

HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN DE YUCA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE
PREPARACIONES SOLUBLES E INSOLUBILIZADAS DE ALFA-AMILASA
(Aspergillus niger)

ASTRID ANDREA PEÑA PIZA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2009

HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN DE YUCA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE
PREPARACIONES SOLUBLES E INSOLUBILIZADAS DE ALFA-AMILASA
(*Aspergillus niger*)

ASTRID ANDREA PEÑA PIZA

Trabajo de grado presentado para optar al título de Química

Director
RODRIGO TORRES SAEZ PhD

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2009

AGRADECIMIENTOS

A mi Diosito amado por su gran amor y apoyo en todos los momentos de mi vida, porque gracias a su presencia he podido superar muchas situaciones y seguir adelante.

A mis padres y hermanos que han estado toda mi vida brindándome los mejores momentos, el apoyo más incondicional y el amor tan especial que cada uno ha sabido ofrecerme a su manera.

A la mami hermosa que Dios me regalo, el angelito más lindo que tengo todos los días a mi lado, gracias por ser esa bella mamá y por estar siempre pendiente, gozando con mis alegrías y llorando por mis tristezas pero siempre juntas.

Al profesor Rodrigo Torres por brindarme la oportunidad de trabajar en esta investigación, por sus conocimientos y la gran paciencia que tuvo para permitir que yo desarrollara este proyecto.

Al profesor Daniel Molina por estar siempre pendiente de mi trabajo y por sus consejos para realizar un proyecto más completo.

A la profesora Claudia Ortiz por su apoyo y brindarme sus mejores opiniones sobre mi trabajo.

A las mosqueteras que han estado conmigo desde que empezamos la U; a terin por su gran colaboración en el desarrollo de este proyecto y por su incondicional amistad en todos estos años, a didi que ha estado siempre ahí para brindarme una palabra de apoyo en los momentos difíciles y una gran sonrisa cuando todo ha salido bien, a sese por su gran amistad y cariño que siempre me ha brindado.

A maguito por su colaboración en toda nuestra universidad y por ser ese amiguito que siempre ha estado pendiente de que todo nos salga bien.

A mis otras amiguitas, sandris, adri, vivi, lauris, gloria, carito, maguita, leidy, erika, que me han brindado momentos muy agradables, por sus buenos deseos y compañía, gracias.

A Ronald por su gran amor y por hacer que todos los días tenga motivos y cuentos para reírme; por ser la personita que abrió su corazoncito para mí y me ha dado los mejores momentos. Gracias por el apoyo en mis cositas de la U; por ser mi mejor amigo y mi gran amor.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1. MARCO DE REFERENCIA.....	19
2. MARCO TEÓRICO.....	25
2.1 ALMIDÓN.....	25
2.1.1 Historia.....	25
2.1.2 Origen.....	25
2.1.3 Estructura Química.....	26
2.1.4 Gelatinización.....	27
2.1.5 Retrogradación.....	28
2.2 YUCA.....	30
2.2.1 Yuca Amarga.....	32
2.2.2 Hidrólisis parcial del almidón de yuca.....	33
2.3 Hidrólisis enzimática.....	34
2.4 Dextrinas.....	35
2.4.1 Clasificación.....	35
2.5 Hongos.....	36
2.5.1 <i>Aspergillus niger</i>	36
2.5.2 Clasificación Taxonómica.....	37
2.6 Biocatalizadores.....	37
2.6.1 Historia.....	37
2.6.2 Enzimas.....	38
2.6.3 Estructura.....	39
2.6.4 Propiedades de las enzimas derivadas de su estructura proteica.....	39
2.7 Alfa-amilasa (<i>Aspergillus niger</i>).....	40
2.7.1 Organización del dominio.....	41

2.7.2	Mecanismo de la alfa-amilasa.....	41
2.8	Factores que afectan la catálisis de la alfa-amilasa.....	43
2.9	Inmovilización enzimática.....	47
2.9.1	Clasificación de los métodos de inmovilización.....	48
2.9.2	Elaboración de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).....	49
2.9.3	Entrecruzamiento de enzima (CLE).....	51
2.10	Generalidades del glutaraldehído.....	52
2.11	Agentes precipitantes.....	53
3.	METODOLOGÍA.....	56
3.1	Análisis de la concentración de proteína.....	56
3.2	Determinación de la concentración del cofactor (Ca^{+2}).....	56
3.3	Determinación de la actividad enzimática de la alfa-amilasa soluble.....	57
3.4	Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).....	58
3.4.1	Procedimiento para la elaboración de los CLEAs.....	59
3.5	Análisis estadístico de los resultados para los CLEAs.....	62
3.6	Elaboración de entrecruzados enzimáticos CLEs.....	62
3.7	Análisis estadístico de los resultados para los CLEs.....	63
3.8	Determinación de los factores que afectan la actividad y la estabilidad de la alfa-amilasa.....	63
3.8.1	pH.....	64
3.8.2	Temperatura.....	64
3.8.3	Determinación de los parámetros cinéticos K_M y $V_{\text{máx}}$	64
3.8.4	Estabilidad térmica.....	64
3.9	Comparación de la actividad catalítica de la enzima soluble y la entrecruzada (CLE).....	65
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66

4.1	Influencia del cofactor Ca^{+2} en la actividad de la enzima.....	66
4.2	Agregados entrecruzados de alfa-amilasa empleando propanol como agente precipitante.....	67
4.3	Entrecruzamiento de la alfa-amilasa empleando glutaraldehído.....	75
4.4	Factores que afectan la actividad catalítica y la estabilidad de la alfa-amilasa soluble e insolubilizada por medio de CLEAs y CLEs.....	81
4.4.1	Efecto del pH.....	81
4.4.2	Efecto de la temperatura.....	85
4.4.3	Determinación de los parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para la enzima soluble e inmovilizada.....	87
4.4.4	Estabilidad térmica para la alfa-amilasa soluble e inmovilizada.....	92
4.4.5	Comparación de la actividad catalítica de la enzima soluble y el CLE.....	95
	CONCLUSIONES.....	97
	RECOMEDACIONES.....	100
	ANEXO 1.....	101
	ANEXO 2.....	102
	ANEXO 3.....	103
	ANEXO 4.....	104
	ANEXO 5.....	105
	ANEXO 6.....	106
	BIBLIOGRAFÍA.....	107

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición típica de una raíz tuberculosa de yuca ^[12]	52
Tabla 2: Parámetros constantes para la elaboración de los CLEAs de alfa-amilasa.....	58
Tabla 3: Matriz del diseño experimental.....	60
Tabla 4: Variables seleccionadas para el proceso de elaboración de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de alfa-amilasa, empleando propanol como agente precipitante.....	59
Tabla 5: Variables seleccionadas en el proceso de elaboración de CLEs.....	63
Tabla 6: Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la alfa-amilasa en presencia y ausencia del ión Ca ²⁺	66
Tabla 7: Resultado del diseño experimental, usando propanol como agente precipitante.....	68
Tabla 8: Análisis de varianza para la actividad específica. Estimación de los efectos significativos en la elaboración de agregados entrecruzados de alfa-amilasa.....	72
Tabla 9: Valores óptimos para el proceso de elaboración agregados entrecruzados de alfa-amilasa.....	74
Tabla 10: Resultados del diseño experimental para el entrecruzamiento de enzima CLEs. Actividad de la enzima soluble a pH 4.0 es de 106U/mg.....	77

Tabla 11: Análisis de varianza para la actividad específica. Estimación de los efectos significativos en el entrecruzamiento de enzima.....	78
Tabla 12: Valores óptimos para el proceso de entrecruzamiento de la alfa-amilasa.....	80
Tabla 13: Valores de actividad específica para la alfa-amilasa bajo diferentes condiciones de pH.....	82
Tabla 14: Constantes de inactivación de la enzima soluble y entrecruzada CLE por efecto del pH.....	85
Tabla 15: Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima soluble e inmovilizada.....	86
Tabla 16: Valores de actividad específica para la enzima soluble e inmovilizada variando la concentración de almidón.....	88
Tabla 17: Parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para la enzima soluble e inmovilizada.....	89
Tabla 18: Constantes de inactivación de la enzima soluble y entrecruzada (CLE).....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del almidón: a) Segmento lineal de la amilosa b) Segmento cadena ramificada de la amilopectina.....	27
Figura 2. Mecanismo de doble desplazamiento seguido por la formación de un intermediario covalente y su liberación por el desplazamiento nucleofílico por una molécula de agua.....	43
Figura 3. Etapas en la elaboración de agregados entrecruzados de enzima ^[36]	50
Figura 4. Alfa-amilasa. Tomando de la Protein Data Bank. Software de visualización UCSF CHIMERA. Código de acceso 2aaa.pdb.....	51
Figura 5. Posibles formas del glutaraldehído en solución acuosa.....	52
Figura 6. Reacciones del glutaraldehído en solución acuosa.....	53
Figura 7. Efecto desnaturalizante de los solventes orgánicos provocados por un cambio en el estado de hidratación de las enzimas.....	54
Figura 8. Cuantificación de azúcares reductores por el método colorimétrico del DNS.....	57
Figura 9. Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor.....	58
Figura 10. Proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de alfa-amilasa ^[3, 36]	61
Figura 11. Influencia del ión Ca ⁺² en la actividad de la alfa-amilasa de <i>A.niger</i> soluble.....	67

Figura 12. Diagrama de Pareto para cada una de las variables evaluadas en el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de enzima.....	71
Figura 13. Efectos principales para la actividad de la enzima.....	73
Figura 14. Diagrama de Pareto para cada variable evaluada en el proceso de entrecruzamiento proteico.....	79
Figura 15. Efectos principales para la actividad de la enzima.....	80
Figura 16. Efecto del pH sobre la actividad de la alfa-amilasa de <i>A.niger</i> soluble e inmovilizada por medio de las técnicas CLEA y CLE.....	83
Figura 17. Efecto del pH sobre la estabilidad de la alfa-amilasa de <i>A.niger</i> soluble y entrecruzada.....	84
Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las formas soluble e inmovilizada (CLEA y CLE) de la alfa-amilasa de <i>A.niger</i>	86
Figura 19. Representación Lineaweaver-Burk para la alfa-amilasa de <i>A.niger</i> en sus formas soluble, CLEA y CLE respectivamente	91
Figura 20. Comparación de la cinética de inactivación para cada una de las temperaturas evaluadas tanto para la enzima soluble como entrecruzada.....	94
Figura 21. Comparación entre la capacidad hidrolítica de la enzima soluble y entrecruzada (CLE).....	95

Figura A 1. Curva de calibración para la determinación de proteínas utilizando el método de Bradford.....	101
Figura A 2. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores empleando el método del DNS a pH 4.7.....	102
Figura A 3. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores empleando el método del DNS a pH 4.0	103
Figura A 6. Micrografía del gránulo de almidón después de la hidrólisis vía múltiples ataques ^[52]	106

RESUMEN

TITULO:
HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN DE YUCA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE PREPARACIONES SOLUBLES E INSOLUBILIZADAS DE ALFA-AMILASA (*Aspergillus niger*) *

PEÑA PIZA ASTRID ANDREA**

Palabras claves: alfa-amilasa, almidón, inmovilización enzimática, agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), entrecruzamiento proteico (CLEs).

La alfa amilasa es una enzima clave en el proceso de licuefacción del almidón a nivel industrial para la producción de jarabe de glucosa. La glucosa producida tiene múltiples aplicaciones en alimentos, y últimamente, con el auge de los biocombustibles, se ha enfatizado su uso como sustrato de fermentación microbiana para obtener finalmente el bioetanol.

Se comparó el efecto en la hidrólisis enzimática del almidón de yuca por la enzima alfa-amilasa de *Aspergillus niger* en forma soluble e insolubilizada como biocatalizador para el proceso. Con este propósito, se optimizaron las condiciones de pH y temperatura tanto para la actividad como estabilidad térmica de la enzima; así como el efecto del cofactor Ca^{2+} sobre la actividad de alfa-amilasa. Se determinaron las constantes de inactivación frente a la temperatura y los parámetros cinéticos K_M y $V_{\text{máx}}$ del biocatalizador.

La insolubilización consistió en la síntesis de agregados entrecruzados de alfa amilasa (CLEA) en el que se utilizó propanol como agente precipitante y glutaraldehído como agente entrecruzante con el fin de brindar rigidez a la enzima y poderla separar fácilmente del medio de reacción. La otra técnica de insolubilización fue el entrecruzamiento de proteína (CLE) en el que se utilizó glutaraldehído como agente entrecruzante.

Se determinaron los principales factores que afectaron la actividad catalítica permitiendo comparar la enzima soluble e insolubilizada estableciendo que el proceso de insolubilización utilizando CLEAs afecta de forma desfavorable la catálisis y la estabilidad enzimática frente a la hidrólisis del almidón de yuca; mientras que con los CLEs se aumentó en estabilidad cerca de un 25%.

*Proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITLE:

CASSAVA STARCH HYDROLYSIS BY SOLUBLE AND INSOLUBILIZADAS PREPARATIONS OF ALPHA-AMYLASE (*Aspergillus niger*) *

PEÑA PIZA ASTRID ANDREA**

Keywords: alpha amylase, starch, enzyme immobilization, cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), cross-linked enzyme (CLEs).

The alpha amylase is a key enzyme in the process of liquefaction of starch at the industrial level to produce glucose syrup. The glucose produced has many applications in food, and lately, with the rise of biofuels, has emphasized its use as substrate for microbial fermentation to finally obtain bioethanol

In this study the effect of the enzymatic starch hydrolysis by alpha-amylase enzyme from *Aspergillus niger* in its soluble and insoluble form as the biocatalyst for the process was compare. With this purpose, pH and temperature conditions were optimized; thermal stability and Ca^{2+} cofactor effect on the alpha-amylase activity was determined. Besides, it was established the thermal inactivation constants and the kinetic parameters K_M and $V_{\text{máx}}$ of the alpha-amylase.

Furthermore, the insolubilization of the enzyme was carry out by the synthesis of cross linked enzyme aggregates (CLEA) in order to provide rigidity to the alpha-amylase and easy separability from their reaction media; during this procedure propanol was used as precipitant agent and glutaraldehyde was used as the cross linker. The other technique of insolubilization was cross linked enzyme (CLE), glutaraldehyde was used as the cross linker.

The main factors that affect the catalytic activity were identified, letting compare the soluble and insoluble enzyme, establishing that the process of insolubilisation using CLEAs adversely affects the stability and enzymatic catalysis towards hydrolysis of starch, while the CLEs was stability increased about 25 %.

*Degree of Project

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

INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas en procesos de bio-transformación de moléculas orgánicas es un área de gran interés industrial, ya que éstas pueden catalizar diferentes procesos en condiciones ambientales suaves, y debido esencialmente a sus excelentes propiedades funcionales de actividad, selectividad y especificidad.

Debido a la inminente escasez del petróleo, la nueva tendencia, tanto en el mundo como en Colombia, es la de aumentar la recuperación de los hidrocarburos en los campos maduros y recompensar el agotamiento en los yacimientos nuevos. Es por ello, que se ha generado un gran interés en la producción de energías alternativas, especialmente biocombustibles (por ej. etanol), a partir de materias primas de recursos renovables, tales como lignocelulosa, almidón, azúcar de caña, entre otros.

Uno de los biocombustibles de mayor interés es el bioetanol. Las tecnologías de producción de bioetanol a partir de sacarosa o almidón (por ejemplo, de yuca amarga) hacen referencia a procesos de fermentación e hidrólisis de dichas materias primas constituyéndose así en una buena alternativa para la producción de los llamados biocombustibles de segunda generación.

Uno de los sustratos para la producción de biocombustibles es el almidón, debido a que es una fuente importante de glucosa fermentable. No obstante, es necesario transformar el almidón en glucosa para facilitar su fermentación. Este proceso se lleva cabo mediante el uso de enzimas que hidrolizan el almidón. El proceso de hidrólisis de almidón se genera primero por la alfa amilasa, la cual hidroliza el almidón en dextrinas en un proceso denominado licuefacción, seguido de la glucoamilasa que rompe las dextrinas en un proceso denominado sacarificación, generándose glucosa como sustrato para la fermentación microbiana y obtener de esta forma bioetanol.

Sin embargo, la aplicación de estos biocatalizadores en procesos químicos a nivel industrial es limitada, generalmente por factores tales como la elevada solubilidad que presentan en medios acuosos, lo que dificulta su recuperación del medio de reacción, y la disminución de su estabilidad y actividad catalítica en condiciones drásticas de reacción.

Es por ello que la aplicación de enzimas a gran escala requiere de estrategias tecnológicas que permitan el mejoramiento de las propiedades enzimáticas, lo cual se puede lograr a través de técnicas de biología molecular, de inmovilización y post-inmovilización de enzimas.

Desde los años 70s se han estudiado las técnicas de inmovilización para la estabilización de enzimas industriales, debido a que han permitido superar algunas desventajas de las enzimas asociadas a sus orígenes fisiológicos, conllevando por ende grandes beneficios en los procesos de bio-transformación ^[1].

Existen varios métodos de inmovilización de enzimas, entre los cuales se encuentran la inmovilización en soportes, inmovilización por retención física y entrecruzamiento intermolecular.

El entrecruzamiento consiste en la unión intermolecular de las enzimas con reactivos bi-funcionales a través de residuos de lisina (Lys) presentes en la estructura proteica, confiriéndole a la enzima alta rigidez, lo que garantiza un aumento significativo de su actividad y estabilidad catalítica. Además, se posibilita su separación del medio de reacción y reutilización ^[2].

En este trabajo de investigación, se inmovilizó la alfa amilasa mediante la formación de agregados enzimáticos entrecruzados y entrecruzamiento proteico, con el objeto de mejorar las propiedades catalíticas de estabilidad en las condiciones de reacción industrial de hidrólisis de almidón.

1. MARCO DE ANTECEDENTES

El uso de enzimas con propósitos tecnológicos presume hacer de estos catalizadores fisiológicos catalizadores de proceso, capaces de transformar materias primas en productos de valor agregado.

La alfa-amilasa ha sido estudiada ampliamente durante los últimos años debido a su gran aplicabilidad en procesos de licuefacción del almidón.

CHAPARRO y TORRES, 2009, desarrollaron 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 llevó 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 (Eupergit C); estableciéndose que el proceso de insolubilización afectó fuertemente la catálisis y estabilidad de la enzima ^[3].

FLOREZ y TORRES, en el 2008, estudiaron la oligomerización de β -fructofuranosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose las diferentes formas oligoméricas de la enzima por medio de entrecruzamiento intermolecular con glutaraldehído. Además, se evaluó su estabilidad frente a los efectos de solventes como el etanol, la acetona y el tetrahidrofurano; y la estabilidad térmica de dichos agregados, siendo comparada con las obtenidas para la enzima soluble. Además, se realizó el entrecruzamiento intermolecular de agregados enzimáticos (CLEAs) y de enzima solubilizada (CLEs); obteniéndose un aumento de la actividad específica de los CLEs. No obstante, disminuyó significativamente la estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble ^[4].

LANDAZÁBAL, CARREÑO y MOLINA, en el 2004, evaluaron la hidrólisis del almidón para la obtención de etanol. Este proceso se llevó a cabo con el hongo *Aspergillus niger*, ya que es uno de los mejores productores de amilasas. En la etapa de fermentación, se empleó la bacteria gram negativa *Zymomonas mobilis*. Para la hidrólisis se determinaron las variables que influyen en el porcentaje de conversión de almidón de yuca a glucosa, utilizando un diseño experimental 3^3 cuyos factores fueron la concentración de almidón, temperatura y pH. En la fermentación, se determinaron las variables que influyen en el porcentaje de rendimiento de etanol, utilizando el diseño experimental 3^3 cuyas variables fueron concentración de glucosa, temperatura y pH ^[5].

Por otro lado, BARBOSA y TORRES, en el 2006, estudiaron la inmovilización de proteínas de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), a través del entrecruzamiento proteico llevado a cabo con glutaraldehído, para la formación de agregados entrecruzados de enzimas (CLEA), evaluando el efecto causado por el etanol, acetona y polietilenglicol (PEG) como agentes precipitantes. Los agregados entrecruzados de la peroxidasa de la palma real, mostraron un incremento significativo en su actividad específica y estabilidad térmica en comparación con la enzima soluble. Determinaron que para una concentración de etanol del 78% (v/v) y de glutaraldehído del 1% (p/v), los agregados entrecruzados presentaban una actividad específica de 2011 U/mg y una estabilidad térmica 40 veces mayor que la enzima soluble. No obstante, los resultados mostraron que la baja concentración de proteína en la peroxidasa extraída de la palma real dificultó el proceso de entrecruzamiento debido al bajo número de lisinas presentes en esta enzima, los cuales son los que intervienen directamente en la reacción de entrecruzamiento con el glutaraldehído ^[34].

RUEDA y TORRES, realizaron en el 2007 la inmovilización de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) por entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAS), adicionando albúmina de suero bovino (BSA) para proveer una mayor cantidad de residuos lisínicos y mejorar el proceso de entrecruzamiento. Para ello

evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de BSA, etanol y glutaraldehído como agente entrecruzante. En el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de la peroxidasa se estableció que la concentración de BSA ejerció una influencia significativa (estadístico $P < 0.05$) sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados formados. De forma concluyente, los CLEAs elaborados usando como fuente de proteína BSA, aumentaron la estabilidad térmica y la estabilidad en solventes orgánicos de la peroxidasa de palma real ^[48].

CARRASCAL, DAZA y MOLINA, en el 2005, determinaron las variables más relevantes en la obtención enzimática de dextrinas de baja retrogradación a partir de almidón de yuca, usando como catalizador la enzima alfa-amilasa. En este trabajo, se evaluó la influencia de las variables [Sustrato], [E] y (t) sobre la producción de dextrinas mediante un diseño factorial 2^3 (tamizado) con dos réplicas, estableciendo la [s] y el (t) como los factores más influyentes en la producción de dextrinas a partir de almidón de yuca industrial ^[13].

Po otro lado, MERA y su grupo de investigación evaluaron la producción de glucosa a partir de almidón utilizando la hidrólisis enzimática. Para ello probaron muchas variables tales como enzimas obtenidas a partir de *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*, a diferentes temperaturas, pHs y concentraciones de sustrato. Además, se estandarizó las condiciones de proceso, permitiendo que sirvieran como parámetro para el diseño tanto del proceso como de los equipos necesarios para industrializar la producción de la glucosa, utilizando como sustrato el almidón de yuca producido en el Cauca ^[47].

A su vez, van der Maarel y colaboradores trabajaron sobre las propiedades y características de las enzimas que pertenecen a la familia de las α -amilasas, determinando la influencia de éstas en la conversión del almidón. Además, identificaron el mecanismo catalítico para las amilasas y finalmente la utilización a nivel industrial ^[11].

KHOSRO y colaboradores, realizaron un estudio comparativo para evaluar el efecto del ión Ca^{+2} en las formas nativa y químicamente modificada de α -amilasas mesofílicas y termofílicas. Se realizaron estudios de dicroísmo circular (CD) y termoinactivación irreversible en presencia y ausencia del ión Ca^{+2} . Con los resultados de los ensayos de CD, se pudo concluir que la modificación en la estructura terciaria de estas enzimas genera estabilización de la proteína y mejora el potencial catalítico [25].

SALAS y colaboradores estudiaron la producción de enzimas amilasas por cepas de *Aspergillus niger* en aguas de lavado de industrias cerveceras para determinar la capacidad de producción, de proteasas, amilasas, y observar como es la depuración del medio donde crecen. Se analizaron parámetros de producción de enzima, pH, temperatura y concentración de iones. Los resultados indicaron que los niveles de amilasa y proteasa obtenidos, eran marcadamente dependientes de la concentración inicial de almidón en el medio de cultivo [6].

En el 2004, Schoevaart, Sheldon y col, demostraron la gran aplicabilidad del entrecruzamiento de agregados enzimáticos para la efectiva inmovilización de enzimas. Elaboraron agregados entrecruzados de 12 enzimas diferentes entre las que se encuentran la galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, lactasa, y lipasa, entre otras. Estimaron el efecto de 14 agentes precipitantes (metanol, etanol, acetona, PEG, entre otros) y de la concentración del glutaraldehído como agente entrecruzante en la formación de los agregados físicos entrecruzados de estas enzimas. Determinaron las estructuras físicas de los CLEA a través de un microscopio de barrido electrónico (SEM), estableciendo que la forma de agregación de las enzimas depende de su grado de glicosilación. Los resultados obtenidos demostraron que todos estos parámetros evaluados inciden de manera directa sobre las propiedades de los agregados obtenidos [36].

CAO y su grupo de investigación determinaron que la inmovilización de enzimas puede realizarse por métodos físicos, como la retención en membranas artificiales

inertes; por medios químicos, como la unión en soportes inertes; por medio de enlaces covalentes o no covalentes, o bien por entrecruzamiento intermolecular a través de reactivos bi-funcionales como el glutaraldehído o el isotiocianato ^[1].

Por otro lado, RESHMI, y colaboradores, trabajaron en la inmovilización de alfa-amilasa en zirconia. El soporte y la inmovilización de la enzima fueron caracterizados por Difracción de Rayos X (DRX) e Infrarrojo (IR). Se confirmó que la enzima fue adsorbida en la parte externa de la superficie del soporte; además se evaluó el efecto del pH, la concentración de la buffer y del sustrato, sobre la actividad de la enzima inmovilizada. Se encontraron mejores resultados cuando se evaluó la cinética para la enzima inmovilizada frente a la enzima libre ^[10].

Türünç y su grupo de investigación, evaluaron el efecto de la inmovilización de alfa-amilasa enlazada covalentemente a la matriz por el método sol-gel. La enzima inmovilizada mostró aumento en la actividad catalítica por periodos de tiempo más prolongados y resistencia a altas temperaturas, comparada con la enzima libre, que fue inactivada al variar las condiciones de reacción ^[7].

WILSON, y colaboradores han resaltado que la inmovilización de proteínas a partir de la técnica de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) ha permitido la estabilización de los complejos multiméricos enzimáticos previniendo su disociación. Con esta técnica, se observó un aumento tanto en la estabilidad y la actividad catalítica de la enzima insolubilizada frente a la enzima soluble ^[8].

SANGEETHA y colaboradores; en su trabajo de investigación, destacaron como la estabilización de la enzima es uno de los principales retos en los procesos de optimización biocatalítica. La subtilisina fue agregada empleando sulfato de amonio y PEG. Los agregados resultantes, fueron entrecruzados utilizando el glutaraldehído, obteniéndose la enzima catalíticamente activa. Los resultados obtenidos mostraron ser una alternativa para inmovilización de enzimas sin la

necesidad de purificar la proteína antes de entrecruzar, lo que es requerido cuando se genera la formación de entrecruzados de enzimas cristalizadas (CLEC) ^[9].

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ALMIDÓN

2.1.1 Historia

Los griegos lo llamaron *Anylon*, quizás debido a que al contrario de lo que sucedía con la harina, se obtenía no por molino, sino por lavado.

En la industria del almidón se conoce muy poco acerca de su aparición. Se admite probablemente que los holandeses en el siglo XVI habían fabricado almidón a gran escala, pero usando como materia prima el trigo. El desarrollo se debió efectuar probablemente de forma muy lenta al igual que en otros países ^[5].

2.1.2 Origen

El almidón es el carbohidrato más importante en la actividad humana por su función alimenticia y por sus múltiples aplicaciones en la industria.

Las plantas sintetizan almidón como resultado de la fotosíntesis, proceso durante el cual toman la energía de la luz solar para convertirla en energía química. Es sintetizado en los plastidios encontrados en las hojas, como un componente de almacenamiento para la respiración durante períodos de oscuridad, también se encuentra en los amiloplastidios de tubérculos, semillas y raíces como compuesto de almacenamiento. En estos últimos organelos una gran cantidad de almidón es acumulado como gránulos insolubles en agua ^[11].

Los gránulos de almidón están formados por capas concéntricas o excéntricas de distinto espesor y forma ^[12]. El aspecto físico y las propiedades de los gránulos varían ampliamente de una planta a otra, y pueden utilizarse para clasificar los

almidones de acuerdo con su origen botánico, encontrándose almidones con formas elípticas, poligonales y redondas ^[12].

A diferencia de los almidones cereales, que requieren procesos industriales muy tecnificados, los almidones de raíces y tubérculos como la papa, la yuca entre otros, son más fáciles de obtener en el medio rural ya que solo requieren de molienda, tamizado, separación con agua, sedimentación y secado ^[13].

2.1.3 Estructura Química

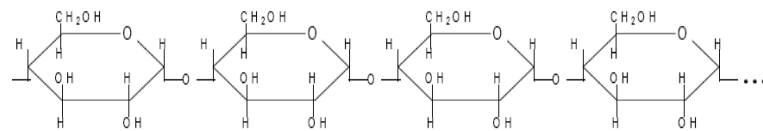
El almidón está constituido por unidades de D-glucosa ($C_6H_{12}O_6$) unidas por enlaces alfa-glucósidos formando dos tipos de polímeros: la α -amilosa y la amilopectina; tal como se muestra en la Figura 1.

La amilosa es un polímero lineal, con un peso molecular de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ Daltons, formado por 6000 unidades de glucosa enlazadas por uniones α -(1→4) glucosídicas. Este enlace permite que adopte una conformación retorcida de manera helicoidal de agregación irregular. Sin embargo, hay moléculas de amilosa con 0,3% -0,5% de sus enlaces glucosídicos de tipo α -(1→6) ^[13]. La estructura tridimensional en forma de hélice se presenta debido al acoplamiento de la posición axial-ecuatorial de las unidades α -D-glucopiranosas con enlaces α -(1→4) glucosídicos de las cadenas que forman una espiral con giro a la derecha. El interior de la hélice contienen sólo átomos de hidrogeno y es por tanto lipofílico, mientras que en el exterior están situados los grupos hidroxilos ^[13]. A su vez, la amilopectina posee cadenas lineales cortas α -(1→4) de 10-60 unidades de glucosa, pero es una molécula ramificada con puntos de ramificación α -(1→6) con 15-45 unidades de glucosa en promedio; además hay evidencias de que pueden existir algunas ramificaciones con enlaces glucosídicos α -(1→2) y α -(1→3) ^[13]. Además, aproximadamente el 5% de su estructura presenta puntos de ramificación. La molécula completa de amilopectina contiene aproximadamente $2 \cdot 10^6$ unidades de glucosa, por lo que es considerada una de las moléculas más

grandes encontradas en la naturaleza con un peso molecular de aproximadamente $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$ Daltons ^[11, 15, 16].

Los modelos estructurales propuestos asumen que las moléculas de amilopectina toman la forma de un racimo y se presentan como dobles hélices ordenadas de forma paralela, dispuestas en el gránulo de almidón de manera radial, y con su extremo reductor orientado hacia el exterior ^[11]. Este tipo de empaquetamiento es lo que forma las pequeñas áreas cristalinas, altamente densas que alternan con las menos densas y amorfas de los almidones ^[13].

a)



b)

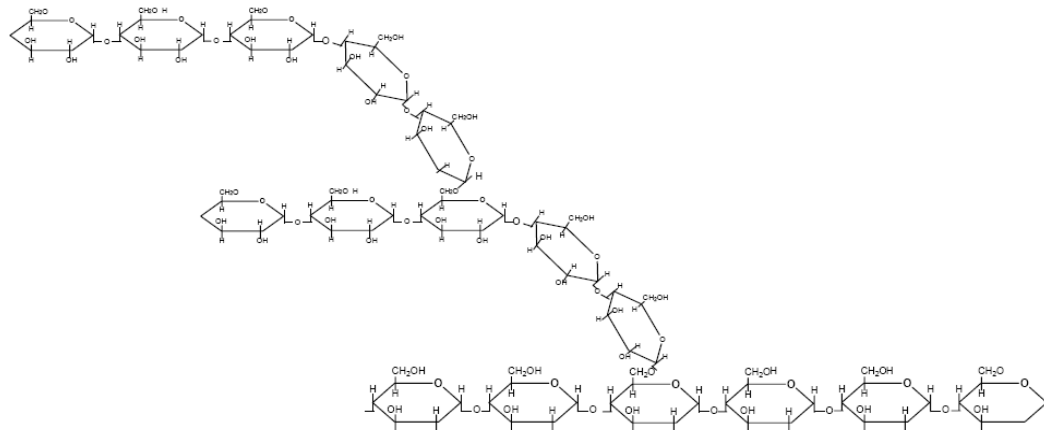


Fig.1 Estructura del almidón: a) Segmento lineal de la amilosa b) Segmento cadena ramificada de la amilopectina.

2.1.4 Gelatinización

Es un proceso irreversible que ocurre después de que es alcanzada una temperatura crítica y consiste en el hinchamiento de los gránulos de almidón

cuando éste es calentado en suspensión acuosa, produciendo el rompimiento de los enlaces de hidrogeno. Durante el proceso de calentamiento, la suspensión de almidón aumenta su viscosidad y ocurre el proceso de gelatinización (cada tipo de almidón gelatiniza en un rango de temperatura definido; por eso, la medida de la temperatura de gelatinización es un parámetro importante en la caracterización del almidón) ^[13, 14].

Algunas moléculas cortas de amilosa se disuelven y se difunden fuera de los gránulos de gelatinizados; mientras que las moléculas más largas de amilosa refuerzan la estructura de los gránulos gelatinizados. Estos cambios tienen lugar en un rango de temperatura que es determinado usando un microscopio de polarización equipado con un sistema de calentamiento y se reporta como el rango de temperatura de gelatinización. La mayoría de los almidones exhiben un rango de temperatura de gelatinización de 8-10°C. El calentamiento continuado de los gránulos de almidón con exceso de agua da lugar a un mayor hinchamiento, lixiviación adicional de componentes solubles (amilosa principalmente) y eventualmente si se aplican fuerzas de cizalla, genera la disrupción total de los gránulos. El exceso de agua hace que los gránulos de almidón alcancen un tamaño varias veces superior al original, y si esta suspensión se agita moderadamente y se calienta, los gránulos de almidón adsorben agua hasta que la mayor parte es absorbida por ellos forzándolos a hincharse, rompiéndose fácilmente y desintegrándose por agitación, lo que resulta en una disminución de la viscosidad. Al enfriarse la suspensión, algunas moléculas de almidón se reasocian parcialmente para formar un precipitado o gel ^[13].

2.1.5 Retrogradación

Es el proceso de agregación y cristalización parcial de las moléculas de almidón gelatinizado que regresan a la condición original de baja solubilidad en agua fría, fenómeno causado por la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas lineales de amilosa, amilopectina y glucosa.

Se considera que la retrogradación ocurre en dos etapas, en la primera, la rigidez y la cristalinidad de los geles de almidón se desarrolla rápidamente por la recristalización de la amilosa, proceso que ocurre durante las 24 horas; y en la segunda etapa la recristalinidad se desarrolla lentamente por la amilopectina. La retrogradación del almidón y la naturaleza de los cristales formados dependen del origen del almidón, el contenido de amilosa, la temperatura de depósito, y la presencia de otros ingredientes.

Es un proceso que ocurre inicialmente durante el enfriamiento, durante la gelatinización o seguido por una reacción de hidrólisis, debido a la amilosa, y posteriormente, incrementando la temperatura aproximadamente entre 50 y 60°C para acelerar el proceso de retrogradación de la amilopectina.

Es la principal causa de deterioro de productos que lo contienen durante su depósito. Este proceso se acelera en forma proporcional con las longitudes de las cadenas externas, primero de la amilosa, y en segundo término de la amilopectina. La hidrólisis parcial del almidón tiene un efecto inhibitorio en todo el sistema con respecto a este tipo de reacción ^[13].

Los factores que afectan la retrogradación son la estructura de la amilopectina el contenido de amilosa y la presencia de componentes diferentes al almidón, incluyendo proteínas, lípidos y oligosacáridos ^[13].

La retrogradación es un proceso dinámico que involucra la creación y destrucción de niveles de integración molecular entre el almidón y las moléculas de agua. En este proceso el almidón gelatinizado sufre transformaciones estructurales resultando en un cambio desde un estado inicial amorfo a un estado final más ordenado o cristalino ^[13]. Se ha sugerido que el proceso de retrogradación puede ser visto como una secuencia de tres pasos dependientes de la temperatura: mecanismo de nucleación, propagación y maduración ^[13]. Se han usado diversos métodos para estudiar la retrogradación, pero a pesar de la gran cantidad de estudios referentes a la gelatinización y retrogradación del almidón, sin embargo,

aún no se ha reportado un estudio completo acerca de la relación entre la estructura química y la cinética de la retrogradación a nivel molecular ^[13].

Se han reportado también estudios de la retrogradación del almidón mediante calorimetría de escaneo diferencial, los cuales muestran que el almidón se retrograda más rápido a bajas temperaturas, lo cual indica que sigue un tipo de cinética específico a diferentes intervalos de temperatura ^[11, 12].

2.2 YUCA

En algunos lugares de América del sur se denomina con este nombre a la mandioca, planta del género *Manihot* que pertenece a la familia de las *Euforbiáceas*.

Es una de las principales plantas tropicales difundidas en todos los continentes. Nativa del Brasil central, fue transportada a finales del siglo XIX por los exploradores españoles y portugueses hasta las indias orientales, de donde se dispersó hacia África y Asia ^[12].

Esta planta florece en suelos pobres de toda la región ecuatorial, con periodos de tiempo que van desde 8 hasta 12 meses ^[12].

Es un arbusto muy robusto, de 2-3m de altura, el tallo de la planta es leñoso y quebradizo, presentando una médula central gruesa. Sus hojas son palmeadas, alternas y caducas, de pecíolo muy largo y dividida de 3-7 segmentos profundos. Las flores se hayan situadas en los extremos del tallo; la yuca es una planta de flores monoicas e inconspicuas, dispuestas en racimo. El fruto es producido entre los 50 y 60 días después de fecundada la flor ^[5].

Se le conoce con los nombres comunes de: Mandioca, Manioca; Yuca, Ubiketilla, Kaspé, Manioc, Suahili, Mhogo y Omowgo ^[12]. En Europa y en Estados Unidos el término Cassava se le aplica a las raíces y el nombre tapioca se refiere al almidó

Taxonomía de la yuca ^[5]

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Orden: Geraniales o Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: Crotonidae

Tribu: Manihoteae

Especie: *Manihot esculenta* crantz

Hasta hace pocos años este cultivo estuvo marginado de la investigación; sin embargo, su reconocida importancia tanto en alimentación humana y animal como en procesos industriales (producción de almidones, alcohol, etc.) ha generado la necesidad de optar o implementar estrategias de estudio e investigación que han permitido incrementar los rendimientos de manera considerable, mejorar las técnicas de cultivo, ampliación de su uso y por ende aumentando beneficio social ^[5].

La variedad de yuca se agrupan en dos grandes grupos: yuca dulce o comestible y yuca amarga o brava ^[12]. Esta clasificación se basa en el mayor o menor contenido de glucósidos tóxicos generadores de ácido cianhídrico. Este ácido se forma por la acción de la linamaraza sobre un glucósido cianogénico llamado linamarina ($C_{10}H_{17}O_6N$). Las variedades amargas tienen una mayor cantidad de glucósidos tóxicos en la pulpa de la raíz, mientras que la dulce contiene trazas en la cáscara, las cuales desaparecen durante la cocción ^[12].

Las variedades amargas se cultivan para la fabricación de almidón de yuca comercial, debido a que su contenido de almidón es más alto que en las variedades dulces.

Las raíces tuberosas de la yuca tienen como característica principal la capacidad de almacenar almidón, razón por la cual es la parte de la planta que tiene mayor

valor económico. Estas raíces son idénticas a las raíces fibrosas, pero se diferencian en que la polaridad de crecimiento de la raíz cambia de longitudinal a radial cuando se inicia la acumulación de almidón. En la pulpa de la raíz se encuentra el almidón, cuyas células lo contienen en abundancia en forma de gránulos redondos de diferente tamaño ^[12].

La composición típica de una raíz tuberosa de yuca es la siguiente:

Tabla 1: Composición típica de una raíz tuberosa de yuca ^[12]

Parámetro	% p/p
Humedad	70
Almidón	24
Fibra	2
Proteína	1
Otros	3

El almidón de yuca es un polvo fino, de color blanco, con aproximadamente un 13% de humedad como máximo y un pH cercano a 6 ^[12]. Los gránulos de almidón de yuca son redondos, ovalados y poseen borde dentado. Son más blandos que los gránulos del maíz y su estructura es más rígida y compacta.

Estos gránulos se rompen al alcanzar los 70°C, siendo menos estables que los gránulos del arroz, maíz, trigo, cebada y papa ^[12].

2.2.1 Yuca Amarga

Recibe este nombre debido a su contenido de ácido cianhídrico libre y de cianoglucósidos. Posee aproximadamente 30% (p/p) de almidón y un contenido de humedad de aproximadamente 53%.

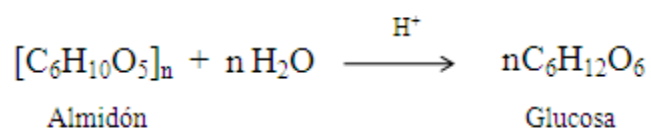
El ácido cianhídrico se halla en mayor concentración en la corteza de la raíz y en menores cantidades en las hojas y en otros órganos de la planta. En las hojas adultas el contenido de ácido cianhídrico es de 41 mg de HCN/Kg de yuca, en los tallos verdes el contenido es de 24 mg HCN/Kg de yuca, en la médula del tallo el contenido es de 26mg de HCN/kg de yuca, y en la raíz el contenido es de 53 mg hasta 1000 mg de HCN/Kg de yuca ^[5].

De la yuca a nivel industrial se aprovechan gran cantidad de productos procesados, siendo uno de los más importantes el almidón. Las técnicas para la producción de alcohol, utilizando como materia prima la yuca, han sido desarrolladas por la industria privada y cuyo principal obstáculo tecnológico es lograr reducir los requerimientos de energía para la destilación mediante el uso de tallos de la yuca como fuente de energía del proceso.

2.2.2 Hidrólisis parcial del almidón de yuca

El almidón se puede degradar mediante una hidrólisis en la presencia de catalizadores como ácidos o enzimas, pasando por diversos estados de degradación, hasta llegar a su forma monomérica original, la glucosa. En 1811, Kichoff fue el primero en obtener un sustituto del azúcar a través de la hidrólisis ácida del almidón ^[5, 12]. Desde entonces, este proceso ha sido modificado y mejorado para producir jarabes, glucosa cristalizada y otros productos de gran valor comercial.

El proceso químico está representado por la siguiente ecuación:



Las moléculas de almidón, como todos los polisacáridos, son hidrolizados por la acción de ácidos en caliente. Según el tiempo de reacción, se obtiene el grado de

hidrólisis deseado. El ácido se neutraliza, y se recupera el producto tras lavado y desecación^[13].

La destrucción controlada de las cadenas poliméricas o hidrólisis del almidón a través de soluciones básicas, ácidas o catalizadas por enzimas, da lugar a la formación progresiva de dextrina y moléculas de maltosa y glucosa; mezcla que comúnmente se denomina como jarabe de D-glucosa, caracterizado por su equivalente de dextrosa (ED)^[13].

2.3 Hidrólisis enzimática

Los componentes principales del almidón se pueden hidrolizar utilizando amilasas como catalizadores^[13]. Las enzimas se encuentran en la saliva, los jugos pancreáticos, las células de la sangre, las semillas y granos de muchas plantas, en hongos y bacterias.

Existen básicamente cuatro grupos de enzimas en el proceso de conversión del almidón:

(i) endoamilasas, (ii) exoamilasas; (iii) enzimas desramificadoras y (iv) transferasas^[11, 17].

Las endoamilasas son capaces de hidrolizar enlaces α ,1-4 glucosídicos en la parte interior de la cadena de la amilosa o de la amilopectina. La alfa-amilasa es la endoamilasa más conocida. Los productos finales de hidrólisis por la alfa-amilasa, son oligosacáridos con longitud variable en configuración α , y dextrinas con límite- α que constituyen oligosacáridos ramificados^[17].

En el segundo grupo, la exoamilasas, rompen enlaces α ,1-4 glucosídicos (β -amilasa), o hidrolizan enlaces α ,1-4 y α ,1-6 glucosídicos (glucoamilasa y α -glucosidasa). Las exoamilasas actúan en los residuos externos de glucosa de la amilosa o amilopectina, por tanto el producto es glucosa o maltosa^[11, 17].

Las enzimas amilolíticas unen los residuos glucósidos del sustrato en una serie de subsitios consecutivos que se extienden en toda la hendidura del sitio activo donde se lleva a cabo la reacción.

Las enzimas desramificadoras hidrolizan exclusivamente enlaces α ,1-6 glucósido (isoamilasa y pullanasa tipo I). Los principales productos son la maltosa y la maltotriosa ^[11,18].

Las transferasas hidrolizan un enlace α ,1-4 glucósido de la molécula donadora y la transfiere al aceptor con la formación de un nuevo enlace glucósido ^[11].

La hidrólisis enzimática de los gránulos de almidón se afecta por la estructura del gránulo, el tipo de cristal, el tamaño del cristal, la relación amilosa/amilopectina y el peso molecular promedio de esta relación, la presencia de lípidos y proteínas, y las condiciones de especificidad de reacción de la enzima ^[13].

2.4 Dextrinas

Las dextrinas o almidones modificados son almidones nativos que han sido sometidos a uno o más tratamientos, físicos, químicos, o tratamientos enzimáticos que conllevan a la desorganización granular, degradación polimérica, re-arreglos moleculares, oxidación o adición de grupos químicos ^[13].

Todas las dextrinas pertenecen a un grupo grande de polímeros D-glucosa, desde las lineales, a través de las estructuras ramificadas, hasta los compuestos cíclicos ^[13].

2.4.1 Clasificación

Las dextrinas, pueden clasificarse en cuatro grupos mayores: primero, las dextrinas obtenidas por la acción enzimática, particularmente por la acción de las amilasas sobre el almidón; segundo, dextrinas cíclicas de Schardinger producidas por la acción de *Bacillus macerans* sobre los almidones; tercero, dextrinas

producidas por hidrólisis ácida en medio acuoso; y cuarto, las piro dextrinas, que comprenden productos preparados por la acción del calor, o el calor y los ácidos sobre el almidón^[13, 49].

2.5 Hongos

Los hongos son organismos vivos, que poseen un cuerpo que puede ser filamentoso multicelular o no filamentoso unicelular. Antiguamente los hongos figuraban como una división del reino Plantas (*Plantae*). Se pensaba que eran plantas carentes de tallos y de hojas que en el transcurso de su transformación en organismos capaces de absorber su alimento habían perdido la clorofila, y con ello su capacidad para realizar la fotosíntesis.

Los hongos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua e hidratos de carbono. La mayoría utilizan azúcares como glucosa y levulosa (D-fructosa), pero otros usan compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para sintetizar las enzimas adecuadas. Los hongos además precisan otros elementos como oxígeno, nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio y azufre^[5].

2.5.1 *Aspergillus niger*

Al género *Aspergillus* pertenecen los hongos filamentosos (formadores de hifas), las cuales presentan un revestimiento (micelio) blanquecino y coloreado (negro, verde, pardo y amarillo) sobre el substrato en el cual crecen.

La reproducción asexual se efectúa por medio de microconidias colocadas en esterigmatas en los extremos de la vesícula o cabeza que caracterizan al micelio aéreo. Durante la germinación las conidias aumentan de tamaño, y forman varios tubos germinativos que se desarrollan en un micelio pluricelular ramificado, eso explica la forma redonda de la colonia^[5, 19].

La especie *niger* del género *Aspergillus* es miembro de la clase tentativa *Deuteromycetes*, los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza:

frutas, vegetales u otros sustratos les sirven de alimento. Tienen importancia económica porque se les usa en muchas industrias para la hidrólisis de almidón y en la fermentación que incluyen la producción del ácido cítrico y el ácido glucónico, que son elaborados en abundancia por *Aspergillus niger* ^[19].

2.5.2 Clasificación Taxonómica

Como características utilizadas en la clasificación están: el color de la cabeza conidiana, la forma de la vesícula, los cambios que se dan en el conidióforo y la forma de las células en nuez (Hulle) cuando están presentes y la existencia o no de esclerote y estructuras asexuadas ^[5, 19].

Clasificación taxonómica de *Aspergillus niger* ^[5]

Dominio	Eucharya
Subdominio	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Familia	Moniliales
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>niger</i>

2.6 Biocatalizadores

2.6.1 Historia

Las enzimas se han empleado como una herramienta eficaz para diferentes procesos de bio-transformación. Antes del siglo XIX se creía que procesos como la fermentación alcohólica, la producción del cuajo de la leche y otros procesos similares eran procesos químicos espontáneos que no requerían de la intervención de ningún organismo; hasta que en 1857 el químico Louis Pasteur descubrió que

en el proceso de la fermentación estaban implicados dos tipos de levaduras, una de las cuales producía el alcohol y la otra el ácido láctico que agriaba el vino ^[20].

A mediados del siglo XIX el científico, Antoine Laurent Lavoiser (1743-1794) empezó a utilizar los microorganismos como fuente enzimática, y fue el primero en establecer las bases cuantitativas en los procesos de la fermentación alcohólica. Después de 1897 Buchner hizo el primer reporte sobre estabilización de enzimas. A su vez en el experimento de jugo de levadura pre-hidratado, Luis Pasteur descubrió que las enzimas estaban íntimamente ligadas con la estabilidad de las células, mientras que en 1896 William Khune propuso el nombre de en (en) y zyme (levadura) para estas macromoléculas ^[20].

2.6.2 Enzimas

La variedad enorme de reacciones bioquímicas que comprende la vida está mediada casi en su totalidad por un conjunto de catalizadores biológicos notables denominados enzimas. Si bien éstas se encuentran sometidas a las mismas leyes de la naturaleza que gobiernan las demás sustancias, difieren de los catalizadores químicos habituales en varios aspectos importantes ^[21]:

1. Mayores velocidades de reacción: en general, las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas aumentan de 10^6 a 10^{12} veces con respecto a las mismas reacciones no catalizadas por ellas, y al menos varios órdenes de magnitud superiores a las de las reacciones correspondientes catalizadas por medios químicos.
2. Condiciones moderadas de reacción: temperaturas inferiores a 100°C , presión atmosférica y pH casi neutro.
3. Mayor especificidad de reacción: las enzimas tienen un grado de especificidad mucho más vasto, respecto a las identidades tanto de sus

sustratos como de sus productos, en comparación con los catalizadores químicos; o sea las reacciones enzimáticas rara vez tienen productos secundarios.

4. Capacidad de regulación: las actividades catalíticas de muchas enzimas varían en respuesta a las concentraciones de sustancias distintas de sus sustratos y productos.

2.6.3 Estructura

Además de su parte proteica (apoenzima), la molécula enzimática puede estar integrada por otras macromoléculas ligadas por enlaces covalentes (carbohidratos) y no covalentes (ácidos nucleicos, lípidos), y por grupos de bajo peso molecular (coenzimas), que participan activamente en el proceso catalítico y son por tanto esenciales para la expresión de la actividad enzimática ^[21, 22].

2.6.4 Propiedades de las enzimas derivadas de su estructura proteica

-Estabilidad: la capacidad catalítica (actividad) de una enzima depende de la posibilidad de mantener una configuración particular, denominada estructura nativa. La configuración nativa de una enzima es la resultante de muchas fuerzas de interacción como son puentes de hidrógeno, interacciones apolares, puentes disulfuro, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, entre otras.

Los cambios ambientales, incluso muy suaves, pueden debilitar estas interacciones alterando la estructura tridimensional nativa y provocando la pérdida total o parcial de su funcionalidad biológica.

Se entiende por desnaturalización cualquier proceso que altere la estructura tridimensional nativa de una enzima. Por lo general, esta alteración lleva asociada una pérdida de actividad ^[22].

-*Actividad:* Desde un punto de vista termodinámico, la enzima como todo catalizador, actúa disminuyendo la magnitud de la energía de activación que requiere una reacción. Desde un punto de vista cinético, la acción de la enzima se traduce en un incremento en la velocidad de transformación de sustrato a producto [22].

La actividad enzimática se expresa en unidades de actividad. La definición propuesta por la Unión Internacional de Bioquímica conocida como unidad internacional (UI) de actividad. Se define una UI como la cantidad necesaria de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto en condiciones óptimas de temperatura y pH, y bajo condiciones de concentración de sustrato que aseguren la velocidad máxima de reacción [22].

2.7 Alfa-amilasa (*Aspergillus niger*)

Las endoamilasas son capaces de hidrolizar enlaces α ,1-4 glucosídicos en la parte interior de la cadena de la amilosa o de la amilopectina.

La alfa-amilasa es la endoamilasa más conocida. Los productos finales de hidrólisis son oligosacáridos con longitud variable en configuración α , y dextrinas con límite- α que constituyen oligosacáridos ramificados [17].

La alfa-amilasa pertenece a la familia 13 glicosil hidrolasas (GH 13), de acuerdo con la clasificación de Henrissat (1991) [18].

En esta familia se comparte un grupo de características comunes tales como: actúan en enlaces α -glucosídicos e hidrolizan este enlace para producir α -mono o oligosacáridos, poseen una estructura $(\beta/\alpha)_8$ o TIM barril que contiene los residuos del sitio catalítico, poseen cuatro regiones altamente conservadas (I β 2, II β 4, III β 5, IV β 7), estos contienen los aminoácidos en su secuencia primaria que forman el sitio catalítico, como algunos otros aminoácidos esenciales para conservar la estabilidad del TIM barril [11, 23].

2.7.1 Organización del dominio

Una característica que presentan las enzimas de la familia de α -amilasas es que todas manejan un mecanismo de α -retención pero ellas varían ampliamente su especificidad de sustrato y producto. Estas diferencias pueden ser atribuidas a los diferentes dominios adjuntos al centro catalítico o a los azúcares enlazados a los subsitios alrededor del centro activo [11, 24].

Los dominios estructurales que se conservan para alfa-amilasa son el dominio A, B y C. El dominio A, que consiste en un pliegue altamente simétrico de 8 β -hebras paralelas organizadas en bucle encerradas por 8 α -hélices. Los residuos aminoacídicos que intervienen en la catálisis y la unión del sustrato están localizados en el lazo C-terminal de las β -hebras de este dominio.

El dominio B es el que sobresale entre la β -lamina número 3 y la α -hélice número 3. Tiene una longitud entre 44-133 residuos aminoacídicos y desempeña el papel de unión de sustrato o del ión Ca^{+2} [11, 24, 25].

Otro dominio que puede estar presente en frente o detrás del dominio A es el dominio C, la función de éste no está claramente identificada, aunque algunos estudios sugieren que está directamente involucrado en la actividad de la enzima [11, 26].

2.7.2 Mecanismo de la alfa-amilasa

El mecanismo catalítico de aceptación general para la familia alfa-amilasa es de α -retención de doble desplazamiento. Este mecanismo incluye dos reacciones tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ [24].

Este involucra dos residuos aminoacídicos en el sitio activo; el ácido glutámico (Glu 230, numeración definida en *Aspergillus niger*) como catalizador ácido-base,

y el aspartato (Asp206, numeración definida en *Aspergillus niger*) como nucleófilo ^[11, 24].

Se muestra claramente el mecanismo en 5 pasos, ver Figura 2 ^[24]:

- (i) Después que el sustrato ha sido enlazado en el sitio activo, el Glu230 en su forma ácida dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico. El oxígeno se encuentra entre dos moléculas de glucosa ubicadas en los subsitios -1 y +1; luego se da el ataque nucleofílico por el Asp206 al C1 de la molécula de glucosa ubicada en el subsitio -1
- (ii) Un ión como oxocarbanión es generado en el estado de transición, seguido por la formación de un intermediario covalente
- (iii) La molécula de glucosa protonada en el subsitio +1 abandona el sitio activo, mientras que una molécula de agua o una nueva molécula de glucosa se mueve hacia el sitio activo y ataca el enlace covalente existente entre la molécula de glucosa ubicada en el subsitio -1 y el Asp206
- (iv) Un ión como oxocarbanión es formado de nuevo como estado de transición
- (v) El Glu230 comportándose como base acepta un hidrógeno de una molécula de agua entrante ó nuevamente de una molécula de glucosa, introducida al subsitio +1. El oxígeno de la molécula de agua o de la molécula de glucosa entrada al subsitio +1 reemplaza el enlace oxocarbanión que hay entre la molécula de glucosa ubicada en el subsitio -1 y el Aps297, formado un nuevo grupo hidroxil en la posición C1 de la glucosa en el subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glucosídico entre la glucosa del susbsitio -1 y +1 (transglicosilación) ^[24].

-Mecanismo de reacción

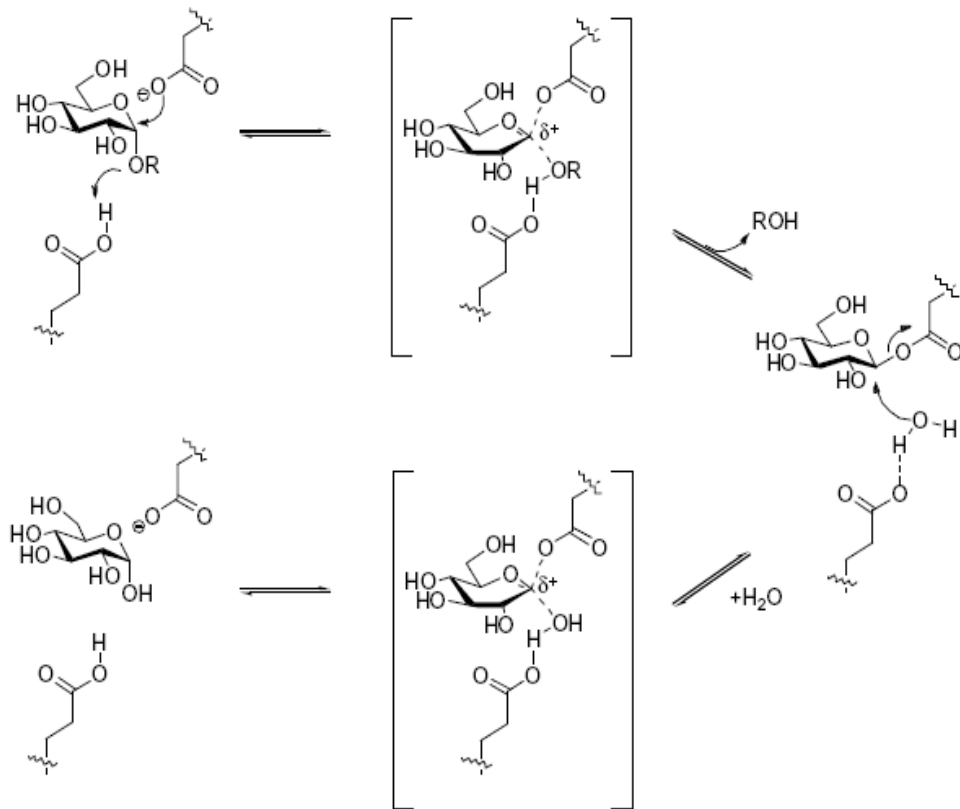


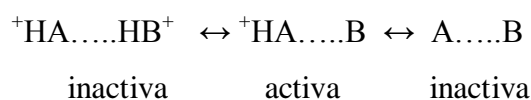
Fig. 2. Mecanismo de doble desplazamiento seguido por la formación de un intermediario covalente y su liberación por el desplazamiento nucleofílico por una molécula de agua ^[24].

2.8 Factores que afectan la catálisis de la alfa amilasa

-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. La sensibilidad al pH refleja generalmente alteraciones en el estado de ionización de uno o más residuos que participan en la catálisis. Se pueden conocer habitualmente los efectos del pH trazando una gráfica de éste 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 ^[27].

El comportamiento sigmoide 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 ^[3, 27].



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 ^[3, 21, 27].

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 isoelectrico, pueden provocar desestabilización de la enzima debido a fuerzas de repulsión ^[3, 22].

-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 ^[3].

Durante estos estudios se realizaron dos observaciones importantes, la primera es que a concentraciones elevadas de sustrato la enzima se encuentra saturada, 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 el 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) [3, 27, 28]. 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.

Según la literatura, alfa-amilasa puede describirse bajo este modelo cinético, por ello se describen los conceptos sobre los parámetros cinéticos:

- V máxima ($V_{m\acute{a}x}$): se produce con concentraciones elevadas de sustrato. La velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato tiende a crecer hasta un punto en que se hace constante, en este momento es cuando la enzima se satura y encuentra en su totalidad en la forma ES:

Ecuación 1.

$$V_{m\acute{a}x} = K_2[E]_T$$

En consecuencia, la ecuación 2 es la expresión básica de la cinética enzimática

Ecuación 2.

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]}$$

La velocidad máxima tiene unidades de U/mg de enzima [3, 16, 21].

- Constante de Michaelis (K_M): con la concentración de sustrato para la que $[S] = K_M$, la ecuación 2 rinde $V_0 = V_{m\acute{a}x}/2$, por lo que K_M es la concentración de sustrato para la que la velocidad de reacción es la mitad de la máxima. En consecuencia si una enzima tiene un valor un valor de K_M pequeño logra eficiencia catalítica máxima con bajas concentraciones de sustrato [21].

La magnitud de K_M tiene amplia variación con la identidad de la enzima; también es función de la temperatura y el pH.

La constante de Michaelis se puede expresar como:

Ecuación 3.

$$K_M = K_s + \frac{K_2}{K_1}$$

Dado que K_s es la constante de disociación del complejo de Michaelis, a medida que disminuye K_s aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato.

Para determinar los valores de los parámetros de la ecuación de Michaelis-Menten, existe un método formulado por Hans Lineweaver y Dean Burk utiliza de la ecuación 2, así como se indica en la ecuación 4.

Ecuación 4.

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Es una ecuación lineal en $1/V_0$ y $1/[S]$. Si se grafican estas cantidades, en el gráfico de Lineweaver-Burk o de dobles recíprocas, se obtiene que $K_M/V_{m\acute{a}x}$ es la pendiente de la recta y $1/V_{m\acute{a}x}$ es el intercepto con el eje y [3, 21, 30].

-Efecto de la temperatura: Los principales tipos de interacciones responsables de la estructura tridimensional de la proteína, son, puentes de hidrógeno, interacciones apolares, puentes disulfuro, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, las cuales se ven directamente afectadas con el cambio de la temperatura. Esto se traduce en un aumento de la energía vibracional que puede debilitar o provocar la ruptura de estas interacciones alterando la estructura tridimensional nativa y provocando la pérdida total o parcial de su funcionalidad biológica ^[22]. Por otra parte, si se disminuye la temperatura, puede que no se favorezca la adecuada configuración del sitio activo para llevarse a cabo la catálisis ^[3, 22].

2.9 Inmovilización enzimática

La aplicación de biocatalizadores en procesos a nivel industrial es limitada, generalmente por factores como la elevada solubilidad que presentan en medios acuosos, lo que dificulta su recuperación del medio de reacción y disminución de su estabilidad y actividad catalítica ^[1].

Las técnicas de inmovilización de enzimas es un campo que a partir de los años sesenta se ha estudiado ampliamente, debido a que ha permitido superar algunas desventajas de las enzimas asociadas a sus orígenes fisiológicos, conllevando por ende a grandes beneficios en los procesos de bio-transformación ^[1].

Se entiende por enzima inmovilizada aquella física o químicamente asociada a un soporte o una matriz que no es esencial para su actividad ^[22]. Las enzimas son usualmente inmovilizadas al soporte a través de algún tipo de interacción entre los residuos aminoacídicos de la molécula proteica y el soporte ^[31].

Las ventajas que se han obtenido con el proceso de inmovilización 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 ^[3, 32].

2.9.1 Clasificación de los métodos de inmovilización

Existen diversas formas:

-*Enlace químico*: ya sea por unión a soportes (adsorción o enlace covalente) o entrecruzamiento (puro o asociado) ^[22].

-*Confinamiento*: por inclusión en matrices (geles) o retención por membranas (microcápsulas, fibras huecas, etc.) ^[22].

Para el estudio realizado, el método de mayor importancia es el entrecruzamiento de proteína.

Se utilizan agentes entrecruzantes bifuncionales o multifuncionales con los que la enzima pueda establecer enlaces intermoleculares covalentemente con grupos del soporte y de la propia enzima, o intramoleculares entre dos grupos de la misma molécula de enzima, lo que contribuye a una estabilización adicional ^[33].

Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos (glutaraldehído), diiminóesteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e incluso, diaminas si están activadas con carbodimidina ^[22, 34].

La inmovilización libre de soporte no necesita una masa inactiva extra como matriz. Diferentes estrategias de entrecruzamiento han sido reportadas entre las cuales se encuentran el entrecruzamiento de enzimas en disolución (CLEs), enzima cristalina (CLECs), enzima secada por aspersion (CSDEs) y enzimas agregadas físicamente (CLEAs) ^[49].

El desarrollo de estas técnicas se han 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. De esta manera, se obtuvieron 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 ^[3, 35].

Con el fin de superar estos inconvenientes surge la técnica de entrecruzamiento de agregados de proteína, (CLEAs), en la cual se adiciona inicialmente un solvente orgánico, sal, o un polímero no iónico, que permite 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 presentan las mismas ventajas obtenidas para los CLECs; quedando superado el inconveniente de tener que purificar la enzima mediante un procedimiento más exhaustivo ^[35].

2.9.2 Elaboración de agregados enzimáticos entrecruzados (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 ^[36].

La metodología consta de dos etapas. 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; ver Figura 3 ^[35].

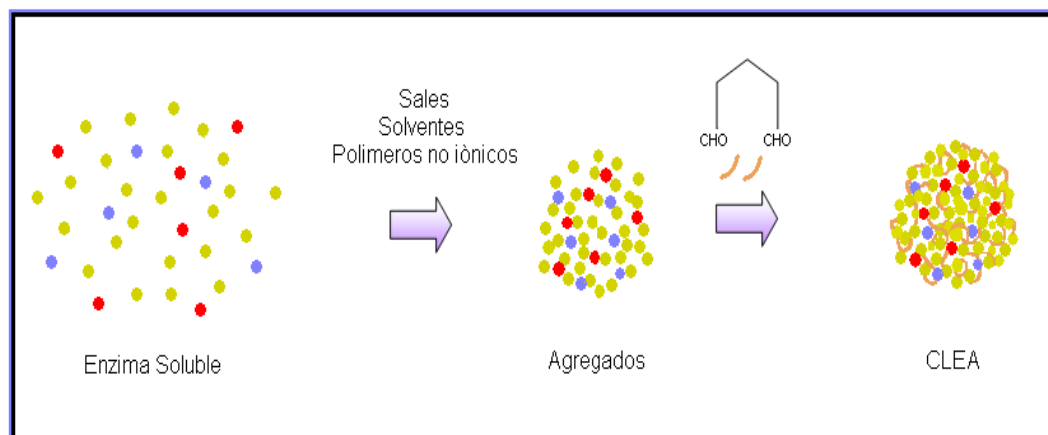


Fig. 3. Etapas en la elaboración de agregados entrecruzados de enzima ^[36].

Durante la etapa de agregación, la solubilidad de la enzima en el medio circundante decrece. Cuando este proceso de agregación disminuye, la enzima puede desnaturalizarse por causa de una gran fuerza ejercida sobre su estructura. Las observaciones anteriormente mencionadas sugieren que la formación del agregado insoluble de la enzima constituye una etapa esencial en la retención de la actividad enzimática, por lo que se hace necesaria la selección adecuada del agente precipitante.

Los residuos de lisina (Lys) que posee la enzima se consideran entre los más reactivos, ya que estos son los que principalmente interactúan con el glutaraldehído, formando bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono carbonilo del aldehído ^[3, 35]. Sin embargo, las bases de Schiff no son estables bajo condiciones ácidas y tienden a regenerar el aldehído y la amina.

En contraste, el enlace formado por la reacción del glutaraldehído con un grupo amino muestra estabilidad para pH y temperaturas extremas.

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: pH, temperatura, concentración de proteína, elección del agente precipitante y el agente entrecruzante.

En la Figura 4 se muestra la estructura de la alfa-amilasa de *Aspergillus niger*.

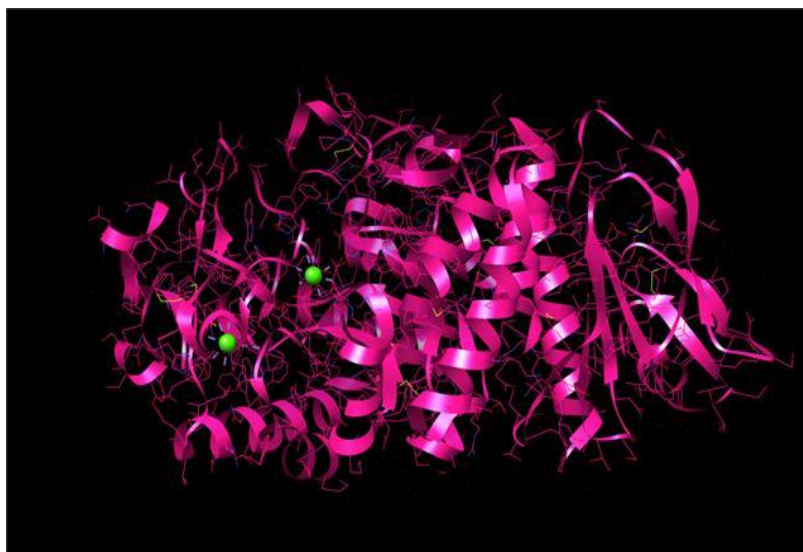


Fig. 4. Alfa amilasa. Tomado de Protein Data Bank. Software de visualización UCSF CHIMERA. Código de acceso 2aaa.pdb

2.9.3 Entrecruzamiento de enzima (CLE)

La metodología para el entrecruzamiento de la enzima es similar a la descrita en la sesión 2.9.2; en esta técnica la etapa de agregación no es considerada.

2.10 Generalidades del glutaraldehído

El glutaraldehído es un dialdehído de 5 carbonos, incoloro, aceitoso y soluble en agua y solventes orgánicos ^[34].

Puede presentar en solución acuosa, al menos 13 estructuras diferentes dependiendo de las condiciones de pH, concentración y temperatura. Las estructuras en solución acuosa incluyen formas monoméricas, poliméricas, aldehídos α,β -insaturados y varias formas cíclicas, ver Figura 5. El mecanismo mediante el cual reacciona 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 ^[37].

Se encuentra principalmente disponible como una solución acuosa ácida (pH 3 - 4.), variando en concentración desde el 2% hasta el 70% (p/v).

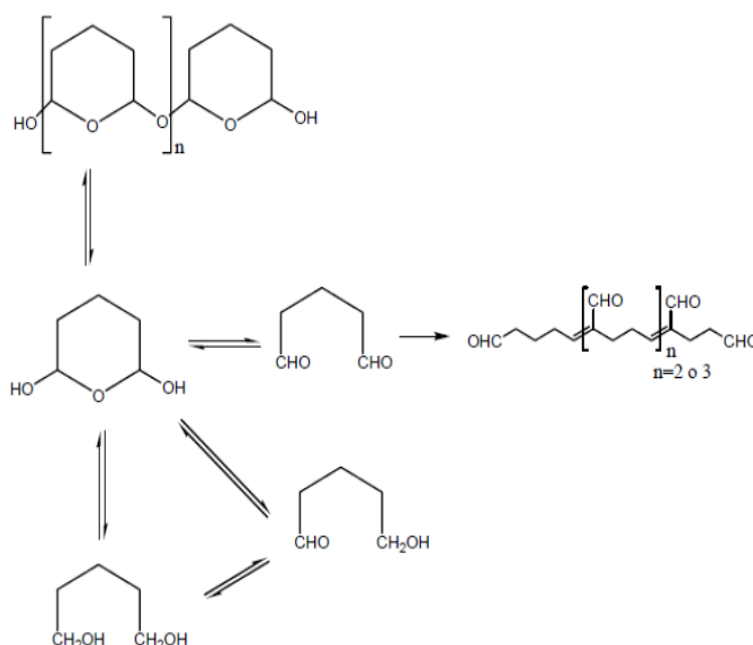


Fig. 5. Posibles formas de glutaraldehído en solución acuosa ^[3, 34].

Se han propuesto diversos de mecanismos de reacción, entre ellos el de Richards y Knowles, de interacción del glutaraldehído y el grupo ϵ -amino del residuo de lisina de las proteínas. Uno propone que interactúan a través de una reacción de tipo Michael, tal como se puede observar en la reacción 2 de la Figura 6. Posteriormente, surgió un mecanismo ligeramente diferente, en el cual una reacción de adición ocurría sobre la parte aldéhdica del polímero α - β -insaturado (poli-glutaraldehído) para originar una base de Schiff (imina) estabilizada por conjugación, la cual se presenta en la reacción 1 ^[49].

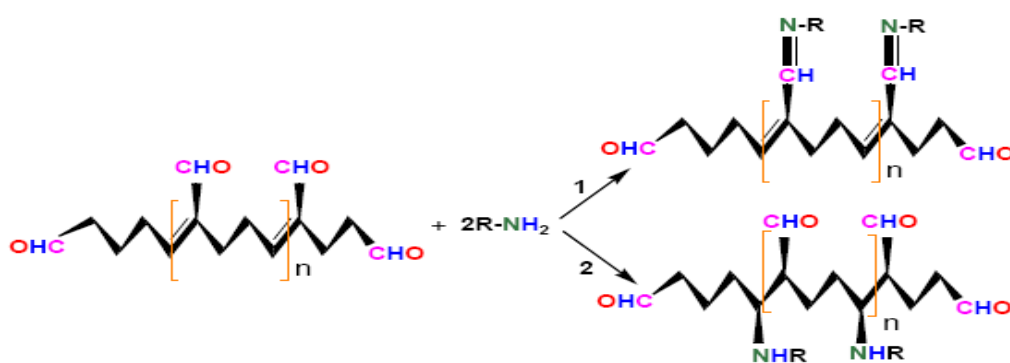


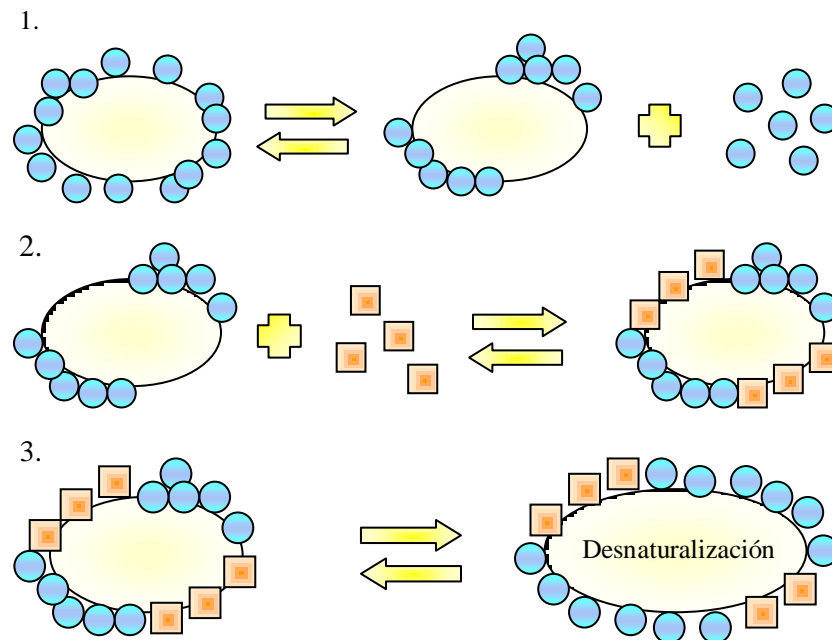
Fig. 6. Reacciones del glutaraldehído con proteínas ^[49].

2.11 Agentes precipitantes

Las propiedades fisicoquímicas exhibidas por una enzima están vinculadas directamente o indirectamente al rol del agua en las interacciones no-covalentes (electrotáticas, puentes de hidrógeno, van der Waals e hidrofóbicas), las cuales ayudan a mantener la conformación catalíticamente activa de la enzima ^[20, 22].

La naturaleza del solvente orgánico afecta la catálisis enzimática de diferentes formas ^[20, 22, 38].

- causando inhibición o inactivación de la enzima, viéndose afectada la conformación nativa de la proteína, por alteración de las interacciones que mantienen su estructura 3D.
- interaccionando con sustratos o productos de la reacción, provocando disminución de la actividad catalítica.
- removiendo la capa de agua que rodea la enzima (cambio en el estado de hidratación), especialmente con solventes polares capaces de solubilizar grandes cantidades de agua que puede llevar a su consecuente desnaturalización ver Figura 7.



Los círculos en color azul representan las moléculas de agua que forman el microambiente acuoso de la enzima.

Los cuadrados en color naranja representan las moléculas de solvente.

Fig. 7. Efecto desnaturalizante de los solventes orgánicos provocados por un cambio en el estado de hidratación de las enzimas ^[38].

Etapas del proceso de desnaturalización enzimática de acuerdo con la Figura 7^[38].

- 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.

3 METODOLOGÍA

El orden experimental consistió, en determinar las condiciones óptimas de la enzima alfa-amilasa soluble y posteriormente, manteniendo las condiciones establecidas, se empleó dos técnicas de insolubilización CLEA (cross-linked aggregates enzyme) y CLEs (cross linked enzymes).

3.1 Análisis de la concentración de proteína

La concentración de proteína de la enzima soluble se determinó empleando el método colorimétrico de Bradford ^[41].

Este método se utilizó por ser rápido, reproducible y sensible para cuantificar proteínas, sin interferencias por la presencia de aminoácidos y carbohidratos ^[3,41].

La absorbancia registrada a 595nm se extrapoló a la curva de calibración del método (anexo 1), que se hizo previamente empleando como patrón interno albúmina de suero bobino (BSA). La concentración de proteína se expresa en mg de proteína/ ml de solución.

Para la medición se utilizó un espectrofotómetro Visible marca Spectronic 20 Génesis.

3.2 Efecto de la concentración del cofactor Ca²⁺ sobre la actividad enzimática de la alfa-amilasa soluble

Se hicieron preparados enzimáticos de concentración 3mg/ml, evaluando el efecto del ión Ca²⁺ adicionado al medio de reacción en un rango de concentración de 0,01-0,05 %p/v sobre la máxima actividad catalítica de la alfa-amilasa.

3.3 Determinación de la actividad enzimática de la alfa-amilasa soluble

Se incubó el preparado enzimático soluble en buffer acetato de sodio 16mM, a pH 4.7, al cual se le adicionó como sustrato almidón de yuca a una concentración de 10mg/ml a 50 °C con agitación constante a pH 4.7. Para determinar el rango de linealidad la enzima se dejó en reacción por diferentes periodos de tiempo cuantificando los azúcares reductores producidos y observando la eficiencia de la catálisis tal como se observa en la Figura 8.

Para cuantificar los productos de reacción (azúcares reductores) se empleó el método colorimétrico del DNS, el cual se basa en la reacción de oxido-reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicilato ^[42]; ver Figura 9.

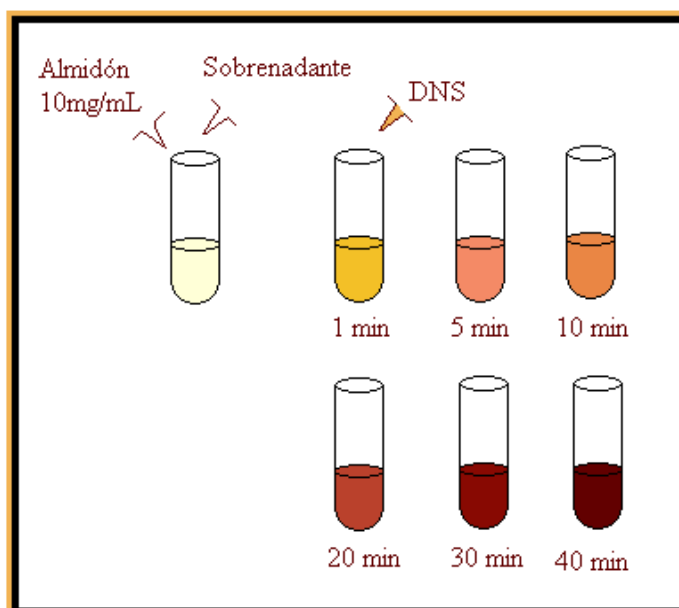


Fig. 8. Cuantificación de azúcares reductores por el método colorimétrico del DNS ^[42].

El valor de absorbancia se leyó a una longitud de onda 540nm y se interpoló a la curva de calibración (anexo 2) la cual se hizo con glucosa comercial con

concentraciones entre 0.01 y 1mg/ml. Las mediciones fueron hechas en un espectrofotómetro marca Spectronic Visible 20 Génesis.

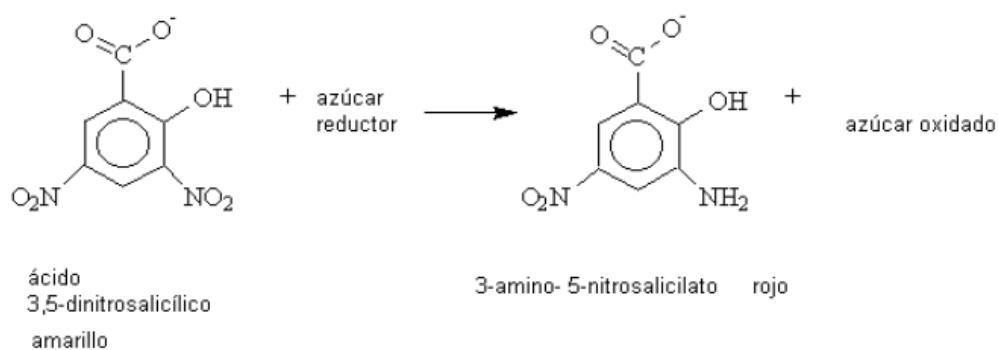


Fig. 9. Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor ^[42].

3.4 Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA)

Los agregados entrecruzados de alfa-amilasa se elaboraron de acuerdo con la metodología desarrollada por Sheldon y col ^[36].

Para cada ensayo se mantuvo constante los parámetros mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2: Parámetros constantes para la elaboración de los CLEAs de alfa-amilasa

Parámetros	Valores constantes
Cofactor	0,01% p/v
pH	4,7
Temperatura	4°C
Tiempo de agregación	1 hora
Tiempo de inmovilización	3 horas
Fuerza Iónica	16mM

Se prepararon extractos enzimáticos de alfa amilasa a diferentes concentraciones, y la precipitación se realizó utilizando como agente precipitante un solvente orgánico (propanol). Posteriormente, se hizo el entrecruzamiento de los distintos agregados físicos, utilizando el agente bi-funcional glutaraldehído.

Para evaluar la influencia de los factores [Proteína], [Propanol] y [Glutaraldehído] en el proceso de elaboración de los CLEA se realizó un diseño de experimentos multifactorial multinivel 3³ donde la variable de respuesta que se analizó fue la actividad catalítica de los CLEAs. La matriz experimental se muestra en la Tabla 3.

En la Tabla 4 se muestran los valores de concentración para cada una de las variables evaluadas en el proceso.

Tabla 4: Variables seleccionadas para el proceso de elaboración de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de alfa-amilasa, empleando propanol como agente precipitante.

Variable	Nivel bajo -1	Nivel medio 0	Nivel alto 1
Concentración de Proteína [mg/mL]	9	12	15
Concentración de Agente Precipitante [%v/v]	50	70	90
Concentración de glutaraldehído [%p/v]	0,5	1,0	1,5

3.4.1 Procedimiento para la elaboración de los CLEAs

El proceso se llevó a cabo tal como se muestra en la Figura 10 ^[36].

Tabla 3. Matriz del diseño experimental

Ensayo N°	Proteína [mg/ml]	Agente	
		precipitante [% v/v]	Glutaraldehído [% p/v]
1	-1	0	1
2	-1	1	-1
3	0	1	1
4	1	-1	-1
5	0	-1	1
6	-1	-1	0
7	1	-1	1
8	1	-1	0
9	-1	-1	1
10	1	0	0
11	1	1	1
12	-1	1	1
13	1	1	0
14	1	1	-1
15	-1	0	0
16	1	0	-1
17	-1	-1	-1
18	1	0	1
19	0	0	1
20	0	0	-1
21	0	1	-1
22	-1	1	0
23	-1	0	-1
24	0	-1	0
25	0	-1	-1
26	0	1	0
27	0	0	0

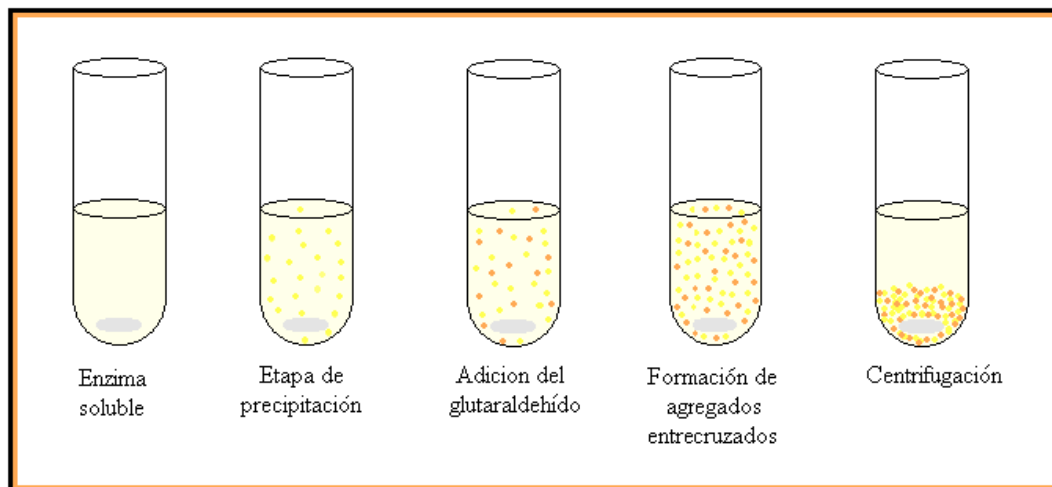


Fig. 10. Proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de alfa amilasa [3, 36].

Las etapas involucradas son:

- a. Precipitación: Se adicionó 0,3ml de enzima soluble a un tubo de ensayo, posteriormente se agregó 3ml del agente precipitante (propanol) y se dejó en agitación muy suave pero siempre constante durante un periodo de tiempo de 1 hora, asegurado que la temperatura de la reacción fuera de 4°C.
- b. Entrecruzamiento: Se adicionó el agente bi-funcional glutaraldehído sobre la enzima previamente agregada. Se mantuvieron las mismas condiciones de agitación y temperatura, con un período de entrecruzamiento de 3 horas.
- c. Medida de Actividad: Se tomó una alícuota del sobrenadante que contenía el CLEA formado y enzima que aún estaba libre, a la cual se le midió la actividad tal como se describe en la sección 3.3.
- d. Cálculo de proteína en el CLEA y medida de la actividad del sobrenadante: La solución que contenía el CLEA y la enzima libre fue centrifugada por 10min, esto con el fin de separar el CLEA de la enzima

soluble que no alcanzó a reaccionar con el glutaraldehído. Del sobrenadante se extrajo un volumen y se hizo la medida de actividad como se describe en la sección 3.3.

La proteína del CLEA, se midió como se describe en la sección 3.1, tomando una alícuota del sobrenadante previamente centrifugado.

La actividad catalítica del CLEA se calculó tomando el valor de actividad volumétrica obtenida en el paso c multiplicada por el volumen de enzima, menos la actividad volumétrica registrada en el paso d por el volumen de enzima, de tal forma que se obtuvo el valor de las unidades presentes en el CLEA, sobre la diferencia de proteína presente en el sobrenadante antes y después de centrifugar [36].

En la ecuación 5 se ilustra el cálculo para la actividad específica del CLEA.

Ecuación 5.

$$\text{Actividad Específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Act. Vol.} \left(\frac{U}{ml} \right) * V_{enzima} (ml)}{mg} - \frac{\text{Act. Vol.} \left(\frac{U}{ml} \right) * V_{enzima} (ml)}{mg}$$

3.5 Análisis estadístico de los resultados para los CLEAs

Para evaluar la influencia de las variables en el proceso de elaboración de CLEAs de alfa-amilasa, se hizo un análisis de varianza ANOVA, técnica estadística de contraste de hipótesis donde se comparan la media al cuadrado contra una estimación del error experimental, para esto se empleó el programa computacional de análisis estadístico STATGRAPHICS plus 5.1.

3.6 Elaboración de entrecruzados enzimáticos CLEs

Para la insolubilización de la enzima por medio de la técnica CLEs se hizo un diseño de experimentos multifactorial multinivel 3³ empleando las mismas

condiciones utilizadas en la elaboración de CLEAs, pero en este caso no se realizó precipitación previa al entrecruzamiento, de tal forma que en la matriz esta variable fue reemplazada por el tiempo de entrecruzamiento como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Variables seleccionadas en el proceso de elaboración de CLEs

Variable	Nivel bajo -1	Nivel medio 0	Nivel alto 1
Concentración de Proteína [mg/mL]	9	12	15
Concentración de glutaraldehído [%p/v]	0,5	1,0	1,5
Tiempo de entrecruzamiento (horas)	4	8	12

3.7 Análisis estadístico de los resultados para los CLEs

A los resultados de la matriz obtenida se le realizó el mismo análisis estadístico descrito en la sección 3.4.

3.8 Determinación de los factores que afectan la actividad y estabilidad de la alfa amilasa

Se evaluaron los parámetros de mayor influencia en la actividad de la enzima, como son pH, temperatura, concentración de sustrato; con el objetivo de realizar los ensayos bajo las mejores condiciones de trabajo de la enzima. Esto se realizó para la enzima soluble como insolubilizada.

3.8.1 pH

La influencia del pH sobre la actividad de la alfa amilasa se determinó incubando el preparado enzimático en un rango de pH 3.0-7.0 y se evaluó la actividad enzimática como se describió en la sección 3.3 para cada uno de los valores.

3.8.2 Temperatura

Se evaluó la actividad de la enzima como se indica en la sección 3.3, realizando el ensayo a diferentes temperaturas en un rango de 35-60°C, donde se observó la máxima eficiencia catalítica de la alfa amilasa.

3.8.3 Determinación de los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$ para la alfa-amilasa

Para evaluar estos parámetros se planteó un modelo cinético de Michaelis-Menten. Para determinar las constantes cinéticas se dejó constante la concentración de enzima y se varió la concentración de almidón soluble (0,5- 50 mg/ml). Para cada valor de concentración de sustrato se determinó la actividad catalítica.

3.8.4 Estabilidad térmica para alfa-amilasa

Se incubó la enzima en un rango de temperatura de 45-60°C en un baño de agua termostataado por periodos de tiempo hasta 2 horas. Para observar como varía la actividad catalítica de la enzima por efecto de la temperatura, se tomaron alícuotas cada cierto período de tiempo y se evaluó la actividad catalítica sobre la hidrólisis del almidón como se describe en la sección 3.3.

Con los datos obtenidos se determinaron las constantes de inactivación para cada temperatura.

3.9 Comparación de la actividad catalítica de la enzima soluble y la entrecruzada (CLE)

Se evaluó la actividad catalítica sobre la hidrólisis del almidón con respecto al tiempo, tanto para la enzima soluble como el CLE bajo las mismas condiciones de temperatura, concentración de sustrato y agitación y asegurando que las unidades totales de enzima para realizar el ensayo fueran iguales y así fuera posible comparar el funcionamiento de ambas enzimas en la hidrólisis de almidón en las condiciones óptimas de pH y T de reacción de cada preparación enzimática. La medida de actividad se hizo como se describe en la sección 3.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Influencia del cofactor Ca^{2+} en la actividad de la enzima

Los resultados de estas experiencias se muestran en la Tabla 6 y la Figura 11.

Con los resultados de los ensayos se observó un efecto positivo sobre la actividad específica de la alfa amilasa, estando presente el ión Ca^{2+} en el medio de reacción.

Se ha sugerido que el papel de los iones Ca^{2+} es principalmente estructural ya que este se ubica en medio de dos de los dominios catalíticos de la enzima, de tal forma que el ión queda haciendo puente iónico estabilizando la hendidura del sitio activo ^[11, 25].

Tabla 6: Efecto del pH sobre la actividad enzimática de alfa amilasa en presencia y ausencia de ion Ca^{2+}

pH	% Actividad Relativa (N.P Ca^{2+})	% Actividad Relativa (con Ca^{2+})
3	4	6
4	10	20
4.7	50	100
5	26	52
6	9	20
7	7.5	18

El 100% de actividad relativa corresponde a 535 U/mg.

El estudio comparativo, entre la enzima comercial en presencia y ausencia del ión Ca^{2+} , indica que dicha modificación genera cambios importantes en las propiedades funcionales de la enzima, incluyendo una mayor actividad y termoestabilidad ^[25]. Este efecto se debe a que el sitio de unión del Ca^{2+} está en la

interface entre los dominios A y B [24, 25]. Se ha establecido que dicha interface contiene alta densidad de carga negativa por la presencia de los grupos carboxilos de aminoácidos ubicados en esta zona, lo que genera fuerzas de repulsión, perturbando la participación de los dos dominios juntos en el momento de la catálisis, en consecuencia a esto, el papel que desempeña el ión Ca^{2+} , es neutralizar dichas fuerzas destructivas ya que tiene la habilidad por su estructura química de unir los dos dominios permitiendo que se lleve a cabo la reacción y por ende mejore la actividad de la enzima [25].

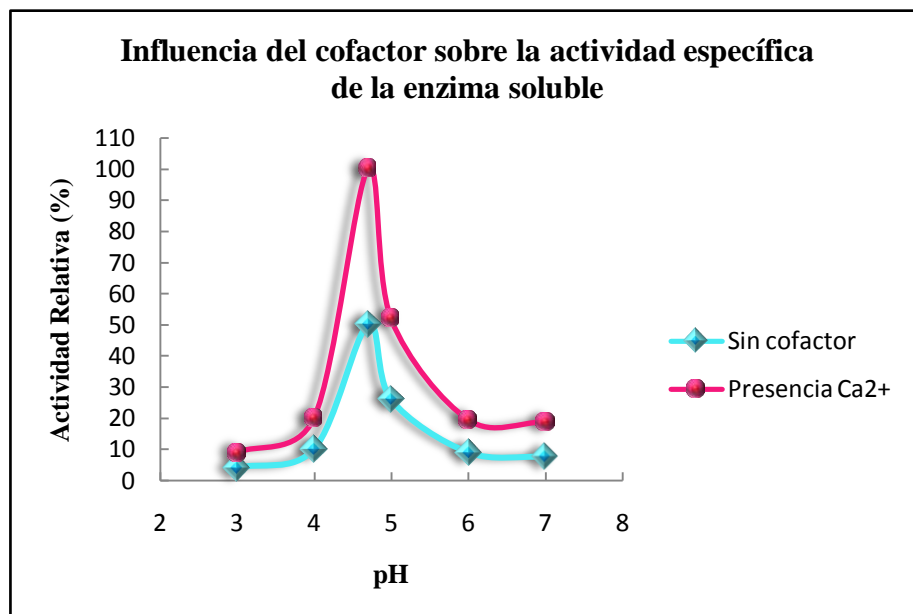


Fig. 11. Influencia del ión Ca^{2+} en la actividad de la alfa amilasa *A.niger* soluble.

Entre las concentraciones evaluadas del ión Ca^{2+} (0.01-0.05% p/v), se determinó que la concentración que dio mejores resultados fue de 0.01% p/v adicionado al medio de reacción.

4.2 Agregados entrecruzados de alfa amilasa empleando propanol como agente precipitante

De acuerdo con la metodología descrita en la sección 3.4 se obtuvo los resultados mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7: Resultados del diseño experimental, usando propanol como agente precipitante. Actividad de la enzima soluble a pH 4.7 es de 535 U/mg.

Ensayo N°	Proteína [mg/ml]	Agente		Actividad Específica (U/mg)
		precipitante [%v/v]	Glutaraldehído [%p/v]	
1	-1	0	1	0,03
2	-1	1	-1	4,23
3	0	1	1	0,95
4	1	-1	-1	4,28
5	0	-1	1	16,31
6	-1	-1	0	10,49
7	1	-1	1	9,09
8	1	-1	0	0,21
9	-1	-1	1	2,40
10	1	0	0	1,73
11	1	1	1	0,67
12	-1	1	1	6,98
13	1	1	0	1,91
14	1	1	-1	1,15
15	-1	0	0	3,05
16	1	0	-1	0,01
17	-1	-1	-1	18,11
18	1	0	1	1,20
19	0	0	1	3,40
20	0	0	-1	0,02
21	0	1	-1	5,20
22	-1	1	0	4,09
23	-1	0	-1	5,19
24	0	-1	0	18,54
25	0	-1	-1	16,06
26	0	1	0	1,66
27	0	0	0	0,01

La técnica de CLEAs mostró un drástico descenso de actividad catalítica de aproximadamente 90% en comparación con el valor obtenido para la enzima en su forma soluble cuyo valor de actividad fue de 535 U/mg.

Inmovilizar la enzima por medio de técnicas donde se involucra fuerzas intermoleculares puede causar pérdida en la actividad, esencialmente por la forma de aglomeración cuando es sometida a un proceso de precipitación. Dichos conglomerados pueden ser en forma de bolas o clusters dificultando el acceso del sustrato al sitio activo, conllevando a una pérdida de actividad del biocatalizador por problemas difusionales, impedimento estérico o de transferencia de masa ^[3, 35]. Es necesario resaltar que estos inconvenientes se presentan con mayor frecuencia cuando se utiliza como sustrato moléculas de tamaño muy grande como es el caso del almidón de yuca ^[3, 43].

Otra posible explicación puede estar en la nueva conformación que toma la enzima en el proceso de entrecruzamiento, debido a la rigidez que adquiere al formar enlaces covalentes con el glutaraldehído. Dicho cambio en la configuración puede deberse a que se produce una unión al azar entre los residuos aminoacídicos de la proteína con los grupos aldehído del agente bifuncional. De esta forma, no se puede garantizar que los aminoácidos que intervienen en la catálisis no cambien su estado, por ejemplo, de protonación. Asimismo, es posible que se den cambios en la conformación de la estructura 3D de la proteína debido a la modificación de residuos vecinos por efecto de los enlaces covalentes formados, de manera que estas modificaciones pueden causar cambios en la expresión de actividad de la enzima ^[3, 35].

La rigidez que garantiza el entrecruzamiento proteico es otro factor que hace que la molécula de almidón no sea tan accesible a las moléculas proteicas presentes en el CLEA. Al ser tan voluminosa la molécula de almidón es posible que no ingrese a las moléculas de CLEA que están en el interior del aglomerado, lo que provoca

que no se pueda registrar catálisis, con la consecuente pérdida en la actividad enzimática expresada por el CLEA ^[36, 22].

El utilizar solventes orgánicos como el propanol para la precipitación, seguramente generó un fuerte impacto sobre la actividad catalítica de la alfa amilasa, debido a que en la estructura de la enzima se encuentran aminoácidos hidrofóbicos plegados hacia adentro de la molécula y aminoácidos hidrofílicos que se encuentran rodeando la superficie externa de las proteínas. De esta forma, al poner en contacto la enzima con un agente que es capaz, por sus características polares, de competir con dichos residuos hidrofílicos por las moléculas de agua que forman el microambiente acuoso de la enzima, se promueve el desplazamiento de estos residuos ocasionando distorsión o cambio conformacional ^[20]. Esto genera pérdida de actividad catalítica por alteraciones en el estado de hidratación de la enzima, que es el que finalmente permite que la enzima tenga cierta flexibilidad para tomar la conformación más adecuada para la catálisis, por ende si el microambiente es afectado no se lleva a cabo dicho proceso ^[38, 44].

Por el descenso de actividad registrado para la alfa-amilasa inmovilizada, se puede establecer que las interacciones agua-solvente pudieron afectar el estado de hidratación de la enzima ocasionando desnaturalización casi completa de la conformación nativa de la alfa amilasa ^[3, 43].

Con los datos obtenidos del diseño de experimentos, se realizó un análisis de varianza ANOVA con el fin de determinar la significancia estadística de cada una de las variables en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

El análisis ANOVA divide la variabilidad de actividad específica en distintos segmentos para cada uno de los efectos. Después prueba la significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación

del error experimental. Observando la Tabla 8, dos de los efectos tienen valores de P inferiores a 0,05 indicando que son significativamente diferentes de cero al 95% del nivel de confianza.

Con dicha información se determinó que la concentración de agente precipitante y la interacción solvente-solvente fueron las variables de mayor influencia en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados obteniéndose un valor de $P=0,0011$ y $P=0,0068$ respectivamente.

El gráfico de Pareto, expuesto en la Figura 12, muestra cada uno de los efectos estimados de las variables y sus interacciones en orden decreciente de magnitud sobre la actividad específica de los CLEAs.

La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, que es el efecto estimado dividido entre el error estándar. La línea vertical permite determinar qué efectos son estadísticamente significativos.

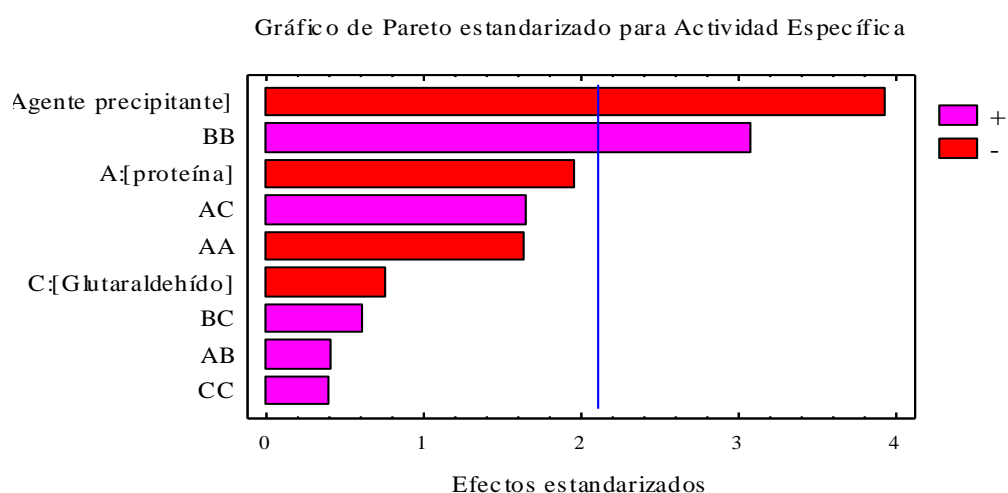


Fig. 12. Diagrama de Pareto para cada variable evaluada en el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados de enzima.

Tabla 8: Análisis de varianza para la actividad específica

Estimación de los efectos significativos en la elaboración de agregados entrecruzados de alfa-amilasa.

Variable	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	P-valor
A	65,4368	1	0,0658
B	261,518	1	0,0011
C	9,70936	1	0,4592
AA	45,1919	1	0,1207
AB	2,85188	1	0,6866
AC	46,5708	1	0,1155
BB	160,201	1	0,0068
BC	6,26407	1	0,5510
CC	2,65779	1	0,6969
Error total	287,804	17	

R-cuadrado = 67,6%

R-cuadrado (ajustado para G.L.) = 50,4%

Error Estándar = 4,1%

Error absoluto de la media = 2,6%

A: Concentración de proteína [mg/ml]

B: Concentración agente precipitante (propanol) [% v/v]

C: Concentración de glutaraldehído [% p/v]

Considerando el resultado obtenido del análisis estadístico, se confirma que la presencia del solvente orgánico en el medio de reacción afectó drásticamente la actividad de la enzima ^[38]. La selección del agente precipitante se dio luego de realizar un screening de diferentes agentes precipitantes previo a los ensayos de inmovilización, de donde se obtuvo que el propanol fue el agente precipitante más adecuado para la síntesis de los CLEAs. Se usaron en este estudio otros agentes tales como sulfato de amonio, 2-butanol, etanol, hexano, acetona, entre otros. El propanol arrojó los mejores resultados en cuanto a la agregación de proteína, lo que en principio representó una ventaja, ya que evitó el paso de adición de BSA (albúmina de suero bovino), que es un proteína inerte que permitiría contribuir con más residuos de lisina para que el entrecruzamiento fuera más efectivo, pero que seguramente impartiría mayores restricciones difusionales al proceso enzimático de hidrólisis de almidón ^[42].

En la Figura 13, se puede observar los efectos para la actividad catalítica de acuerdo al proceso.

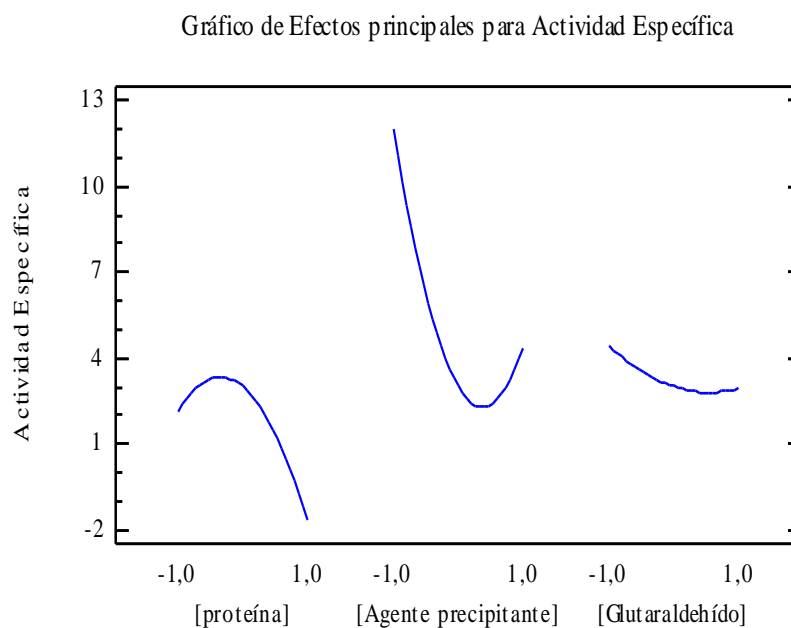


Fig. 13. Efectos principales para la actividad de la enzima.

Con este diagrama, se confirma la influencia del agente precipitante, observándose que para la optimización de la actividad específica, entre más negativo sea el valor de la concentración de propanol se garantizan valores más altos de respuesta, puesto que entre menos influencia tenga el solvente sobre las moléculas de agua de la enzima, la distorsión será menor y la enzima podrá expresar mejor su actividad catalítica. Sin embargo, esto puede afectar la cantidad de proteína precipitada.

Lo mismo ocurre con el glutaraldehído, al realizar la inmovilización a la concentración más baja de agente entrecruzante la actividad aumenta aunque no es muy marcado el cambio.

Con respecto a la concentración de proteína, es el valor medio con el que se obtienen mejores resultados, ya que aunque se garantiza un buen número de residuos de lisina que favorezcan al entrecruzamiento, se evitan problemas de impedimento estérico o restricciones difusionales que se dan cuando hay mucha proteína que se puede agregar de forma inadecuada ^[36].

En la Tabla 9 se registran los valores óptimos para cada una de las variables del proceso de elaboración de agregados entrecruzados obtenidos del programa STATGRAPHICS plus 5.1, con lo que se garantiza la optimización de la variable de respuesta.

Tabla 9: Valores óptimos para el proceso de elaboración de agregados entrecruzados de enzima

Variables	Valores óptimos
Concentración de proteína	9,613 mg/ml
Concentración de Propanol	50% v/v
Concentración de Glutaraldehído	0,5% p/v

La actividad específica máxima para la alfa-amilasa inmovilizada con los valores óptimos de ensayo es 16 U/mg de biocatalizador.

4.3 Entrecruzamiento de la alfa amilasa empleando glutaraldehído (CLEs)

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la segunda técnica de insolubilización de alfa amilasa empleada en este estudio. Los datos fueron obtenidos siguiendo la metodología descrita en la sección 3.6.

Los ensayos hechos para el diseño de experimentos se realizaron a pH 4.0. En la matriz la variable de respuesta fue la actividad específica, observando una disminución de actividad de aproximadamente un 23% con respecto a la enzima soluble a este mismo valor de pH. En estos experimentos la pérdida de actividad es pequeña con respecto a la que se obtuvo por la técnica de insolubilización por CLEAs, lo que confirma que el agente precipitante es el que principalmente interviene de forma desfavorable en la expresión de la actividad en el CLEA formado ^[38].

En el entrecruzamiento de enzima se puede presentar pérdida de actividad por la rigidez que proporciona a la misma las interacciones moleculares, especialmente de tipo covalente, que se da entre los residuos aminoácidos de la enzima con el glutaraldehído (formación de bases de Schiff) ^[19, 35], efecto que es adicional al provocado por la inhibición o inactivación de la enzima por el agente entrecruzante ^[34, 37].

De acuerdo con los datos obtenidos en la Tabla 10, se puede ver que hay mayor pérdida de actividad específica a medida que el tiempo de entrecruzamiento aumenta. Esto podría explicarse por el hecho de que cuando la enzima está por períodos de tiempo más prolongados con el glutaraldehído el efecto desnaturizante de este, tiene un efecto más significativo, además a esto se debe

considerar que el aglomerado tiene una alta probabilidad de formar estructuras donde se de mayor impedimento estérico ya que el entrecruzamiento se da al azar y también se debe considerar que el sustrato no tiene la capacidad de acceder al sitio activo por la rigidez adquirida; todos estos factores contribuyen a que el CLE no exprese altos valores de actividad catalítica ^[19, 33].

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es que el glutaraldehído trabaja de forma más eficiente a valores de pH neutros ^[3, 34]. Sin embargo, como la alfa amilasa se inmovilizó a pH 4.0, es otro factor que influye en el proceso.

Con los resultados obtenidos en el diseño experimental para el entrecruzamiento enzimático, se realizó un análisis de varianza ANOVA con el fin de determinar la significancia estadística de cada uno de los factores. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Observando la Tabla 11, solo uno de los efectos tiene valor de P inferior a 0,05 indicando que es significativamente diferente de cero al 95% del nivel de confianza.

De acuerdo con los datos el efecto que tuvo gran influencia en el proceso de entrecruzamiento fue el tiempo con un valor de $P = 0,0004$.

El gráfico de Pareto, Figura 14, muestra cada uno de los efectos estimados de las variables y sus interacciones en orden decreciente de magnitud sobre la actividad específica de los CLEs.

La línea vertical permitió establecer que el tiempo de entrecruzamiento fue el efecto estadísticamente significativo.

Tabla 10: Resultados del diseño experimental para el entrecruzamiento de enzima CLEs. Actividad de la enzima soluble a pH 4.0 es de 106 U/mg.

Ensayo N°	Proteína [mg/ml]	Glutaraldehído [%p/v]	Tiempo de entrecruzamiento (horas)	Actividad Específica (U/mg)
1	-1	0	1	28.6
2	-1	1	-1	138.6
3	0	1	1	14.5
4	1	-1	-1	83.6
5	0	-1	1	27.3
6	-1	-1	0	17.6
7	1	-1	1	44.1
8	1	-1	0	22.7
9	-1	-1	1	15.6
10	1	0	0	30.9
11	1	1	1	15.1
12	-1	1	1	20.8
13	1	1	0	10.3
14	1	1	-1	98.0
15	-1	0	0	103.5
16	1	0	-1	60.5
17	-1	-1	-1	80.0
18	1	0	1	15.1
19	0	0	1	25.9
20	0	0	-1	39.5
21	0	1	-1	35.4
22	-1	1	0	72.2
23	-1	0	-1	72.2
24	0	-1	0	32.7
25	0	-1	-1	94.0
26	0	1	0	23.2
27	0	0	0	88.6

Tabla 11: Análisis de varianza para la actividad específica
 Estimación de los efectos significativos en el entrecruzamiento de enzima

Variable	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	P-valor
A	2418.83	1	0.1014
B	142.242	1	0.6798
C	15894.9	1	0.0004
AA	300.381	1	0.5498
AB	924.885	1	0.2992
AC	27.331	1	0.8561
BB	284.373	1	0.5605
BC	9.95541	1	0.9128
CC	79.8134	1	0.7569
Error total	13712.7	17	

R-cuadrado = 59.4%

R-cuadrado (ajustado para G.L.) = 37.9%

Error Estándar = 28.4%

Error absoluto de la media = 18%

A: Concentración de proteína [mg/ml]

B: Concentración glutaraldehído [%p/v]

C: Tiempo de entrecruzamiento (horas)

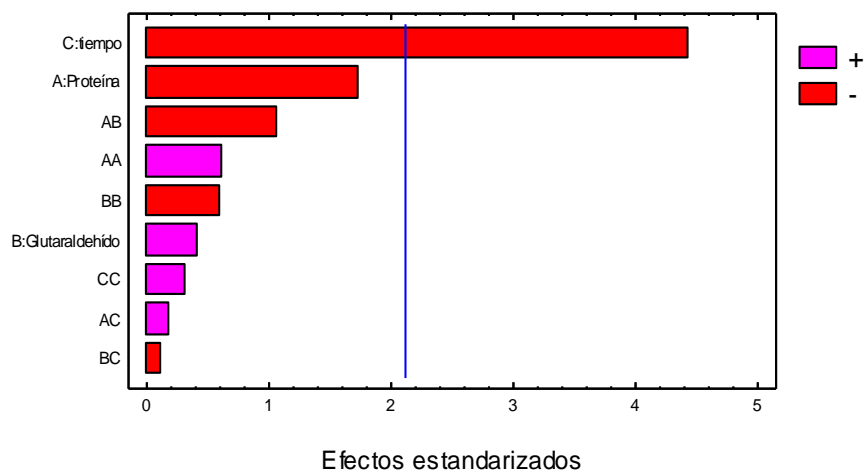


Fig. 14. Diagrama de Pareto para cada variable evaluada en el proceso de entrecruzamiento proteico.

Teniendo en cuenta el signo negativo que se presenta en el diagrama de Pareto se establece que entre menor sea dicho valor y sea incluido al modelo estadístico se logra maximizar la actividad catalítica para el proceso de entrecruzamiento proteico con glutaraldehído.

En la Figura 15 se observa la influencia de cada una de las variables en el proceso de entrecruzamiento en respuesta a la actividad catalítica.

De acuerdo con el gráfico de efectos principales se establece que la concentración de proteína debe ser de 9 mg/ml, 0,9 % p/v de glutaraldehído y un tiempo de entrecruzamiento de 4 horas; con lo que se establece que entre más cercanos estén los valores del ensayo a las condiciones mencionadas se obtiene valores más altos de actividad catalítica para el CLE elaborado.

Estos resultados evidencian los posibles impedimentos estéricos que se dan en el proceso de elaboración del CLE por altas concentraciones de proteína y el efecto

desnaturalizante del glutaraldehído en tiempos largos de reacción, dando como resultado descenso en la actividad catalítica ^[34, 35].

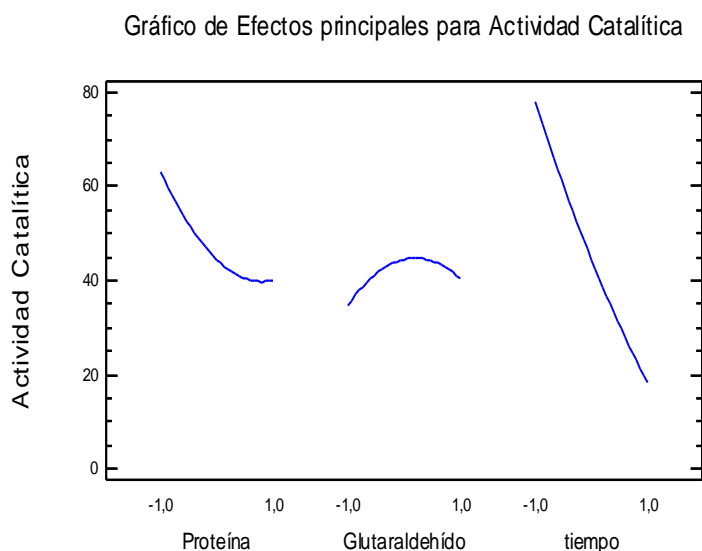


Fig.15. Efectos principales para la actividad de la enzima

En la Tabla 12, se registran los valores óptimos para cada una de las variables del proceso de entrecruzamiento de proteína obtenidos del programa STATGRAPHICS plus 5.1, asegurando la maximización de la actividad específica.

Tabla 12: Valores óptimos para el proceso de entrecruzamiento de la alfa amilasa

Variables	Valores óptimos
Concentración de proteína	9 mg/ml
Concentración de Glutaraldehído	0.9 %p/v
Tiempo de entrecruzamiento	4 horas

La actividad específica máxima para la alfa-amilasa inmovilizada con los valores óptimos de ensayo es de 89 U/mg.

4.4 Factores que afectan la actividad catalítica y la estabilidad de la alfa amilasa soluble e insolubilizada por medio de CLEAs y CLEs

Después de establecer las mejores condiciones para la enzima soluble, se evaluaron las condiciones de reacción para la enzima inmovilizada tanto por la técnica de elaboración de agregados entrecruzados de enzima (CLEA) como por la técnica de entrecruzamiento de proteína (CLE). Esto se realizó con el fin de poder comparar las diferentes técnicas de inmovilización sobre las propiedades cinéticas de actividad y estabilidad de la alfa-amilasa de *A.niger*.

4.4.1 Efecto del pH

Se llevó a cabo la determinación de la actividad catalítica de la enzima soluble e inmovilizada a diferentes valores de pH. Estas experiencias se hicieron de acuerdo con la metodología descrita en la sección 3.8.1.

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

Se pudo establecer el valor pH en que la enzima expresa su máxima actividad, tanto para la forma soluble como entrecruzada, observando que efectivamente el proceso de entrecruzamiento induce cambio en la configuración de la estructura nativa, ya sea por desnaturalización o por cambios conformacionales. Este efecto se da principalmente por la capacidad que poseen los iones H^+ para alterar las cargas eléctricas de los grupos polarizados que posee la enzima, lo cual modifica el comportamiento de los aminoácidos presentes en el sitio activo por variación en su estado de ionización ^[3, 43].

De acuerdo con la Tabla 13, se observa que no se pudo detectar actividad enzimática en algunos CLEAs a valores de pH ácidos (en las condiciones de reacción usadas). Esto implica, que además de la influencia que ejerce el pH, la desnaturalización que se presentó al inmovilizar por medio de esta técnica dejó completamente inactiva la enzima en dichos valores de pH.

Para las preparaciones enzimáticas obtenidas por la técnica de entrecruzamiento de enzima (CLE), se observa que hay corrimiento del pH óptimo a valores de pH 4.0. Este efecto podría deberse a las alteraciones de los aminoácidos que componen la estructura de la proteínas al estar en contacto con el glutaraldehído, lo que implica pérdida de configuración de la enzima por la rigidez adquirida y la falta de flexibilidad en el proceso de entrecruzamiento. Estas modificaciones químico-estructurales alterarían las interacciones electrostáticas necesarias para la conservación de la estructura terciaria ^[9, 27, 51]. Aunque se presentó disminución en la actividad catalítica, se obtuvo un comportamiento de campana característico para el efecto del pH sobre las enzimas ^[21, 27].

Tabla 13: Valores de actividad específica para la alfa amilasa bajo diferentes condiciones de pH

pH	% Actividad Relativa		
	Enzima soluble	CLEA	CLE
3	6	—	20.5
4	20	—	100
4.7	100	100	49.6
5	52	15	29.3
6	19.5	3	22.1
7	18.7	—	18.5

Donde el 100% de actividad relativa para cada uno de los casos es:

- Actividad específica para la enzima soluble a pH 4.7 es de 535 U/mg.
- Actividad específica para la enzima entrecruzada por medio de la técnica CLE a pH 4.0 es de 89 U/mg.
- Actividad específica para la enzima inmovilizada por medio de la técnica CLEA a pH 4.7 es de 16 U/mg.

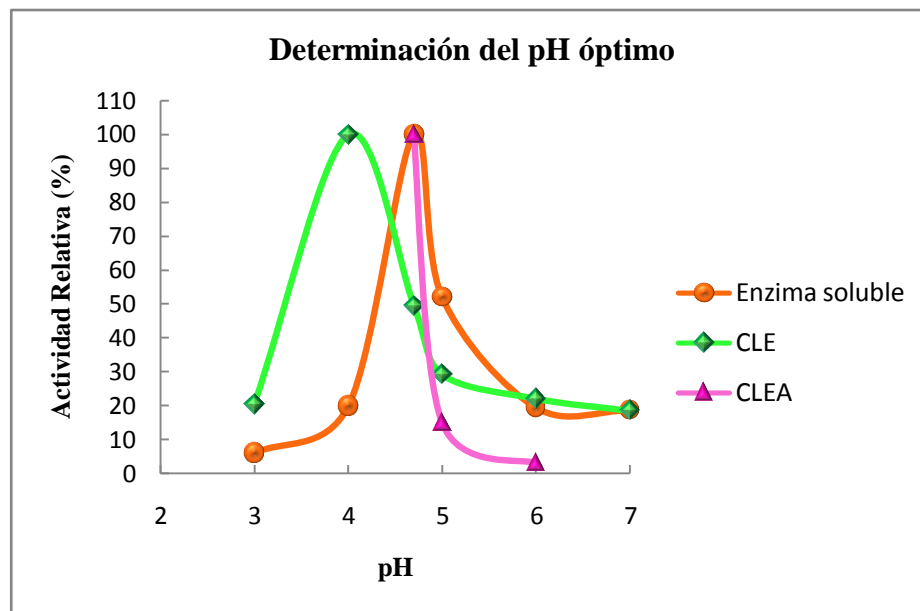


Fig.16. Efecto del pH sobre la actividad de la alfa-amilasa *A.niger* soluble e inmovilizada por medio de las técnicas CLEA y CLE.

Después de conocer el mejor valor de pH sobre el cual trabaja la enzima, se realizó un ensayo para determinar que tan estable es, considerando el efecto del pH.

En la Figura 17 se muestra los resultados obtenidos para la enzima soluble y entrecruzada. No se realizó este ensayo para el CLEA debido a que presentaba una actividad enzimática muy baja con respecto a la soluble y los CLEs.

Los resultados permiten establecer que la enzima soluble es más estable con respecto al pH que la enzima inmovilizada. No obstante, es válido suponer que dicha estabilidad también pudo estar influenciada por la agitación que se mantuvo

constante durante el ensayo, lo cual pudo influir desfavorablemente sobre la actividad enzimática de los CLEs por su estructura rígida; además a esto, la posible desnaturalización ocasionada por el tiempo de exposición de la enzima al glutaraldehído [34].

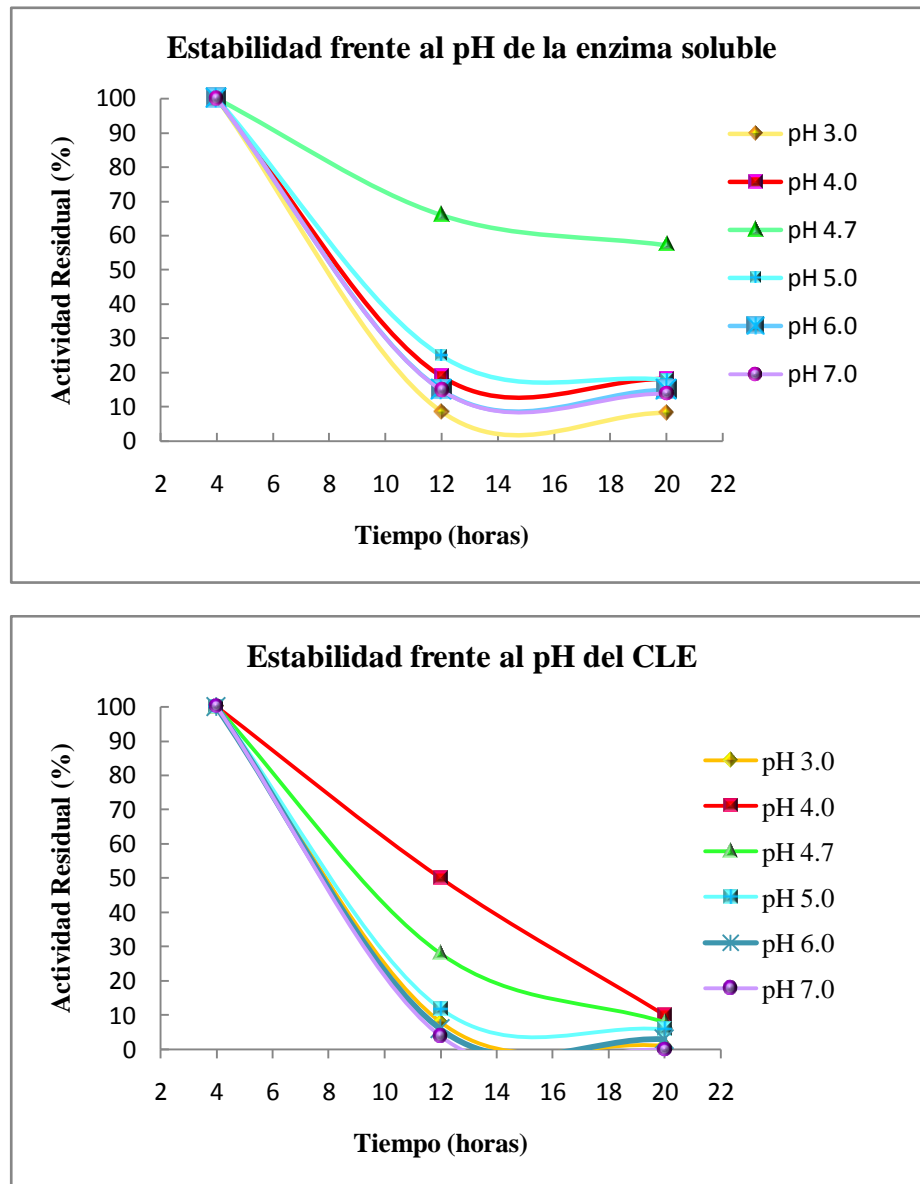


Fig.17. Efecto del pH sobre la estabilidad de la alfa-amilasa de *A.niger* soluble y entrecruzada (CLE).

En la Tabla 14 se muestran las constantes de inactivación por efecto del pH.

De acuerdo con los datos de las constantes de inactivación, el efecto del pH para el CLE en todo el rango de pH es más desfavorable que para la enzima soluble, es por esto que el valor de las constantes es mayor en todos los valores de pH.

Tabla 14: Constantes de inactivación de la enzima soluble y entrecruzada (CLE) por efecto del pH

pH	Enzima soluble k_i (min^{-1})	CLE k_i (min^{-1})
3.0	0.048	0.188
4.0	0.031	0.081
4.7	0.006	0.113
5.0	0.020	0.161
6.0	0.018	0.125
7.0	0.016	0.213

4.4.2 Efecto de la Temperatura

En la Tabla 15 y la Figura 18 se muestran los valores de actividad relativa y el comportamiento de las preparaciones de la enzima para cada una de las temperaturas evaluadas, tanto para la enzima soluble como para la inmovilizada (CLEAs y CLEs).

Determinar la temperatura óptima de trabajo para la enzima es importante debido a que se debe establecer el rango donde se expresa la máxima actividad y por ende bajo qué condiciones puede inactivarse.

Como se observa en la Tabla 15 la temperatura donde la enzima soluble expresa su máxima actividad es a 50°C mientras que el CLEA y el CLE lo hacen a 45°C,

dicho cambio puede estar inherente a la forma que adopta la enzima al estar entrecruzada ya que en dicha situación la labilidad de su estructura no es la misma comparada con la soluble [22,51].

Tabla 15: Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima soluble e inmovilizada.

Temperatura	Actividad Relativa (%)		
	Enzima soluble	CLEA	CLE
40°C	81	20	68,4
45°C	97	100	100
50°C	100	10	46.7
55°C	40	3	36
60°C	34.4	—	33.6

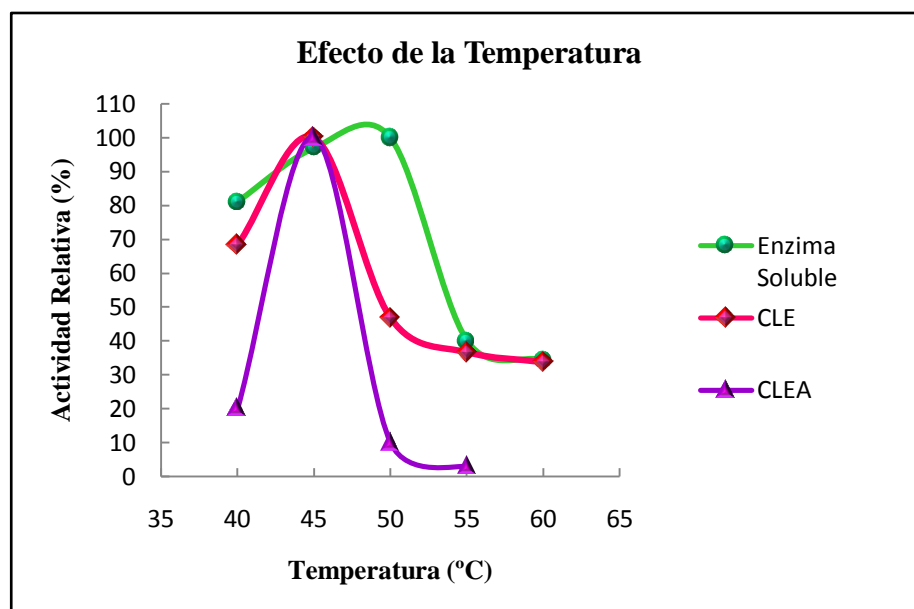


Fig.18. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las formas soluble e inmovilizada (CLEA y CLE) de la alfa-amilasa de *A.niger*.

La disminución en 5°C de la temperatura óptima, mostrado en las formas inmovilizadas constituye una ventaja cuando se requieren escalar los procesos de hidrólisis del almidón de yuca, ya que se puede ahorrar energía en el proceso y además al estar insoluble en el medio de reacción posibilita su separación y posterior reutilización.

4.4.3 Determinación de los parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para la enzima soluble e inmovilizada

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos evaluando la actividad de la enzima soluble e inmovilizada de acuerdo a lo descrito en la sección 3.8.3.

Las enzimas se comportaron de acuerdo con un modelo cinético simple de Michaelis-Menten ^[3, 21]. La ecuación para este modelo se representa por la forma funcional de una hipérbola rectangular y cuenta con dos parámetros: la velocidad máxima de reacción, $V_{m\acute{a}x}$, que tiene lugar a la concentración de saturación de sustrato, y K_M la constante de Michaelis, que tiene el valor de la concentración del sustrato a la mitad de la velocidad máxima de reacción ^[21].

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16.

Según los datos de la Tabla 16 al inmovilizar la enzima se pierde actividad, el descenso es mucho más marcado cuando se emplea la técnica de CLEAs; además observando los valores de actividad no se puede establecer un parámetro en común de concentración de almidón óptimo para las tres formas en que se encuentra la enzima debido a que la saturación por sustrato se da en cada caso a un valor diferente.

Por otra parte considerando que el sustrato es voluminoso la catálisis del mismo se dificulta por problemas de transferencia de masa. Por lo tanto, la hidrólisis del

almidón solo se va a dar por fracciones, debido a que no tiene acceso total al sitio catalítico. De esta manera, los gránulos de almidón no podrán ser hidrolizados uniformemente, sino por el contrario, la hidrólisis sería vía múltiples ataques (ver anexo 6) y por ende el rendimiento hidrolítico es mucho más bajo comparado con el de la enzima soluble donde no existen estos inconvenientes difusionales ^[33, 57].

Tabla 16: Valores de actividad específica para la enzima soluble e inmovilizada variando la concentración de almidón.

Concentración de almidón de yuca soluble (mg/ml)	Actividad Específica (U/mg)		
	Enzima soluble	CLEA	CLE
0,5	46,11	—	—
1,5	108,12	0,18	27,02
3	216,67	0,48	35,13
7	386,13	—	85,88
10	598,01	0,74	136,64
15	591,55	0,86	145,12
20	585,86	1,09	230,33
30	541,66	1,29	218,65
40	493,94	1,38	195,43
50	389,12	1,30	154,21

De los resultados obtenidos se pudo establecer las mejores condiciones de concentración de sustrato, donde la enzima presenta una máxima velocidad de transformación del almidón. Para la alfa amilasa soluble, el valor se encontró

alrededor de 10 mg/ml, para los CLEAs aproximadamente 40 mg/ml y para los CLEs 20 mg/ml. Los datos obtenidos para la enzima inmovilizada son parciales, debido a que no se puede asegurar que la cantidad de moléculas de sustrato que alcanzan a ingresar al sitio activo sean las que se reportan en dicha concentración, además, se debe considerar que el almidón es una cadena polimérica muy voluminosa lo cual dificulta aún más la entrada al sitio activo ^[33].

Estos factores influyen en que el valor de la actividad no sea confiable.

Los parámetros cinéticos se pueden determinar por medios gráficos. En la Tabla 17 se muestran los valores para dichos parámetros obtenidos del diagrama de Lineweaver-Burk o de dobles recíprocas, en el que se gráfica el inverso de la actividad específica vs el inverso de la concentración ^[21].

En las Figura 19, se muestra la representación de Lineweaver-Burk para la enzima soluble, el CLEA y el CLE respectivamente.

Tabla 17: Parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para la enzima soluble e inmovilizada.

Parámetro cinético	Enzima soluble	CLEA	CLE
K_M (mg/ml)	7,6	6.7	10,1
$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	588	1.27	204

De la Tabla 17 se puede apreciar diferencias significativas en los parámetros cinéticos de la enzima cuando está inmovilizada; esto indicaría que los cambios de las condiciones microambientales pueden condicionar las concentraciones de

sustratos, inhibidores o activadores, lo que puede llevar a cambios aparentes en las constantes cinéticas y las velocidades de reacción observadas ^[33].

Considerando el valor de la velocidad máxima de reacción para la enzima soluble se puede ver que el descenso presentado para la inmovilización, empleando la técnica de CLEA fue del 99% y para el CLE fue del 65%, lo que evidencia seguramente los problemas difusionales y de transferencia de masa, que conlleva el proceso de entrecruzamiento, además de la desnaturalización previa que se da por el solvente en la elaboración del CLEA ^[3, 43, 46].

La constante de Michaelis es una medida inversa de la afinidad de una enzima por el sustrato, lo que implica que cuanto más pequeño sea el valor de la K_M más alta será la afinidad que se tiene por el sustrato, es decir el complejo ES es muy fuerte y difícilmente se disociara sin llevarse a cabo la transformación ^[3, 32]; por lo tanto al observar los resultados, se tiene que la K_M para el CLEA disminuyó en un 12% con respecto a la enzima soluble, lo cual permite suponer que dicho valor es aparente debido a que la pérdida de actividad tan drástica que se obtuvo no puede justificar dicha afinidad; por ende se sospecha que solo las moléculas que están hacia la parte más externa del CLEA son las que logran interaccionar con el almidón, y se puede pensar que una gran cantidad de moléculas de enzima no alcanzan a realizar la catálisis porque no están en contacto con el almidón, lo que no ocurre cuando la enzima esta soluble debido a que todas las moléculas tiene igual oportunidad de interaccionar con el sustrato ^[3, 8].

Por ende al considerar la constante de Michaelis aparente para la enzima inmovilizada se dice que la enzima tiene mayor afinidad por el almidón cuando está en su forma soluble ya que en esta condición los cambios que se presentan en la estructura de la enzima se dan a medida que sucede la reacción, caso contrario en la inmovilización que ya previamente al proceso de catálisis se tiene cambios estructurales sobre las proteínas que pueden modificar los parámetros cinéticos ^[8, 9].

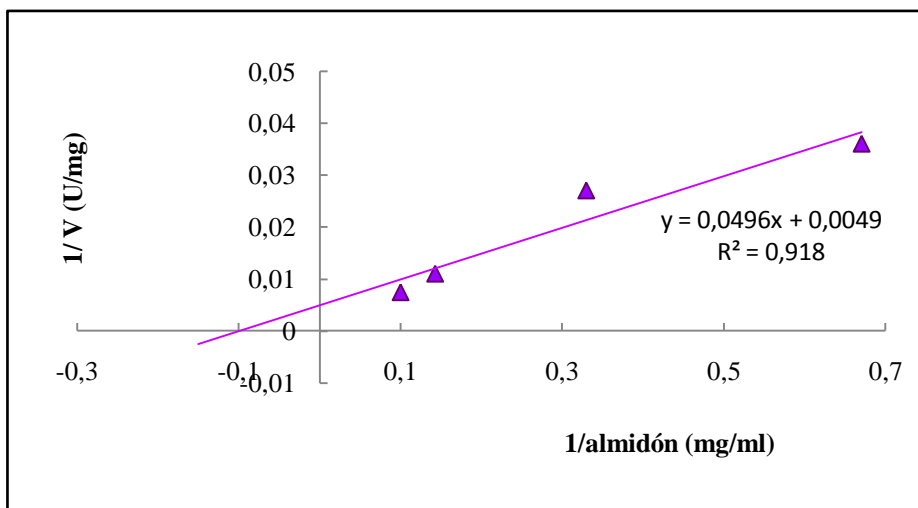
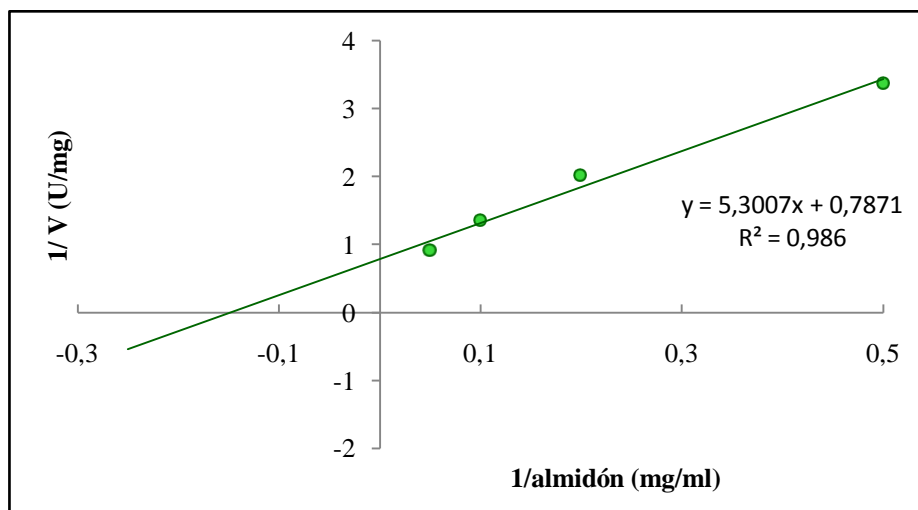
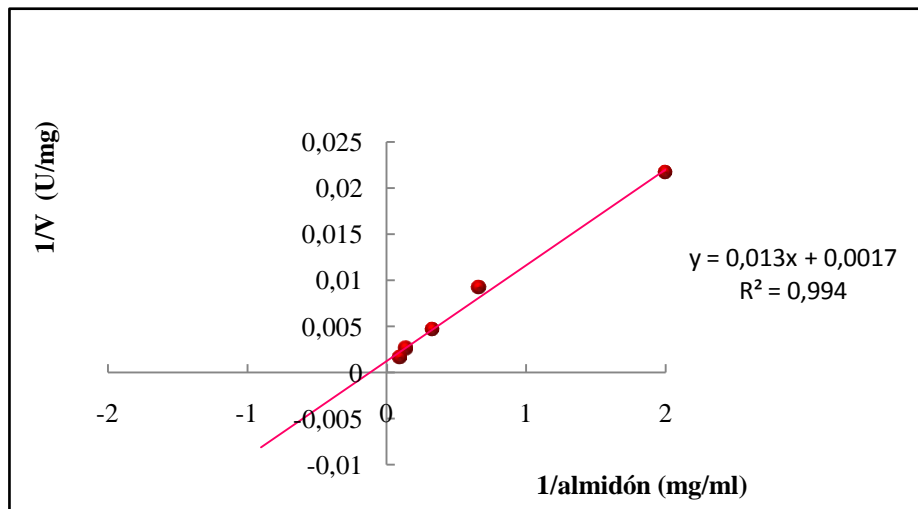


Fig. 19. Representación de Lineweaver-Burk para la alfa amilasa de *A.niger* en sus formas soluble, CLEA y CLE respectivamente.

4.4.4 Estabilidad térmica para la alfa amilasa soluble e inmovilizada

Se determinó el efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima realizando los ensayos como se describe en la sección 3.8.4.

La estabilidad es un parámetro muy importante al igual que la actividad catalítica, ya que es necesario conocer en que rango de temperatura la enzima mantiene su actividad catalítica y por cuanto período de tiempo mantiene su actividad catalítica de acuerdo a las condiciones del proceso ^[22].

Con los ensayos ya mencionados, se determinó que la inmovilización de la alfa amilasa por medio de la técnica de elaboración de agregados entrecruzados no produjo preparaciones activas de la enzimas, por esta razón no se evaluó su estabilidad.

En la Tabla 18 se muestran los valores de las constantes de inactivación para la enzima soluble y entrecruzada.

Tabla 18: Constantes de inactivación de la enzima soluble y entrecruzada (CLE)

Temperatura (°C)	Enzima soluble k_i (min⁻¹)	CLE k_i (min⁻¹)
45	0.048	0.006
50	0.072	0.027
55	0.127	0.083
60	0.256	0.988

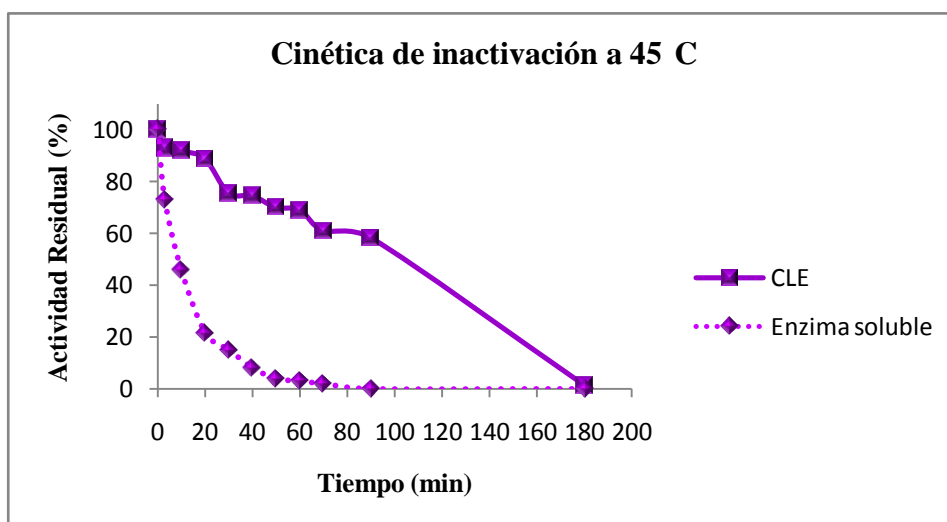
De la Tabla 18, puede verse que los valores para las constantes de inactivación son notablemente mayores para la enzima soluble que para entrecruzada, lo que

permite establecer que al entrecruzar la enzima aumenta su estabilidad con respecto a la forma soluble, debido a que aumenta la rigidez de la estructura de las proteínas ^[25], restringiendo los cambios conformacionales y la desnaturalización por efecto de la temperatura ^[32, 35].

En la Figura 20 se hace comparación entre la enzima entrecruzada y la enzima soluble frente a todas las temperaturas evaluadas.

Al observar el comportamiento de la enzima soluble frente al CLE, es posible considerar que la técnica de entrecruzamiento proteico es una alternativa de inmovilización para la alfa-amilasa, ya que aumenta su estabilidad cerca a un 25% en el rango de temperatura de 45-55°C ^[32].

A 60°C la inactivación es casi inmediata, el comportamiento es muy cercano entre sí debido a que a esta temperatura, para las dos formas en que se encuentra la enzima ya se ha distorsionado completamente la estructura terciaria ^[25, 28].



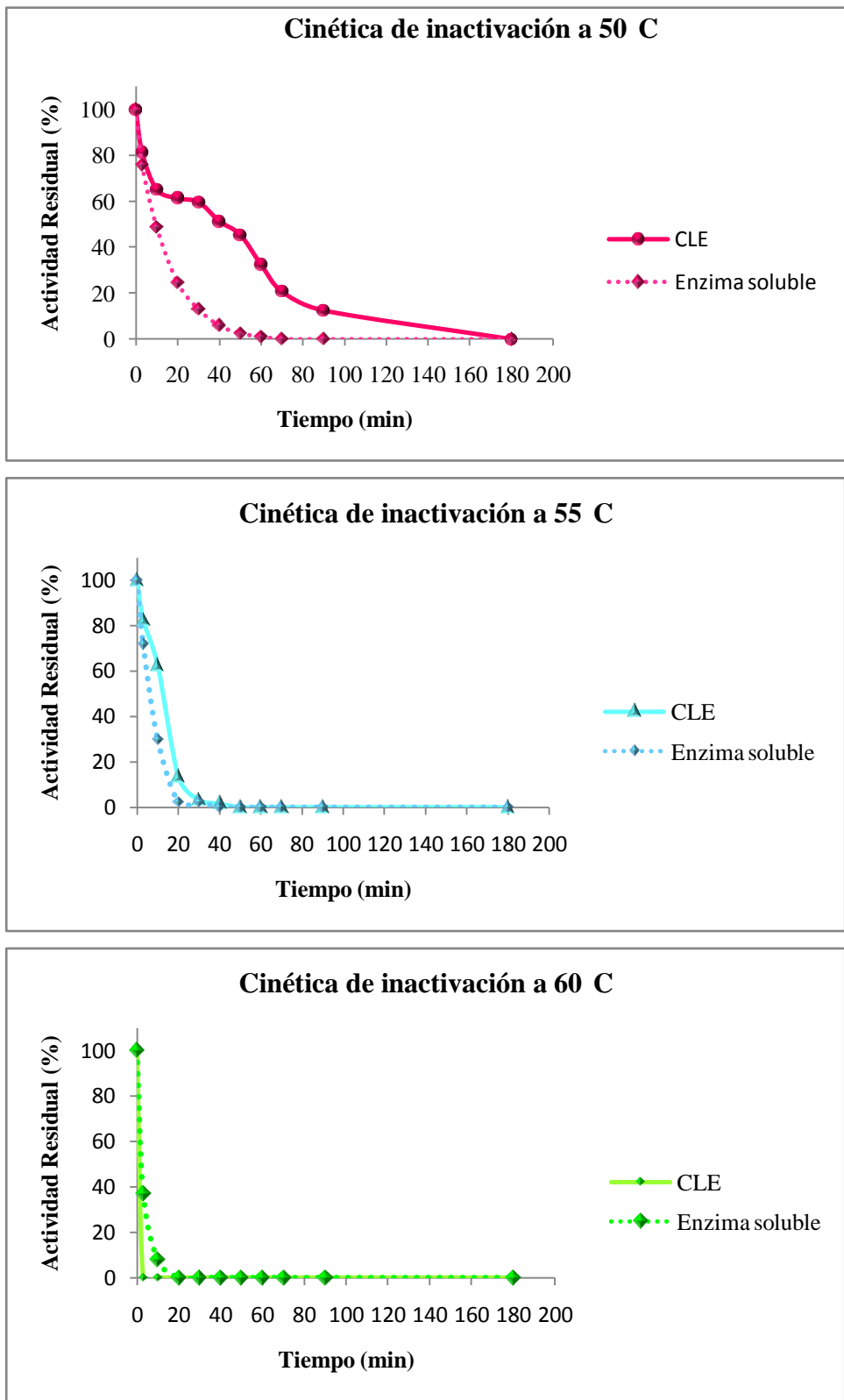


Fig. 20. Comparación de la cinética de inactivación para cada una de las temperaturas evaluadas tanto para la enzima soluble como entrecruzada.

4.4.5 Cinética de hidrólisis de almidón con las formas de la enzima soluble y el CLE

El ensayo fue hecho de acuerdo a lo indicado en la sección 3.9.

En esta experiencia se evaluó el funcionamiento de ambas preparaciones en la hidrólisis de almidón en condiciones de reacción de proceso.

De acuerdo con la Figura 21, se puede ver como el CLE supera a la enzima soluble en cuanto a estabilidad ya que aunque la enzima soluble catalice de forma más eficiente el sustrato, su periodo de acción es aproximadamente la mitad de lo que lo hace el CLE.

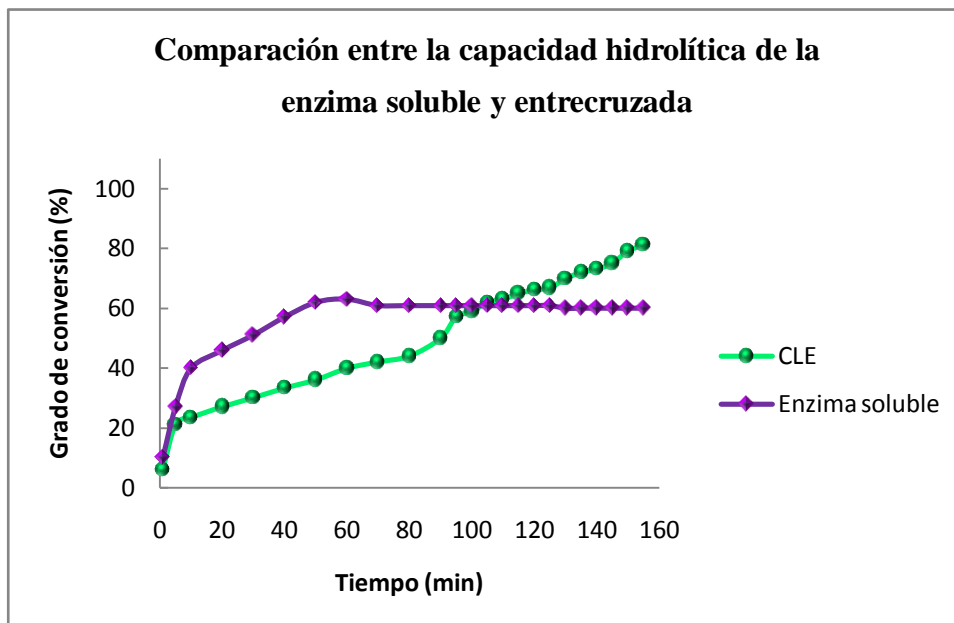


Fig. 21. Comparación entre la capacidad hidrolítica de la enzima soluble y entrecruzada (CLE). Condiciones de reacción: enzima soluble pH 4.7, CLE pH 4.0, temperatura 45°C, 150 rpm de agitación, sustrato (almidón) 10 mg/ml.

Con un 81% de conversión para una concentración 8,12 mg/ml de azúcares reductores obtenidos para el CLE.

En la gráfica se muestra que la enzima soluble tiene una catálisis activa durante aproximadamente 70 minutos con un porcentaje de conversión del 61% y de ahí en adelante pierde actividad hasta quedar completamente inactiva por efecto de la temperatura ^[8] o saturada por sustrato ^[9 47], mientras que el CLE pasadas 2 horas aún cataliza eficientemente el almidón con un porcentaje de conversión del 81%; se observó que a las condiciones del ensayo (tiempo) no mostró inactivación.

CONCLUSIONES

Se inmovilizó la enzima alfa amilasa proveniente del hongo *Aspergillus niger* por medio de dos técnicas: elaboración de agregados entrecruzados de enzima (CLEA) y entrecruzamiento proteico (CLE), lo que permitió hacer la comparación entre ellas y la enzima soluble.

Se establecieron las mejores condiciones de reacción tanto para la enzima soluble como inmovilizada por CLEAs y CLEs. La enzima soluble y el CLEA presentaron un pH óptimo de 4.7, mientras que para el CLE fue pH 4.0. Por otro lado, las preparaciones enzimáticas solubles e inmovilizadas alcanzaron, respectivamente, temperaturas óptimas de 50 y 45°C.

Se evaluó el efecto del cofactor Ca^{2+} en la actividad de la enzima soluble, obteniéndose un aumento en un factor de 2 de la actividad catalítica de la enzima con respecto a la enzima sin presencia del ion Ca^{2+} .

Los agregados enzimáticos entrecruzados de la enzima (CLEAs) alfa amilasa no fueron una alternativa efectiva para inmovilizar la enzima, ya disminuyeron drásticamente la actividad catalítica aproximadamente en un 90% en comparación con la enzima soluble. En consecuencia, es posible establecer que la inmovilización de la alfa amilasa desde ningún punto de vista es adecuada empleando esta técnica.

La combinación en niveles (-1, 0, 1) de las variables evaluadas en el diseño de experimentos permitió establecer, que el agente precipitante (propanol), fue el único factor que influyó significativamente y de forma negativa en el proceso de elaboración de agregados entrecruzados.

Para el análisis estadístico de los resultados de actividad obtenidos para la matriz se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.1 el cual arrojó los valores

óptimos para la elaboración del CLEA lo que garantizó la maximización en la actividad catalítica.

Se determinó que el valor de pH más adecuado para el CLEA no cambió con respecto a la enzima soluble, pero se observó que a valores inferiores de pH 4.7 y a pH 7.0 la actividad biocatalítica fue indetectable.

De acuerdo con los valores de los parámetros cinéticos, se produjo un marcado descenso en la velocidad máxima de catálisis aproximadamente para el CLEA de un 99%, y un valor aparente para la constante de Michaelis de 6,7 (mg/ml) con respecto a la enzima soluble que tuvo un valor de K_M de 7,6 (mg/ml).

En el caso del entrecruzamiento de enzimas (CLE), se determinó que el descenso de actividad fue aproximadamente del 23% con respecto a la enzima soluble, lo cual significó un gran cambio con efecto positivo frente a la inmovilización por medio de los CLEAs ya que con esta se perdió el 90% de su actividad. Además, se logró establecer que el CLE supera en estabilidad ya que conserva el 60% de su actividad residual por un período de 1 hora 30 minutos, lo que la enzima soluble logra mantener solo por 10 minutos a 45°C

Con los resultados obtenidos del diseño experimental, se estableció que la única variable que influyó en el proceso de elaboración de los CLE fue el tiempo de entrecruzamiento. Utilizando el Statgraphics Plus 5.1, se logró maximizar la actividad catalítica empleando los valores óptimos dados por el programa.

Se determinó que el valor óptimo de pH para el CLE varió frente al de la enzima soluble y el CLEA, indicando que el proceso de entrecruzamiento genera fuertes cambios en la estructura de la proteína y el estado de ionización de los aminoácidos presentes en el centro activo.

Se encontró que el CLE efectúa la catálisis a una temperatura menor de la que lo hace la enzima soluble, lo cual es una ventaja a nivel industrial ya que se reducen los costos energéticos del proceso de hidrólisis del almidón.

Con la estimación de los parámetros cinéticos para la enzima soluble como para el CLE, se evidenció que la velocidad de reacción disminuyó en un 65% y la constante de Michaelis aumentó en un 25% respecto a la enzima soluble, aunque dichos cambios pueden ser aparentes debido a que este proceso se genera cierta rigidez, con los correspondientes problemas de transferencia de masa y expresión de actividad hidrolítica.

La conversión del almidón a azúcares reductores fue mayor para la enzima soluble transcurridos 70 minutos con un grado de conversión del 61%, frente a un 42% para el CLE; pero después de este tiempo la enzima soluble mantuvo constante la concentración del producto, mientras que el CLE después de dos horas aún catalizó eficientemente el sustrato hasta un valor de un 81% de conversión.

RECOMENDACIONES

Insolubilizar la enzima soportándola sobre Eupergit C activado con grupos aminos y posteriormente utilizar la técnica de entrecruzamiento de proteína, evaluando el efecto que tenga dicha inmovilización sobre la actividad catalítica y la estabilidad ^[53]. Esta estrategia surge debido a que los CLEs no son reutilizables, ya que es muy difícil separarlos del medio de reacción. Por la tanto, si la alfa amilasa está soportada y sigue teniendo un mejor comportamiento de estabilidad con respecto a la enzima soluble en cuanto a estabilidad, ésta podría ser una estrategia adecuada para ser usada a nivel industrial.

Evaluar el efecto de la temperatura y la velocidad de reacción en la elaboración de agregados entrecruzados utilizando enzimas nativas, además considerar otros agentes precipitantes como sales iónicas entre ellas el sulfato de amonio ya que se considera que su efecto desnaturalizante no es tan fuerte como el de los solventes orgánicos ^[39].

Evaluar la conversión del almidón de yuca mediante sistemas co-inmovilizados de alfa-amilasa y glucoamilasa de forma simultánea, determinando su capacidad y aplicación sobre la hidrólisis del almidón; con esto se podrían superar los inconvenientes que se tienen con el tamaño del sustrato ya que el proceso de licuefacción y sacarificación se haría de forma continua ^[40].

ANEXO 1

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

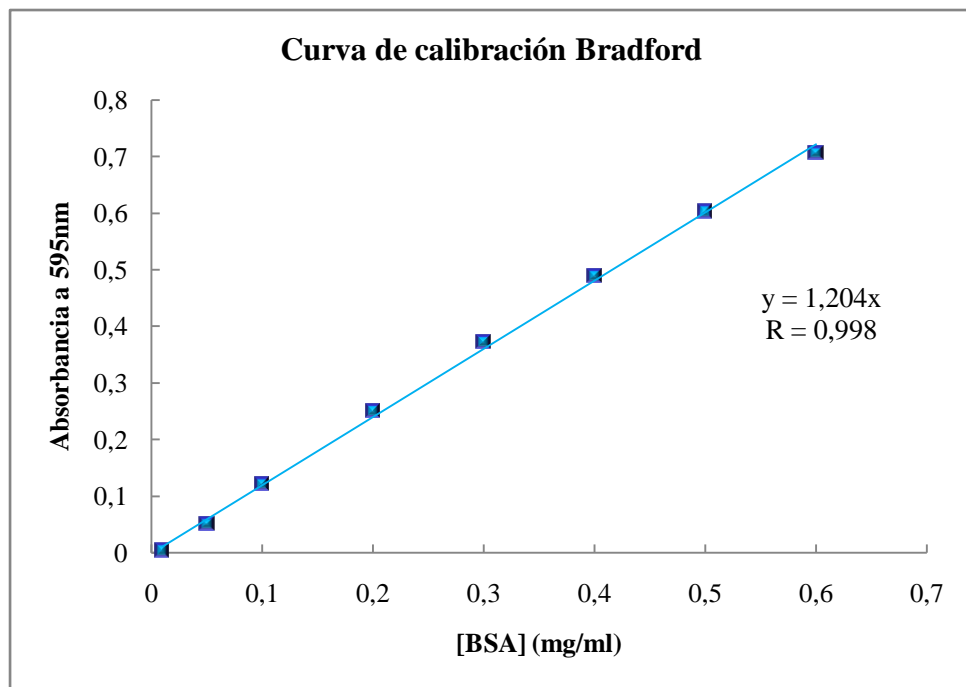


Fig. A 1: Curva de calibración para la determinación de proteínas utilizando el método de Bradford.

La concentración de proteína se calcula interpolando el valor de absorbancia obtenida en cada ensayo, a la ecuación derivada de la curva de calibración.

La ecuación es la siguiente:

$$[\text{Proteína}] = \frac{\text{absorbancia}}{1,204} * \text{factor de dilución}$$

ANEXO 2

Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores por medio del método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) a pH 4,7.

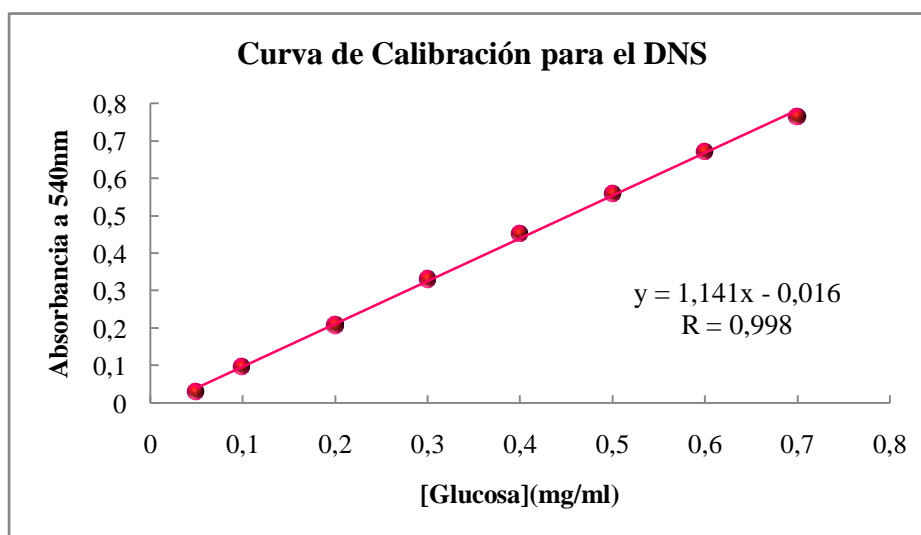


Fig. A 2: Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores empleando el método de DNS a pH 4.7.

La actividad catalítica de la enzima para cada ensayo fue determinada utilizando la pendiente de la curva de calibración para el método del DNS y la pendiente de la gráfica obtenida de acuerdo al valor de absorbancia registrado para cada caso.

La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\text{Actividad Volumétrica} = \frac{m}{1,141} * \frac{1 * 10^6}{180 * 10^3} * \frac{V_m}{V_e} * f_d$$

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

V_m : volumen de ensayo (ml)

V_e : volumen de enzima (ml)

f_d : factor de dilución

1,141 es la pendiente de la curva de calibración, tiene unidades de $(\text{mg/ml})^{-1}$.

Las unidades de la actividad volumétrica son (U/ml).

ANEXO 3

Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores por medio del método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) a pH 4,0.

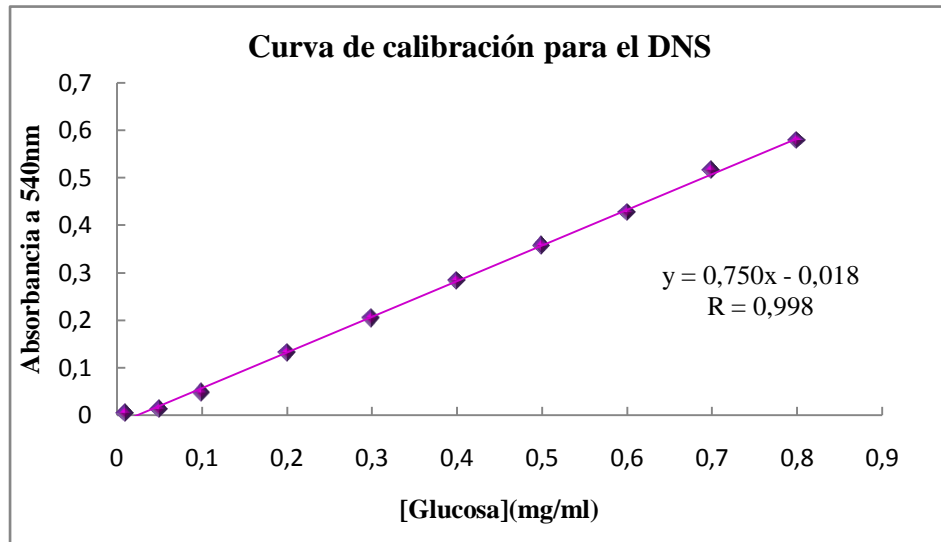


Fig. A 3: Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores empleando el método de DNS a pH 4.0.

La ecuación utilizada para calcular la actividad catalítica es la siguiente:

$$\text{Actividad Volumétrica} = \frac{m}{0,750} * \frac{1 * 10^6}{180 * 10^3} * \frac{V_m}{V_e} * f_d$$

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

V_m : volumen de ensayo (ml)

V_e : volumen de enzima (ml)

fd: factor de dilución

0,750 es la pendiente de la curva de calibración, tiene unidades de $(\text{mg/ml})^{-1}$.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\text{Actividad volumétrica}}{\text{concentración de proteína}}$$

Las unidades de la actividad específica son (U/mg).

ANEXO 4

El cálculo de los parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$ se realizó mediante el modelo de Lineweaver-Burk.

De la recta obtenida al representar gráficamente el inverso de la concentración de sustrato vs el inverso de la actividad específica, se obtienen los valores para la pendiente y el intercepto con el eje y. Despejando de la ecuación para el modelo cinético de Michaelis-Menten se obtienen los valores de los parámetros cinéticos.

La ecuación para la cinética de Michaelis-Menten es la siguiente:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

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

K_M : constante de Michaelis (mg/ml)

$V_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de catálisis (U/mg)

S: concentración de sustrato (mg/ml)

ANEXO 5

El cálculo de actividad específica para el CLEA se hizo de acuerdo a la ecuación mostrada.

$$\text{Actividad Especifica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Act. Vol.} \left(\frac{U}{ml} \right) * V_{enzima}(ml)}{mg} - \frac{\text{Act. Vol.'} \left(\frac{U}{ml} \right) * V'_{enzima}(ml)}{mg'}$$

Act. Vol.= actividad volumétrica calculada para el sobrenadante antes de la centrifugación. Este valor se obtiene como se indica en el anexo 2.

V_{enzima} = volumen de enzima utilizado en el ensayo.

Act. Vol.'= actividad volumétrica calculada para el sobrenadante después de la centrifugación.

Es necesario multiplicar la actividad volumétrica (U/ml) por el volumen de enzima, debido a que no se pueden restar actividades; de esta forma se obtienen las unidades (U) del ensayo y se divide sobre el valor de proteína que fue entrecruzada; de esta manera se obtiene la actividad específica que corresponde al CLEA elaborado.

El valor de proteína se calcula como se indica en el anexo 1.

ANEXO 6

En la Figura A.6 se muestra una micrografía de un gránulo de almidón que ha sido hidrolizado de forma no uniforme ^[52]. Se toma esta imagen solo para ejemplificar la hidrólisis del almidón que se lleva a cabo cuando la enzima esta inmovilizada.

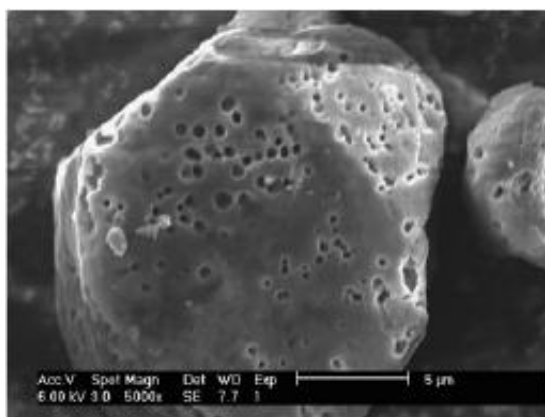


Fig. A 6: Micrografía del gránulo de almidón después de la hidrólisis vía múltiples ataques ^[52].

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. CAO, L., VAN RANTWIJK, F., SHELDON, R.; Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic letters*. 2000 (2:10), 1361-1364.
- [2]. MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C.; Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme cross-linking. *Biotechniques*. 2004 (37), 790-802.
- [3]. CHAPARRO, L.; Elaboración de derivados inmovilizados de glucoamilasa de (*Streptomyces rubiginosus*) mediante entrecruzamiento de agregados de enzima y formación de enlace covalente sobre soporte. Universidad Industrial de Santander, 2009.
- [4]. FLÓREZ, J.; Estudio de oligomerización de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el entrecruzamiento intermolecular. Universidad Industrial de Santander, 2008.
- [5]. LANDAZÁBAL, P.; Obtención de etanol a partir de almidón yuca variedad Chile en un proceso de 2 etapas: Hidrólisis (*Aspergillus niger*)-Fermentación (*Zymomonas mobilis*). Universidad Industrial de Santander, 2004.
- [6]. SALAS, M., RODRIGUEZ, M., PEREZ, N., PEREZ, R.; Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*. 2005 (73), 93-100.
- [7]. TÜRÜNÇ, O., KAHRAMAN, M., et al.; Immobilization of α -amylase onto cyclic carbonate bearing hybrid material. *Food Chemistry*. 2009 (112), 992-997.

- [8]. WILSON, L., BETANCOR, L., FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: a simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. *Biomacromolecules*. 2004 (5), 814-817.
- [9]. SANGEETHA, K., ABRAHAM, T.; Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008 (43), 314–319.
- [10]. RESHMI, R., SANJAY, G., SUGUNAN, S.; Immobilization of alpha-amylase on zirconia: a heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catalysis Communications*. 2007 (8), 393–399.
- [11]. VAN DER MAAREL, M., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J., et al.; Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. 2002 (94), 137-155.
- [12]. ANAYA, F.; Obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca mediante hidrólisis ácida asistida por microondas. Universidad Industrial de Santander, 2004.
- [13]. CARRASCAL, F.; Obtención de dextrinas de alta solubilidad y mínima retrogradación a partir de almidón industrial de yuca. Universidad Industrial de Santander, 2005.
- [14]. LÓPEZ, C., TORRADO, A., et al.; Enzymatic hydrolysis of Chestnut puree: process optimization using mixtures of α -amylase and glucoamylase. *Journal Agric. Food Chemistry*. 2004 (10), 2907-2914.

- [15]. BULEÓN, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S.; Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1998 (23), 85-112.
- [16]. TRIPATHI, P., HOFMANN, H., KAYASTHA, A., ULBRICH-HOFMANN, R.; Conformational stability and integrity of α -amylase from mung beans: evidence of kinetic intermediate in GdmCl-induced unfolding. *Biophysical Chemistry*. 2008 (137), 95-99.
- [17]. PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, V., SINGH, D., MOHAN, R.; Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 2000 (31), 135-152.
- [18]. HENRISSAT, B.; A classification of glycosyl hydrolases base don amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal*. 1991 (280), 309-316.
- [19]. KHAJEH, K., RANJBAR, B., NADERI-MANESH, H., HABIBI, A., NEMAT-GORGANI, M.; Thermostabilization of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by chemical cross-linking. *Journal of Biotechnology*. 2006 (123), 434-442.
- [20]. IRAZOQUI, G., GIACOMINI, C., BATISTA, F., BRENA, B.; Hydrophilization of immobilized model enzymes suggests a widely applicable method for enhancing protein stability in polar organic co-solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2007 (46), 43-51.
- [21]. VOET, D., VOET, J.; *Bioquímica*. Editorial Medica Panamericana, Tercera Edición. Capítulos 6, 13, 14.
- [22]. ILLANES, A.; *Biología de enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. 1994.

- [23]. KURIKI, T., IMANAKA, T.; The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal Bioscience Bioengineering*. 1999 (87), 557-565.
- [24]. BUCHHOLZ, K., SEIBEL, J.; Industrial Carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research*. 2008 (343), 1966-1979.
- [25]. KHAJEH, K., RANJBAR, B., NADERI-MANESH, H., HABIBI, A., NEMAT-GORGANI, M.; Chemical modification of bacterial α -amylases: changes in tertiary structures and the effect of additional calcium. *Biochimica et Biophysica*. 2001 (1548), 229-237.
- [26]. HOLM, L., KOIVULA, A., LEHTOVAARA, P., HEMMINKI, A., KNOWLES, J.; Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Engineering*. 1990 (16), 309-324.
- [27]. HORTON, R.; *Bioquímica*, ed Prentice Hall. 1993, Capítulos 5, 6.
- [28]. LEHNINGER, A.; *Bioquímica Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. Ediciones Omega S.A. Segunda Edición. Capítulos 3, 6,8.
- [29]. COPELAND, R.; *A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. Second Edition, ed Wiley- VCH, 2000.
- [30]. 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.

- [31]. CHANG, M., JUANG, R.; Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005 (36), 75-82.
- [32]. TREVAN, M.; Immobilized enzymes an introduction and applications in Biotechnology. Wiley & Sons. 1980.
- [33]. BLANCO, R.; Biocatalizadores inmovilizados de interés en biotransformaciones en el ámbito de tecnología de alimentos. *biojournal.net*. 2005.
- [34]. BARBOSA, L.; Elaboración de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Universidad Industrial de Santander, 2006.
- [35]. GUISAN, J.; Immobilization of enzymes and cells. Second Edition, Human Press, 2006.
- [36]. SHELDON, R., VAN RANTWIJK, F., SCHOEVAART, R.; Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*. 2004 (87:6).
- [37]. TANRISEVEN, A., OLCER, Z.; A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin. *Biochemical Engineering Journal*. 2008 (39), 430–434.
- [38]. IYER, P., ANANTHANARAYAN, L.; Enzyme stability and stabilization aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. 2008 (43), 1019–1032.
- [39]. BURCU, S., UFUK, B.; Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*. 2008 (43), 125-131.

- [40]. DAEWON, P., SEUNGJOO, H., HYONGHO, J., IK-SUNG, A., WOO-SIK, K.; 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.
- [41]. 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.
- [42]. MILLER, G.; Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959, (31), 3.
- [43]. PCHELINTSEV, N.; 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.
- [44]. FAZARY, A., ISMADJI, S., JU, Y.; Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009 (44), 240–248.
- [45]. BROWN, G.; Chemically aggregated enzymes. *Methods in Enzymology*, Academic press. 1976, 263-280.
- [46]. AYTAR, B., BAKIR, U.; Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*. 2008 (43), 125–131.
- [47]. MERA, I., CATAÑO, J.; Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta*. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 2005 (3), 54-63.

- [48]. RUEDA, N.; Preparación de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) usando albúmina de suero bovino como fuente proteica. Universidad Industrial de Santander, 2007.
- [49]. CRUZ, L.; Hidrólisis enantioselectiva de (R,S)-mandelato de metilo catalizada por agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de lipasa de *Candida antarctica B*. Universidad Industrial de Santander, 2009.
- [50]. SHAH, S., et al. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical Biochemistry*. 2006 (351), 207–213.
- [51]. BRYJAK, J.; Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilization on acrylic carriers. *Biochemical Engineering Journal*. 2003 (16), 347-355.
- [52]. O'BRIEN, S., WANG, Y.; Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*. 2008 (72), 597-607.
- [53]. MATEO, C.; 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.