debido a que se conocía previamente de la ficha técnica de la enzima, que la mejor temperatura de trabajo para la glucoamilasa es 55°C. Estos ensayos permitieron calcular las constantes de inactivación tanto de la glucoamilasa soluble como de los CLEAs elaborados bajo las condiciones óptimas.

En la Tabla 17 se presentan las constantes de inactivación para la enzima soluble y entrecruzada, y se presenta en forma gráfica el descenso de la actividad catalítica a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo de calentamiento.

Tabla 17 Constantes de inactivación de la enzima soluble y los CLEAs

<i>Temperatura °C</i>	<i>Ki enzima soluble min⁻¹</i>	<i>Ki CLEAs min⁻¹</i>
50	0.0025	0.0065
55	0.0032	0.0068
60	0.0039	0.0080
70	0.0133	0.0138

De la Tabla 17 se observa que las constantes de inactivación, fueron notablemente mayores para la enzima entrecruzada que para la enzima soluble excepto a 70°C en donde las dos constantes están muy cercanas entre si debido a que a esta temperatura, tanto para la enzima soluble como para la entrecruzada se ha distorsionado completamente la estructura terciaria.

De la Tabla 17 también se puede concluir que la temperatura que causa el efecto menos desestabilizante sobre la enzima soluble y entrecruzada es 50°C.

De las Figuras 19, 20 y 21; se puede concluir que los elaborados entrecruzados de glucoamilasa no son más estables que la enzima soluble frente a ninguna temperatura de trabajo.

Este resultado es totalmente contrario a las expectativas que se tenían al entrecruzar la enzima, pues está ampliamente demostrado que los procesos de entrecruzamiento generalmente incrementan la estabilidad aún cuando se disminuye el rendimiento del biocatalizador [28, 29], sin embargo se ha visto que para algunas enzimas los procesos de inmovilización no generan un aumento en la estabilidad de la enzima [28].

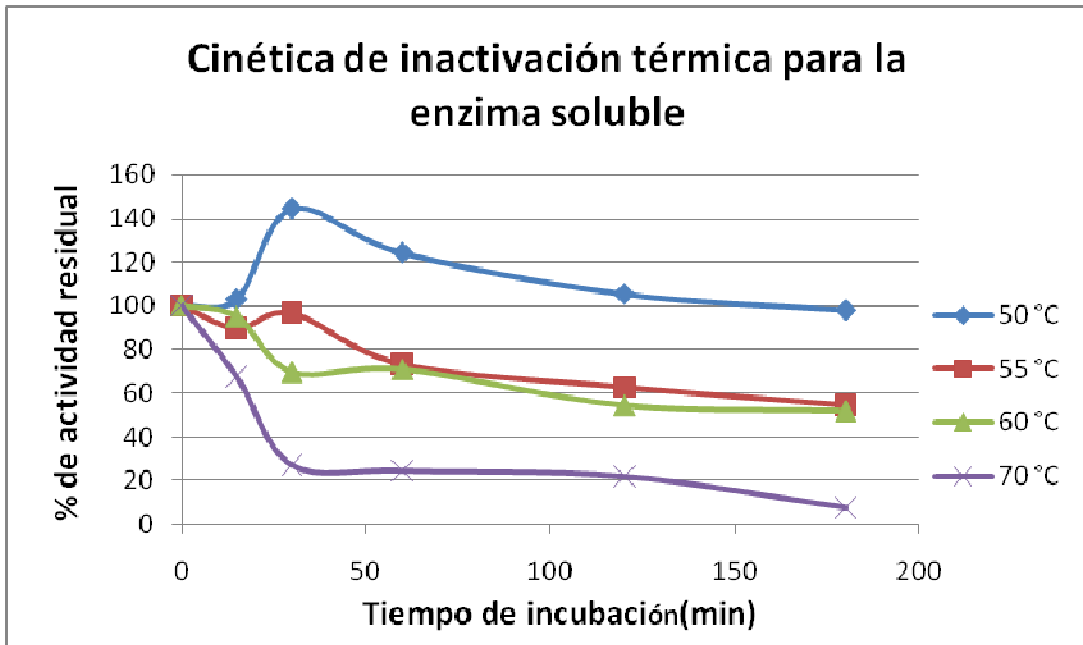


Figura 19 Actividad residual vs tiempo para la enzima soluble. 50°C

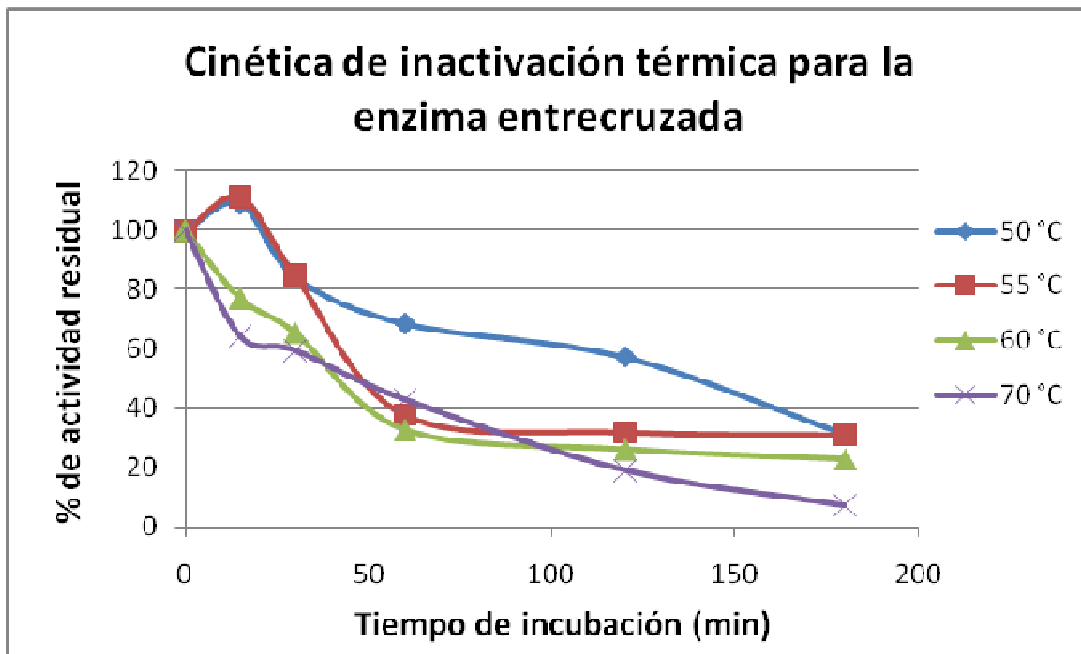


Figura 20 Actividad residual vs tiempo para la enzima entrecruzada

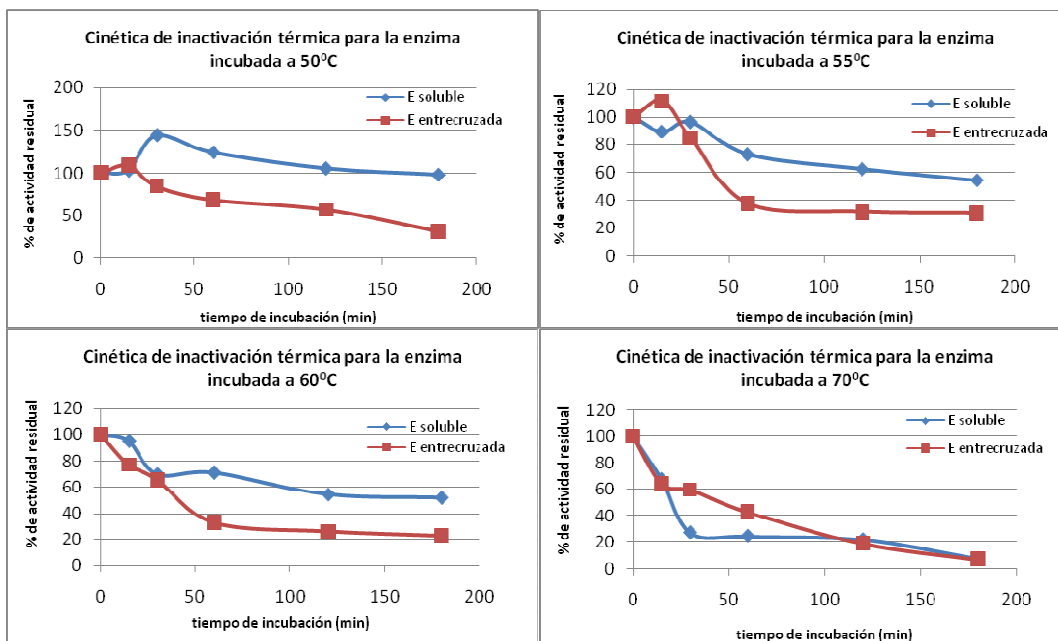


Figura 21 Comparación de la cinética de inactivación para la enzima soluble y entrecruzada. Las líneas continuas representan la actividad para la enzima soluble y las líneas punteadas la actividad residual para la enzima entrecruzada.

Para este caso particular se demuestra, que aunque la enzima ha ganado rigidez al formar enlaces covalentes principalmente entre sus restos lisínicos y las moléculas de glutaraldehído, indudablemente se ocasionaron cambios conformacionales desfavorables para el biocatalizador.

Estos cambios conformacionales se pueden atribuir a muchas razones como por ejemplo una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos al ambiente acuoso, lo cual causa un descenso en la entropía y una posible desestabilización en la conformación de la enzima; otra razón podría ser la ruptura de enlaces covalentes, puentes de hidrogeno o en general la alteración de todas las interacciones necesarias para mantener la conformación de la enzima en su estado energético más estable [28, 44].

Cuando se estudia la estabilidad de una enzima entrecruzada, se deben tener en cuenta otros factores que contribuyen a este efecto de estabilización, pues se sabe que no todas las moléculas de enzima que conforman los CLEAs tienen igual oportunidad de interactuar con el sustrato [40] y que son las más externas las que logran hacerlo; cuando estas se desnaturalizan las moléculas que entran

a hacer parte de la catálisis son aquellas que inicialmente no tenían acceso al sustrato y este proceso se va repitiendo hasta una completa desnaturalización [28]. Es posible que los agregados de glucoamilasa no exhiban este efecto, debido a que presentan una forma que no permita acceder el almidón a las moléculas mas internas aun cuando las mas externas ya se hayan desnaturalizado.

4.4. Inmovilización Sobre Soporte Activado Con Grupos Epóxido

La inmovilización sobre el soporte activado con grupos epóxido eupergit C, se llevo a cabo como se describe en la sección 3.5 del presente trabajo.

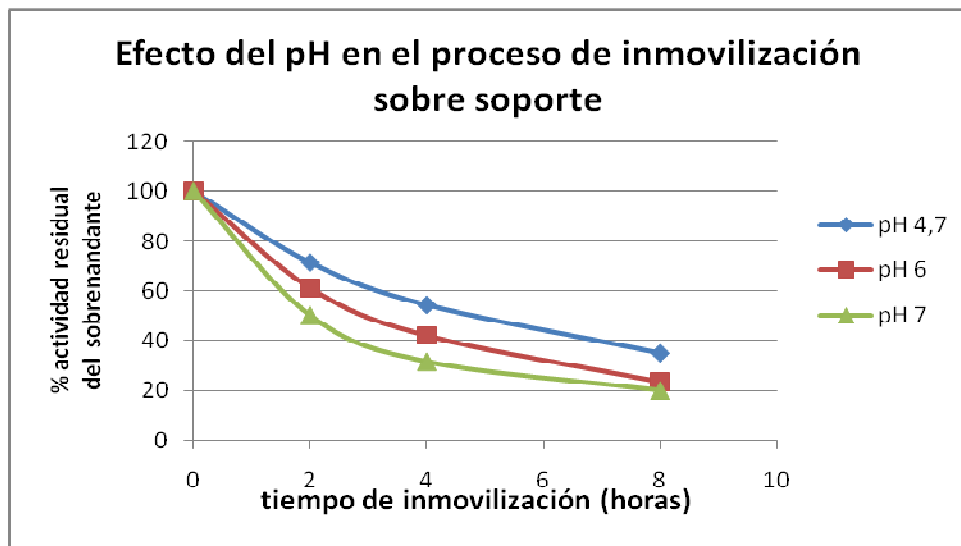


Figura 22 Efecto del pH en el proceso de inmovilización de la glucoamilasa sobre soportes activados con grupos epóxido. Las actividades determinadas corresponden a la enzima presente en el sobrenadante, donde la actividad inicial fue 43,3 (U/mg).

Los resultados obtenidos al evaluar la influencia del pH y la fuerza iónica en el proceso de inmovilización de la glucoamilasa sobre el soporte eupergit C se muestran en la Figura 22 y 23 respectivamente.

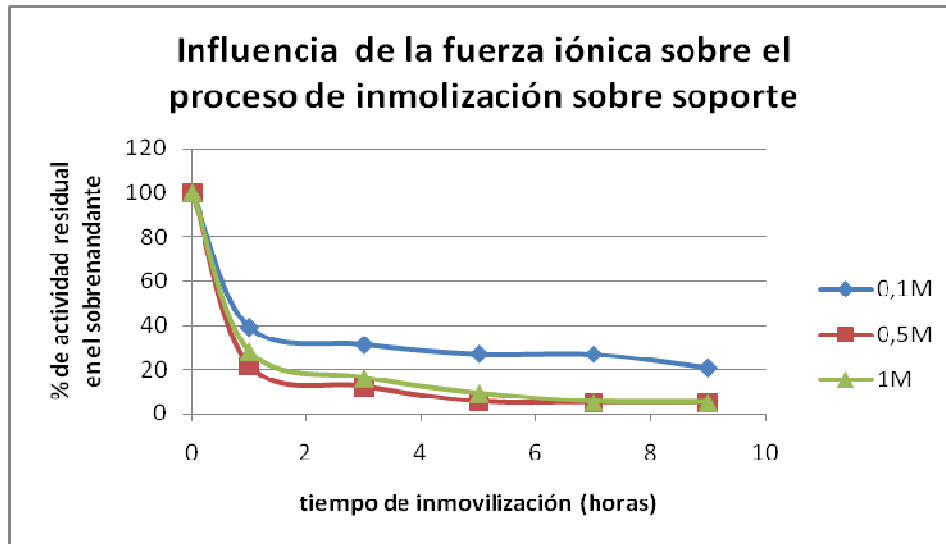


Figura 23 Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización de la glucoamilasa sobre soportes activados con grupos epóxidos. Las actividades determinadas corresponden a la enzima presente en el sobrenadante, donde la actividad inicial fue 43,3 (U/mg).

Mediante el análisis de la Figura 22 se puede concluir que el pH juega un rol muy importante en el proceso de inmovilización de la glucoamilasa, ya que se observa un mayor descenso en la actividad del sobrenadante evaluado a pH 7, que a los otros valores de pH establecidos, lo que indica que la mayor cantidad de proteína se está pegando al soporte bajo las condiciones de pH neutro [29].

Este comportamiento se debe principalmente a la forma en que se encuentran los grupos nucleofílicos de la enzima, que son los que interaccionan con los grupos epóxido del soporte, a valores de pH neutro la gran mayoría de los grupos nucleofílicos (amino, tiol, hidroxilo) se encuentran desprotonados y con pares de electrones libres, que pueden atacar los grupos epóxido del soporte [16, 39].

De la Figura 23 se puede observar que el proceso de inmovilización también se ve ampliamente influenciado por el efecto de la fuerza iónica, evidenciándose que entre más baja es esta, menor cantidad de proteína se pega sobre el soporte en comparación con la que lo hace a fuerzas iónicas más altas. La influencia de este parámetro radica en que el proceso de inmovilización sobre el Eupergit C, se lleva a cabo en dos etapas, siendo la primera una adsorción de carácter hidrofóbico sobre la matriz del soporte la cual se promueve a fuerzas iónicas altas [16, 29]. La segunda etapa es la formación de enlaces covalentes entre los grupos

nucleofílicos de la enzima y los grupos epóxido del soporte la cual se ve principalmente influenciada por el pH, como se ha explicado anteriormente. Sin embargo en la grafica se muestra que fuerzas iónicas muy elevadas no siempre permiten la mayor adsorción de la proteína sobre el soporte, debido a que bajo estas condiciones pueden presentarse impedimentos estéricos que no faciliten la etapa de adsorción [16, 29, 39, 45].

Adicionalmente, se puede observar que bajo las condiciones de inmovilización utilizadas, para las fuerzas iónicas de 0,5 y 1M, se presenta un punto a partir del cual la actividad de la enzima comienza a verse constate, debido a que se ha inmovilizado la máxima cantidad de proteína posible bajo las condiciones de estudio.

Para determinar las mejores condiciones de insolubilización de la glucoamilasa utilizando un soporte, se calculó el porcentaje de inmovilización de la enzima sobre el Eupergit C, los datos se muestran en las tablas 18 y 19 para mostrar la influencia del pH y la fuerza iónica respectivamente.

Por otra parte se determinó la actividad del biocatalizador inmovilizado en donde no se observó la expresión de la catálisis bajo ninguna de las condiciones estudiadas en el proceso de inmovilización de la enzima sobre el soporte.

Tabla 18 Porcentaje de inmovilización bajo diferentes valores de pH y expresión de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada.

pH	Actividad expresada para la enzima inmovilizada	% de Inmovilización
4.7	N.D	69,06
6	N.D	76,40
7	N.D	79,95

Tabla 19 Porcentaje de inmovilización bajo diferentes valores de fuerza iónica y expresión de la actividad catalítica para la glucoamilasa inmovilizada.

Fuerza iónica	Actividad expresada para la enzima inmovilizada	% de Inmovilización
---------------	---	---------------------

0,1M	N.D	79,05
0,5M	N.D	95,02
1M	N.D	94,90

De las tablas 18 y 19, se puede observar que las mejores condiciones de insolubilización de la glucoamilasa, se llevaron a cabo bajo un pH de 7 y una fuerza iónica de 0.5M, condiciones en las que se obtuvo el mayor porcentaje de inmovilización. Adicionalmente en las tablas también se muestra que no se pudo determinar la actividad catalítica de la enzima bajo ninguna de las condiciones de estudio, estableciéndose que en el proceso de inmovilización el sitio activo de la glucoamilasa se habría bloqueado totalmente por los grupos epóxidos o por algunos bolsillos hidrófobos del soporte, y por ende la enzima no puede ejercer ninguna biocatálisis [28].

Por esta razón no fue posible evaluar ninguno de los parámetros pH, cinética y estabilidad térmica que se evaluaron para la enzima soluble y entrecruzada.

4.5. Electroforesis de Glucoamilasa (*Streptomyces Rubiginosus*) en Geles de poliacrilamida (SDS/PAGE y PAGE)

La glucoamilasa es una enzima que dependiendo de su origen de proveniencia puede presentar variadas isoenzimas, que al ser analizadas mediante la técnica de electroforesis SDS/PAGE y PAGE pueden ser ampliamente diferenciadas [23], en general se han reconocido 3 isoenzimas para las glucoamilasas que provienen de algunas cepas fúngicas, las cuales fueron descritas en la sección 2.3.1 del presente trabajo. El proceso de entrecruzamiento de la enzima bajo las condiciones óptimas, se monitoreó mediante la técnica de electroforesis SDS/PAGE para lo cual se tomaron periódicamente alícuotas durante 3 horas de inmovilización; en la Figura 24 se presenta la electroforesis SDS/PAGE y PAGE para la glucoamilasa de *Streptomyces rubiginosus*.

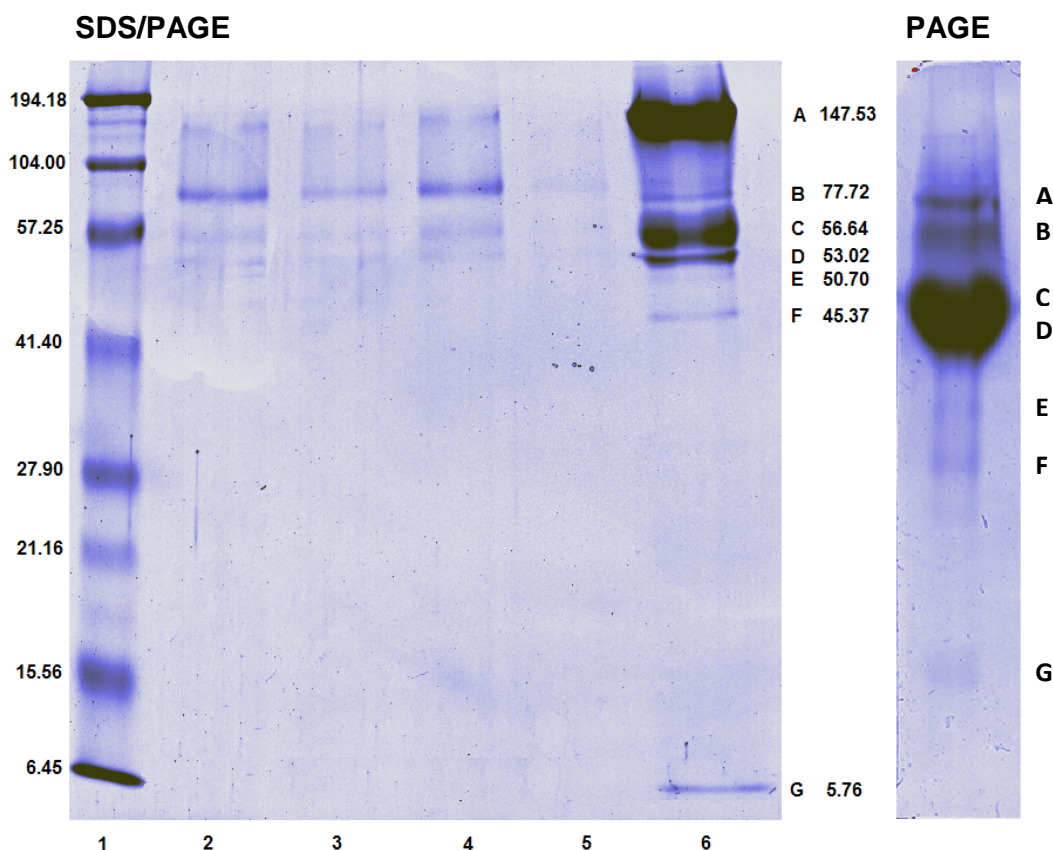


Figura 24 Electroforesis SDS/PAGE (izquierda) y PAGE,(derecha) para la glucoamilasa proveniente de la cepa fúngica (*Streptomyces Rubiginosus*).

Electroforesis SDS/PAGE: Carril 1: marcador de peso molecular Bio Rad. Carril 2: 30 minutos de inmovilización. Carril 3: 2 horas de inmovilización. Carril 4: 1 hora de inmovilización. Carril 5: 3 horas de inmovilización. Carril 6 extracto crudo de glucoamilasa. *Electroforesis PAGE:* extracto crudo de glucoamilasa.

Caracterización de las bandas

La banda representada como A, es tanto para la electroforesis SDS/PAGE como para la PAGE, la isoenzima GA1 de la glucoamilasa la cual está compuesta por el dominio catalítico y el dominio enlazante del almidón unidos por el puente O-glicosilado[32], y presenta un peso molecular aparente de 147,53KDa, el cual es un poco mayor de lo que generalmente se reporta en la literatura debido a que su alta glicosilación retarda el descenso la proteína; las bandas C y D, representan las isoenzimas de la glucoamilasa AMG2 y GACD respectivamente; en la Figura 24 se evidencia que la isoenzima AMG2 es de un peso molecular levemente

mayor que el de la GACD, lo cual está de acuerdo con la teoría que establece que estas dos isoenzimas solo se diferencian porque la segunda solo presenta una parte del puente glicosilado. Por otra parte, debido a que en la electroforesis PAGE la resolución de las bandas es baja y las proteínas descienden por influencia de su peso molecular y de la carga que presentan en su forma nativa, las isoenzimas AMG2 y GACD que poseen unas diferencias de peso y de estructura muy pequeñas, se solapan en la banda gruesa obtenida en la electroforesis nativa.

La banda representada como B, se debe a una impureza que contiene la enzima disponible comercialmente, aunque su peso molecular es alto y se podría especular que sea una de las isoenzimas de la glucoamilasa. Sin embargo, esta hipótesis se descartó debido a que esta banda no desaparece con la misma uniformidad con que lo hacen las bandas A, C y D, sugiriendo que la concentración de sulfato no causa el mismo efecto de precipitación que tiene sobre la glucoamilasa.

Las bandas E, F y G, también corresponden a contaminaciones y no a productos de degradación de la enzima, ya que éstas se aprecian tanto en la electroforesis en condiciones denaturantes, como en la nativa. Además, la suma de los pesos de las bandas E, F no corresponden ni se aproximan al peso de ninguna de las bandas anteriores a ellas, por otra parte la banda G, se ha encontrado muy bien caracterizada en otros estudios [46], en los que se ha encontrado que fragmentos moleculares de peso aproximado a los 6KDa son impurezas responsables de la tonalidad amarilla que presenta la glucoamilasa.

Finalmente, se pudo observar mediante electroforesis SDS/PAGE el proceso de entrecruzamiento de agregados de glucoamilasa, ya que en el gel se exhibe la desaparición de la proteína del sobrenadante que progresivamente se va entrecruzando y se va quedando en la fase insoluble donde se encuentran todas las partículas de CLEA formadas.

CONCLUSIONES

- Los agregados entrecruzados de glucoamilasa de *Streptomyces rubiginosus* mostraron un descenso significativo en su actividad catalítica y estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble.
- La concentración de sulfato de amonio y de enzima ejercieron una influencia significativa en la elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa, mientras que la concentración del solvente 2-butanol y de glutaraldehído no tuvieron un efecto significativo en el proceso de entrecruzamiento de los agregados de la enzima.
- Mediante la ejecución del diseño experimental, se obtuvieron los valores óptimos para el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de glucoamilasa, que permitieron maximizar la actividad catalítica de la enzima inmovilizada
- La estimación de los parámetros cinéticos constante de Michaelis y velocidad máxima, tanto para la enzima soluble como para la entrecruzada, reflejaron una marcada disminución de la velocidad máxima de catálisis y la constante de afinidad para la glucoamilasa inmovilizada respecto a la enzima soluble.
- El pH que se determinó como el más adecuado para efectuar la hidrólisis del almidón por parte de la glucoamilasa, no se vio alterado por efectos del entrecruzamiento; sin embargo se observó que la enzima soluble, puede ejercer la catálisis a valores de pH más bajos que su contraparte inmovilizada.
- Se observó una pérdida total de la expresión de la actividad catalítica de la glucoamilasa, bajo todas las condiciones ensayadas para llevar a cabo la inmovilización de la enzima sobre el soporte activado con grupos epóxido Eupergit C.

- Debido a la pérdida total de la expresión de la actividad catalítica de la amiloglucosidasa, no fue posible evaluar el efecto de la temperatura, el pH, y la concentración de almidón para la enzima inmovilizada sobre el soporte.
- Se determinó que la inmovilización de la glucoamilasa sobre el soporte Eupergit C, se favorece por la influencia de fuerzas iónicas altas y valores de pH neutros.
- Mediante el método de la glucosa oxidasa, se determinó que tanto para la enzima soluble como para la entrecruzada, se produjeron mayores cantidades de glucosa a partir de las dextrinas obtenidas en el proceso de licuefacción del almidón crudo por parte de la alfa-amilasa, que partiendo del almidón soluble disponible comercialmente.
- Se determinó mediante la técnica de electroforesis SDS/PAGE Y PAGE, que la glucoamilasa proveniente de la cepa *Streptomyces Rubiginosus* presenta 3 isoformas, mediante las cuales puede hidrolizar almidón crudo y soluble, lo cual constituye una característica de gran interés a nivel industrial.
- El proceso de entrecruzamiento de los agregados de glucoamilasa se pudo evidenciar mediante la técnica de electroforesis SDS/PAGE en donde se observó la progresiva desaparición de la proteína, a medida que avanzaba el tiempo de inmovilización.

RECOMENDACIONES

- Desarrollar estrategias de insolubilización para la glucoamilasa, que le permitan mejorar sus propiedades catalíticas, su estabilidad frente a los efectos desnaturalizantes de las enzimas y que no comprometan su sitio activo, como por ejemplo la inmovilización de la enzima mediante su porción glicosilada o mediante interacciones de tipo no covalente.
- Utilizar las dextrinas provenientes de la licuefacción de el almidón crudo por parte de la alfa-amilasa como sustrato, en vez de el almidón soluble disponible comercialmente ya que se demostró que se obtienen mayores cantidades de glucosa a partir de las primeras.

BIBLIOGRAFIA

- 1 SORIMACHI Kay et al, Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to b-cyclodextrin, *Structure* 1997,5,647–661.
- 2 NOROUZIAN Dariush et al, Fungal glucoamylases, *Biotechnology Advances* 2006, 24, 80– 85.
- 3 ALESHIN Alexander et al, Crystallographic Complexes of Glucoamylase with Maltooligosaccharide Analogs: Relationship of Stereochemical Distortions at the Nonreducing End to the Catalytic Mechanism, *Biochemistry* 1996, 35, 8319-8328.
- 4 TANRISEVEN Aziz et al,. A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin, *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30, 406–409.
- 5 D'SOUZA S.F., Kubal B.S,. A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase, *Biochemical and Biophysical methods*, 2002, 51, 151–159.
- 6 TORRES Rodrigo et al,. Reversible Immobilization of Glucoamylase by Ionic Adsorption on Sepabeads Coated with Polyethyleneimine, *Biotechnology*, 2004, 20, 1297-1300.
- 7 ABRAHAM Tholath Emilia et al, Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformations, *Carbohydrate Research*, 2004, 339, 1099–1104.
- 8 PARK Daewon et al, Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis, *Process Biochemistry* 2005, 40, 53–61.
- 9 HAMERSKA-DUDRA Agnieszka et al, Immobilization of glucoamylase and trypsin on crosslinked thermosensitive carriers, *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 41,197–204.
- 10 MILOSAVIĆ N et al, Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA), *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 40, 1422–1426.

- 11 TANRISEVEN Aziz, Olcer Zehra, A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin, *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 39, 430–434.
- 12 WILSON Lorena et al, Cross-Linked Aggregates of Multimeric Enzymes: A Simple and Efficient Methodology To Stabilize Their Quaternary Structure, *Biomacromolecules* 2004, 5, 814-817.
- 13 Yu H.W et al, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles Application to *Candida rugosa* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2006, 43, 124–127.
- 14 SANGEETHA K, Abraham T Emilia, Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of Subtilisin for controlled release applications, *International Journal of Biological Macromolecules* 2008, 48, 314–319.
- 15 WILSON Lorena et al, Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase, *Process Biochemistry* 2009, 44, 322–326.
- 16 MATEO Cesar et al, Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage, *Biomacromolecules* 2000, 1, 739-745.
- 17 KNEZEVIC Zorica et al, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachmet, *Biochemical Engineering Journal* 2006, 30, 269–278.
- 18 MISLOVICOVA D et al, Immobilized glucose oxidase on different supports for biotransformation removal of glucose from oligosaccharide mixtures, *Process Biochemistry*, 2007, 42, 704–709.
- 19 LEHNINGER Albert L, *Bioquímica Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*, Ediciones Omega S.A.
- 20 COPELAND A Robert, *A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, second edition, ed Wiley- VCH, 2000.
- 21 BUCKOW R et al, Two Fractional Model For Evaluating the Activity of Glucoamylase From *Aspergillus niger* Under Combined Pressure and Temperature Conditions, *Food and Bioproducts Processing*, 2005, 8, 220–228.
- 22 LATORRE-GARCÍA Lorena et al, Improving the amylolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain, *Journal of Biotechnology*, 2005, 118, 167–176.

- 23** CHRISTENSEN Trine et al, Thermodynamics of Reversible and Irreversible Unfolding and Domain Interactions of Glucoamylase from *Aspergillus niger* Studied by Differential Scanning and Isothermal Titration Calorimetry, *Biochemistry*, 1999, 19, 6300–6310.
- 24** NATARAJAN Sateesh, Sierks R Michael, Identification of Enzyme-Substrate and Enzyme-Product Complexes in the Catalytic Mechanism of Glucoamylase from *Aspergillus awamori*, *Biochemistry* 1996, 35, 15269-15279.
- 25** BUCHHOLZ K, Seibel J, Industrial carbohydrate biotransformations, *Carbohydrate Research*, 2008, 343,1966–1979.
- 26** HORTON Robert, *Bioquímica*, ed Prentice Hall, 1993, capítulos 5, 6.
- 27** ILLANES Andrés, *Biología de Enzimas*, Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.
- 28** TREVAN Michael, *Immobilized Enzymes An Introduction and Applications in Biotechnology*, Wiley & Sons, 1980.
- 29** GUIBAN Jose M, *Immobilization of Enzymes and Cells*, second edition, Human Press, 2006.
- 30** BARBOSA Luís Oveimar, *Elaboración de Agregados Entrecruzados de Peroxidasa de Palma Real (*Roystonea regia*)*, Universidad Industrial de Santander, 2006.
- 31** IYER Padma V, Ananthanarayan Laxmi, Enzyme stability and stabilization Aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochemistry*, 2008, (43), 1019–1032.
- 32** YÁBAR Carlos Augusto, *Manual de Procedimientos de Electroforesis Para Proteínas y ADN*, serie de normas técnicas N° 38, Lima, 2003.
- 33** GARCÍA Hilda Marilyn, *Electroforesis en Geles de Poliacrilamida: Fundamentos, Actualidad e Importancia*, Universidad DIAG, 2000,1(2):31-41.
- 34** BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976, 72, 248-254.
- 35** MILLER, G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 3, 1959.
- 36** SANCHEZ Alberto, *Obtención de Jarabes de Glucosa Por Hidrolisis Enzimática del Almidón Extraído de Tres Variedades de Yuca (Amarga, Armenia y*

Chile). Cultivadas en la Provincia Guanentá (Santander), Universidad Industrial de Santander, 2002.

37 YOON Seung-Heon, Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37, 556–562.

38 SHELDON, R.; VAN RANTWIJK, F.; SCHOEVAART, R. “Preparation, Optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)”. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, (87:6).

39 MISLOVICOVA D. et al, Immobilized glucose oxidase on different supports for biotransformation removal of glucose from oligosaccharide mixtures, *Process Biochemistry*, 2007 42,704–709.

40 PCHELINTSEV N.A, Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 56, 202–207.

41 AYTAR Burcu Selin, Bakir Ufuk, Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates, *Process Biochemistry*, 2008, 43, 125–131.

42 SHAH Shweta et al, Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Analytical Biochemistry* 2006, 351, 207–213.

43 FAZARY Ahmed et al, Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase, *International Journal of Biological Macromolecules* 2009, 44, 240–248.

44 LEADLAY P.F, An Introduction to enzyme chemistry, The Chemical Society, London 1978, 1-40, 67-74

45 BAI Yong-Xiao et al, Study on synthesis of a hydrophilic bead carrier containing epoxy groups and its properties for glucoamylase immobilization, *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39, 540–547

46 MINAMI N.M. et al, Characterization of clarified medium from submerge and semisolid cultivation of *Aspergillus awamori* NRRL3112 by size-exclusion chromatography, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Sao Paulo, 1999, (16) N^o 2.

ANEXO A

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

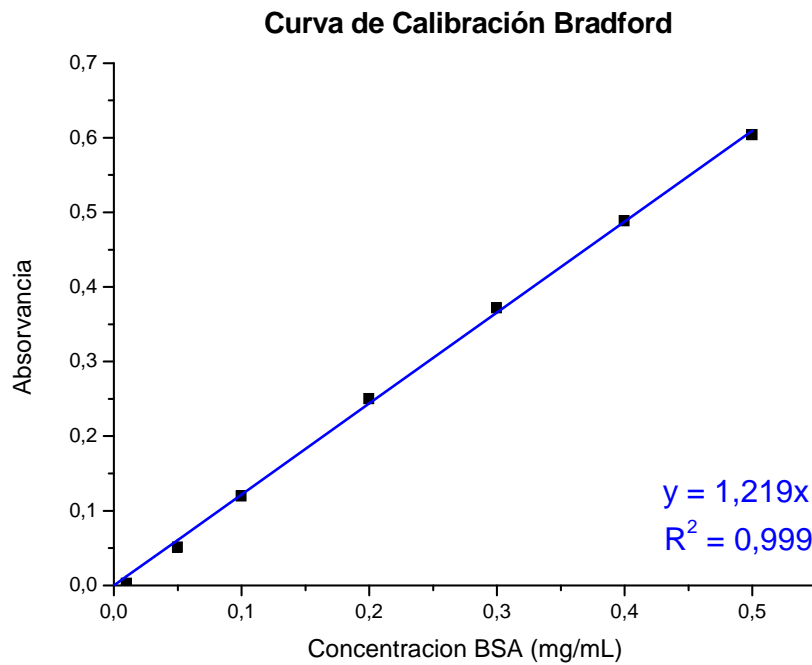


Figura A 1 Curva de calibración Bradford

La concentración de proteína se calcula interpolando la absorbancia obtenida en cada ensayo, en la ecuación derivada de la curva de calibración para el método del Bradford.

$$[proteína] = \frac{absorbancia}{1,219} * fd$$

fd: factor de dilución.

ANEXO B

Curva de calibración obtenida para el método del DNS para la determinación de azúcares reductores.

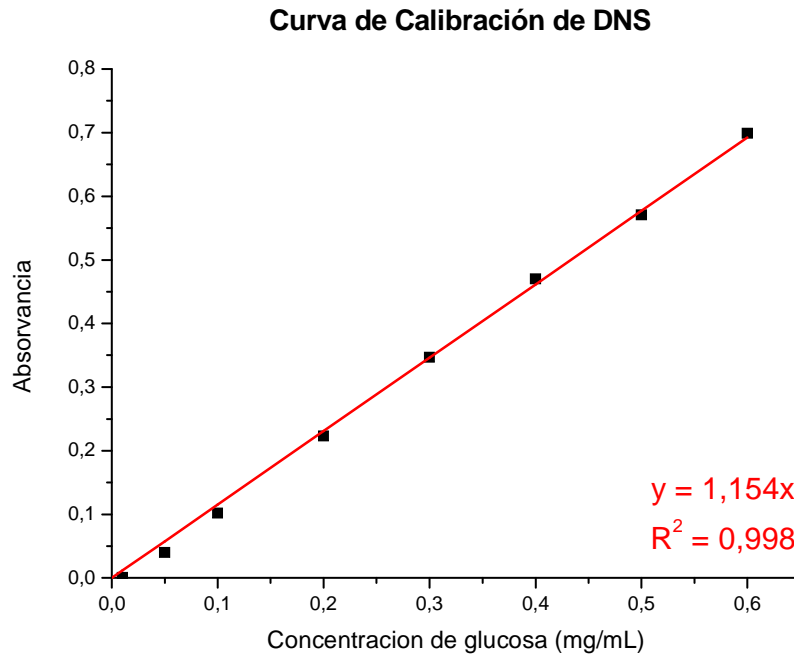


Figura B 1 Curva de calibración de DNS

El cálculo de la actividad, se realizó utilizando la pendiente de la curva de calibración para el método del DNS, junto con las pendientes obtenidas para cada ensayo mediante la siguiente expresión.

$$\text{Actividad específica} = \frac{m}{1,154} * \frac{1 * 10^6}{180 * 10^3} * \frac{V_m}{V_e} * fd$$

m : pendiente obtenida en cada ensayo (min^{-1})

V_m : volumen de ensayo (ml)

V_e : volumen de enzima (ml)

fd : factor de dilución

1,154 es la pendiente obtenida para la curva de calibración del método del DNS y tiene unidades de $(\text{mg/ml})^{-1}$.

ANEXO C

El cálculo de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se realizó mediante el modelo de Lineweaver-Burk.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[s]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Esta ecuación presenta la forma de una recta, en donde K_m/V_{max} es la pendiente de la recta y $1/V_{max}$ es el intercepto con el eje y.

V_0 : es la velocidad inicial de la reacción (U/mg)

K_m : es la constante de Michaelis (mg/ml)

V_{max} : es la velocidad máxima de catálisis (U/mg)

S : es la concentración de sustrato (mg/ml)

De la recta obtenida al representar gráficamente el inverso de la concentración de almidón vs el inverso de la actividad específica de la enzima, se obtienen los valores para la pendiente y el intercepto con el eje y, despejando de la ecuación se obtienen los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .

ANEXO D

Calculo de la concentración de glucosa mediante el Kit de la glucosa Oxidasa.

La concentración de glucosa se calcula mediante la siguiente expresión

$$C_{muestra} = \left[\frac{A_{muestra}}{A_{patron}} * 100g / dL \right] * fd$$

A muestra: absorbancia de la muestra

A patrón: absorbancia del patrón

100mg/dL : concentración del patrón

Fd : factor de dilución.

