

**ESTUDIO DE OLIGOMERIZACIÓN DE INVERTASA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
MEDIANTE ENTRECruzAMIENTO INTERMOLECULAR**

JOHANNA MARCELA FLÓREZ CASTILLO

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2008

**ESTUDIO DE OLIGOMERIZACIÓN DE INVERTASA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
MEDIANTE ENTRECruzAMIENTO INTERMOLECULAR**

JOHANNA MARCELA FLÓREZ CASTILLO

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Química

**DIRIGIDO POR: RODRIGO TORRES SAÉZ
PROFESOR ESCUELA DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

Deseo dedicar este trabajo en primer lugar a Dios, si el no me hubiese dado todo lo que tengo en esta vida, y muy probablemente no merezca, nada de esto hubiese sido posible.

A mis padres quienes me dieron la vida y a lo largo de toda ella me han brindado amor y confianza. A mi madre quien me enseñó a luchar por mis sueños y a no darme por vencida a pesar de las dificultades.

A mis hermanos quienes me brindan un cariño incondicional; Sebastián quien fue la luz que llegó a darle una nueva vida a nuestra familia y Eduard quien escogió un difícil camino con la idea de ayudarnos.

Y a Jose Luis mi mejor regalo, quien me brinda amor, paciencia y comprensión en los momentos más difíciles y espero que lo siga haciendo por el resto de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos a:

Dios por darme la vida y las oportunidades que durante toda mi vida he tenido, algunas que he aprovechado y otras que he dejado pasar.

A mis padres y hermanos por su amor, comprensión y su paciencia para que llegará este día.

El profesor Rodrigo por brindarme la oportunidad de hacer lo que me apasiona desde que entré a la Universidad; por sus orientaciones y paciencia durante la realización de este proyecto.

A Oveimar por ayudarme y aconsejarme cuando ingrese en el laboratorio de bioquímica y seguir haciéndolo durante todo el tiempo que duró este proyecto.

A Luz Karime Luna, amiga incondicional, quien me ayudó a dar esos pasos que eran tan difíciles para mi. Además, junto a Eduardo estuvieron con nosotros para gozar los buenos momentos (y si que gozamos) y para apoyarnos en los peores.

A Angelita, por abastecerme amablemente el agua cuando era necesaria; las Jennys del laboratorio, quienes enseñaron la técnica de electroforesis; Andrés, y todos aquellos amigos que hicieron de esta etapa algo especial e inolvidable.

A Jose Luis por su amor incondicional, paciencia y por hacer que esas largas jornadas de trabajo fueran más llevaderas.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TÉORICO	17
1.1 ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES	17
1.1.1 Reseña histórica	17
1.1.2 Definición de enzimas	17
1.1.3 Clasificación y mecanismos de reacción de las carbohidrasas	18
1.2 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA	20
1.2.1 Inmovilización por retención física	21
1.2.2 Inmovilización mediante unión química	22
1.3 HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA	25
1.4 ESTRUCTURA DE LA INVERTASA (-FRUCTOFURANOSIDASA)	26
1.5 ELECTROFORESIS CON GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE)	29
1.6 ESTADO DEL ARTE	30
2. METODOLOGÍA	38
2.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA INVERTASA SOLUBLE	38
2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA SACCHAROMYCES CEREVISIAE	38
2.3 ENTRECruzAMIENTO INTERMOLECULAR DE LA INVERTASA	39
2.3.1 Elaboración de CLEAs	39
2.3.2 Elaboración de entrecruzados enzimáticos (CLEs)	40
2.3.3 Determinación de la concentración de proteínas	40
2.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE A LOS CAMBIOS DE TEMPERATURCA Y pH	40
2.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA INVERTASA SOLUBLE FRENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS MISCIBLES EN EL MEDIO DE REACCIÓN	41

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1	ESTUDIO DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA INVERTASA SOLUBLE	42
3.1.1	Cálculo de la actividad enzimática	42
3.1.2	Determinación de la estabilidad térmica	44
3.1.3	Determinación de la estabilidad frente a solventes orgánicos miscibles en agua	49
3.1.3.1	Efecto del etanol sobre la estabilidad de la invertasa soluble	49
3.1.3.2	Efecto del THF sobre la estabilidad de la invertasa soluble	51
3.1.3.3	Efecto del THF sobre la estabilidad de la invertasa soluble	52
3.2	ESTUDIO DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE INVERTASA ENTRECruzADA	55
3.2.1	Cálculo de la actividad enzimática de los CLEAs	55
3.2.2	Cálculo de la actividad enzimática de los CLEs	56
3.2.3	Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa	58
3.2.4	Estabilidad de los CLEs de invertasa frente a solventes orgánicos miscibles en agua	62
3.2.4.1	Efecto del Etanol sobre la estabilidad de los CLEs de invertasa	62
3.2.4.2	Efecto del THF sobre la estabilidad de los CLEs de invertasa	65
3.2.4.3	Efecto de la Acetona sobre la estabilidad de los CLEs de invertasa	68
4.	CONCLUSIONES	72
	RECOMENDACIONES	73
	BIBLIOGRAFÍA	74
	ANEXOS	79

ÍNDICE DE FÍGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de inversión de carbohidrasas	19
Figura 2. Mecanismo de retención de carbohidrasas	19
Figura 3. Métodos de inmovilización de enzimas por retención física	21
Figura 4. Métodos de inmovilización de enzimas por unión química	22
Figura 5a. Estructura de la rafinosa	27
Figura 5b. Estructura de la inulina	27
Figura 6. Isoformas de la invertasa en un rango de pH de 4.5 – 8	28
Figura 7. Estructura tridimensional del monómero de invertasa de <i>S. cerevisiae</i> (Tomado de Protein Data Bank. Código de acceso: 1TUW.pdb)	29
Figura 8. Disociación de invertasa periplasmática del Retículo endoplasmático	33
Figura 9. <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
Figura 10. Representación del sitio activo de la invertasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
Figura 11. Interacciones del sitio activo de la invertasa durante la hidrólisis de la sacarosa	34
Figura 12. Reacción entre el gluteraldehído y los residuos amino de las enzimas	37
Figura 13. Procedimiento para la formación de agregados enzimáticos	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Grupos activos de soportes y grupos de enzima con los que pueden reaccionar	24
Tabla 2. Actividades volumétricas y específicas a pH=4.6	42
Tabla 3. Actividades volumétricas y específicas a pH=5.6	42
Tabla 4. Actividades volumétricas y específicas a pH=6.6	43
Tabla 5. Actividades volumétricas y específicas a pH=7.9	43
Tabla 6. Actividades volumétricas y específicas a pH=10	43
Tabla 7. Actividades volumétricas y específicas de la invertasa	44
Tabla 8. Constantes de inactivación térmica de la invertasa en min^{-1}	48
Tabla 9. Constantes de inactivación frente a la mezcla etanol/buffer de la invertasa en min^{-1}	50
Tabla 10. Constantes de inactivación frente a la mezcla THF/buffer de la invertasa en min^{-1}	52
Tabla 11. Constantes de inactivación frente a la mezcla acetona/buffer de linvertasa en min^{-1}	54
Tabla 12. Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 10%	54
Tabla 13. Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 35%	55
Tabla 14. Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 60%	55
Tabla 15. Comparación de actividades entre CLEAs y enzima soluble	56

Tabla 16.	Cantidad de proteína obtenida en los CLEs obtenidos a los diferentes pH y 12h de entrecruzamiento.	57
Tabla 17.	Actividad enzimática en U/mg de proteína precipitada de los CLEs obtenidos a 12h de entrecruzamiento	57
Tabla 18.	Constantes de inactivación térmica de CLEs de invertasa en min^{-1}	61
Tabla 19.	Constantes de inactivación frente a la mezcla etanol/buffer de la invertasa en min^{-1}	64
Tabla 20.	Constantes de inactivación frente a la mezcla THF/buffer de la invertasa en min^{-1}	67
Tabla 21.	Constantes de inactivación frente a la mezcla Acetona/buffer de la invertasa en min^{-1}	69
Tabla 22.	Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 10%	69
Tabla 23.	Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 35%	70
Tabla 24.	Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 60%	70

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Estabilidad térmica invertasa soluble a pH de 4.6	45
Gráfica 2. Estabilidad térmica invertasa soluble a pH de 5.6	45
Gráfica 3. Estabilidad térmica invertasa soluble a pH de 6.6	46
Gráfica 4. Estabilidad térmica invertasa soluble a pH de 7.9	47
Gráfica 5. Estabilidad térmica invertasa soluble a pH de 10	47
Gráfica 6. Estabilidad de invertasa soluble a pH 4.6 frente a mezclas Etanol/buffer	49
Gráfica 7. Estabilidad de invertasa soluble a pH=4.6 frente a mezclas THF/buffer	51
Gráfica 8. Estabilidad de invertasa soluble a pH=4.6 frente a mezclas acetona/buffer	53
Gráfica 9. Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH 4.6	58
Gráfica 10. Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH 5.6	58
Gráfica 11. Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH de 6.6	59
Gráfica 12. Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH 7.9	60
Gráfica 13. Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH de 10	60
Gráfica 14. Estabilidad de los CLEs de invertasa a pH 4.6 frente a mezclas etanol/buffer	62
Gráfica 15. Estabilidad de los CLEs de invertasa a pH 4.6 frente a mezclas THF/buffer	65
Gráfica 16. Estabilidad de los CLEs de invertasa a pH 4.6 frente a mezclas acetona/buffer	68

ABREVIATURAS

CLEAs	Agregados enzimáticos entrecruzados
CLEs	Entrecruzamiento de enzimas solubles
THF	Tetrahidrofurano
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sodio en geles de poliacrilamida
DNS	Acido dinitro salicílico
Tyr	Tirosina
Asp	Ácido aspártico
Gly	Glicina

Título: ESTUDIO DE OLIGOMERIZACIÓN DE INVERTASA DE *SACCHAROMOYCES CEREVISIAE* MEDIANTE ENTRECruzAMIENTO INTERMOLECULAR¹

Autor: Johanna Marcela Flórez Castillo²

Palabras claves: Enzimas, Invertasa, agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), gluteraldehído, electroforesis, isoformas.

Las enzimas son catalizadores biológicos con una actividad catalítica y selectividad mayor que los catalizadores inorgánicos convencionales. La α -fructofuranosidasa perteneciente al grupo de las carbohidrasas es una enzima utilizada en la industria de alimentos para la fabricación de azúcar invertido (fructosa+glucosa), el cual es mucho más dulce y menos cristalizable que la sacarosa.

En este proyecto, se efectuó un estudio de la oligomerización de α -fructofuranosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose las diferentes formas oligoméricas de la enzima por medio de entrecruzamiento intermolecular con gluteraldehído. 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.

Se realizó el entrecruzamiento intermolecular de agregados enzimáticos (CLEAs) y de enzima solubilizada (CLEs). Los CLEAs se prepararon inicialmente utilizando como agente precipitante sulfato de amonio y gluteraldehído al 1%. Sin embargo, probablemente el ion NH_4^+ presente en esta sal inactivó la enzima obteniéndose entrecruzados enzimáticos con menor actividad que la invertasa soluble. Por esta razón, se prosiguió a preparar CLEs utilizando la misma concentración de gluteraldehído, logrando un incremento de la actividad específica pasando de 711 U/mg a 914 U/mg.

Aunque se aumentó la actividad específica de los CLEs, su estabilidad térmica fue significativamente menor que la presentada por la enzima soluble. De igual manera sucedió con la estabilidad en etanol, acetona y THF, solventes orgánicos miscibles en agua.

Se trató de confirmar el entrecruzamiento de las diversas formas oligoméricas de la invertasa por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida, sin embargo, los entrecruzados obtenidos presentaron una gran aglomeración imposibilitando su separación por electroforesis en una dimensión en condiciones nativas.

¹ Proyecto de grado

² Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Rodrigo Torres Sáez

Title: STUDY OF OLIGOMERIZATION OF INVERTASE FROM *SACCHAROOMYCES CEREVISIAE* THROUGH INTERMOLECULAR CROSS-LINKING¹

Authors: Johanna Marcela Flórez Castillo²

Keywords: Enzymes, invertase, cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), glutaraldehyde, electrophoresis, isoforms.

Abstract: Enzymes are biological catalysts with catalytic activity and selectivity higher than inorganic conventional catalysts. Invertase (α -fructofuranosidase), belonging to the group of carbohydrases, is an enzyme used in food industry to manufacture inverted sugar (fructose + glucose), which is sweeter and less crystalizable than sucrose.

In this work, it was carried out a study of oligomerization α -fructofuranosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, being obtained different oligomeric forms of the enzyme through intermolecular cross-linking with glutaraldehyde. Moreover, it was evaluated its stability against solvent effects such as ethanol, acetone and tetrahydrofuran, and thermal stability of these aggregates, being compared with those obtained for the soluble enzyme.

We performed cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) and cross-linked enzymes (CLEs) preparations. CLEAs were initially prepared using ammonium sulphate as precipitant agent and glutaraldehyde to 1 % (w/v). However, NH_4^+ ion present in this salt inactivated the enzyme, obtaining cross-linked enzymes less active than the soluble invertase. For this reason, we continued CLEs preparations using the same concentration of glutaraldehyde, achieving an increase in specific activity from 711 U/mg to 914 U/mg.

Although the specific activity was increased from CLEs, its thermal stability was significantly lower than the soluble enzyme. Similar results were obtained with enzyme stability in presence of water-miscible organic solvents such as ethanol, acetone and THF.

We tried to confirm cross-linking of different oligomeric forms of invertase by polyacrylamide gel electrophoresis. However, obtained cross-linked enzyme preparations showed an extensive agglomeration, preventing their separation by one dimensional electrophoresis in native conditions.

¹ Degree Work

² Faculty of Science, School of Chemistry, Rodrigo Torres Sáez

INTRODUCCIÓN

La capacidad catalítica de las enzimas ha sido aprovechada en las últimas décadas por la industria en procesos como la fermentación alcohólica, en el tratamiento de aguas residuales, en la industria farmacéutica, de detergentes, papelera y panadera, entre otras.

En la industria de alimentos se utiliza la enzima invertasa (-fructofuranosidasa) para la obtención de jarabes de fructosa y glucosa a partir de la hidrólisis de la sacarosa. Estos jarabes poseen un mayor poder edulcorante y menos capacidad para cristalizarse que la sacarosa convencional. Por este motivo, estos azúcares son utilizados en la fabricación de bombones rellenos, cubiertas para postres y jaleas. Desde el punto de vista estructural, la invertasa posee la propiedad de presentar diversas formas oligoméricas, dependiendo de las condiciones ambientales (pH, temperatura, concentración de sales, etc.) en la cual se encuentre la enzima.

Aunque los procesos enzimáticos son muchos más específicos que los catalizadores no biológicos, éstos presentan cierta desventaja en su reutilización, debido a que son solubles en el medio de reacción por lo que su recuperación no es económicamente factible. Ante esta situación, se han buscado, técnicas de insolubilización, las cuales restringen de forma parcial o total la movilidad de la enzima, dando lugar a formas insolubles y reutilizables que además retienen su actividad catalítica y su estabilidad.

Entre las técnicas de insolubilización enzimáticas se encuentra la inmovilización, la cual puede realizarse de diferentes formas, por ejemplo; inmovilización en soportes; inmovilización por retención física y el entrecruzamiento intermolecular. Esta última técnica consiste en la unión intermolecular de la enzima por medio de reactivos bi-funcionales como el glutaraldehído o el isotiocianato; disminuyendo la posible inactivación del biocatalizador por modificación en su estructura terciaria.

Estos entrecruzados enzimáticos presentan una gran estabilidad térmica y resistencia a los cambios de pH. Además, cumplen con la condición de insolubilidad que permite su recuperación al final del proceso; pero tal vez su propiedad mas importante es el aumento significativo de su actividad y estabilidad catalítica.

En este proyecto se presentan los resultados del estudio de oligomerización de la invertasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose entrecruzados enzimáticos de sus diferentes isoformas y evaluándose la variación de su actividad enzimática, en sus formas entrecruzadas y solubles, así como su estabilidad frente a solventes como la acetona, el etanol y tetrahidrofurano; y a los cambios de temperatura.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES

1.1.1 Reseña histórica

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.

Después en 1897 Eduard Buchner descubrió que el líquido obtenido después de triturar la levadura tenía las mismas propiedades para producir la fermentación de azúcares que las células activas; probando de esta manera que el proceso de fermentación no es el resultado de un proceso fisiológico de la célula sino de una sustancia segregada por ella. A esta sustancia la llamó zimasa y a sus derivados químicos de origen y acción similar los denominó enzimas.

Gracias a este descubriendo los científicos asumieron que las enzimas eran los responsables de las reacciones metabólicas vitales. Sin embargo, todos los intentos de aislar este tipo de sustancias habían sido en vano, y no fue hasta 1926 que el bioquímico estadounidense James B. Sumner logró aislar y cristalizar la ureasa, y en 1930 su colaborador Howard Northrop aisló y cristalizó la pepsina y la tripsina demostrando la naturaleza proteica de las enzimas. Desde entonces el interés por los procesos enzimáticos ha ido en aumento, presentándose avances importantes en campos como la industria de detergentes, síntesis orgánicas y farmacología, cuyo ejemplo principal es la síntesis de penicilinas semisintéticas utilizando la penicilina amidasa **[Soberón; 2002]**.

1.1.2 Definición de enzimas

Las enzimas son proteínas responsables de catalizar las reacciones metabólicas en los seres vivos. Poseen la característica de ser altamente selectivas hacia los sustratos; esta selectividad puede ser absoluta, cuando son específicas para un solo sustrato, o relativa,

cuando reaccionan frente a varios sustratos con estructuras similares. Al igual que los catalizadores convencionales, las enzimas tienen la capacidad de reducir la energía libre del estado de transición (complejo Enzima-Sustrato), haciendo de esta manera que la reacción transcurra con mayor velocidad.

Muchas enzimas presentan formas oligoméricas, es decir, poseen una estructura cuaternaria constituida por varias subunidades polipeptídicas unidas por enlaces débiles como puentes bisulfuro, puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals. Estos enlaces son sensibles a los cambios bruscos de temperatura, los cuales producen la desnaturalización de la proteína y por tanto pérdida de la actividad enzimática [Valenzuela; 2007]. Otro factor que afecta la estabilidad de las enzimas es el pH; ya que cuando la carga superficial varía, las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria de las proteínas desaparecen y puede provocar la desnaturalización e inactivación de la función proteica.

1.1.3 Clasificación y mecanismos de reacción de las carbohidrasas

Las carbohidrasas son un grupo muy variado de enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico de los azúcares. Este grupo puede clasificarse siguiendo las normas establecidas por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) y la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Esta clasificación establece un catálogo de enzimas (EC) que asigna a cada enzima un código numérico basado en el tipo de reacción que cataliza y el tipo de sustrato sobre los que actúan [Polaina; 2004]. Las carbohidrasas se nombran como (E.C. 3.2.1.x) donde los tres primeros dígitos indican la propiedad de hidrolizar el enlace O-glucosídico y el cuarto (x) indica el tipo de sustrato. Sin embargo, esta clasificación no aporta mucha información sobre la estructura de las enzimas. Es por ello que Henrissat y colaboradores han creado una clasificación complementaria a la anterior, donde las enzimas se agrupan en diferentes familias con secuencias aminoacídicas similares.

La hidrólisis del enlace O-glucosídico está mediada por dos residuos aminoacídicos, en la mayoría de los casos son residuos carboxílicos, presentes en el sitio activo de la enzima; uno de estos actúa como donador de protones y el otro como nucleófilo o base. Existen dos mecanismos por los cuales puede ocurrir esta hidrólisis dependiendo de la enzima: Mecanismo de inversión o mecanismo de retención.

El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso ácido-base. Uno de los residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico; mientras que el segundo actúa como ácido asistiendo la separación del oxígeno (Ver **Figura 1**). Las enzimas que actúan bajo este mecanismo poseen una distancia de 10.5 Å entre los residuos catalíticos y producen el cambio de configuración del carbono anomérico. [Polaina; 2004]

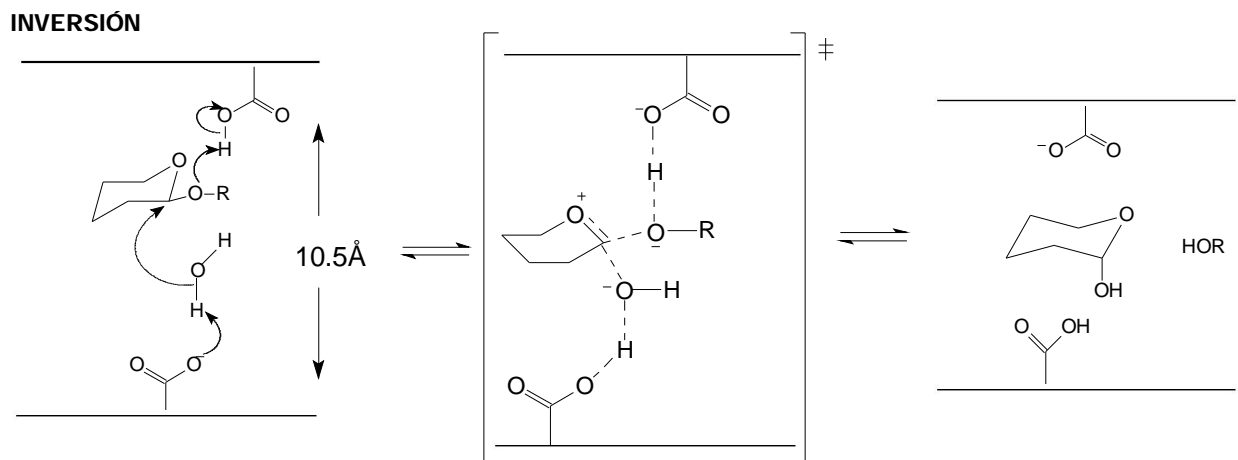


Figura 1: Mecanismo de inversión de carbohidrasas

El mecanismo de retención tiene lugar mediante un doble desplazamiento. En este proceso tiene lugar el ataque del residuo nucleófilo al carbono anomérico dando como resultado la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. A continuación, una molécula de agua dona un protón y deshace el enlace transitorio regenerando la enzima (Ver **Figura 2**). En este mecanismo la separación entre los residuos carboxílicos es de 5.5 Å y se mantiene la configuración del carbono anomérico [Polaina; 2004]

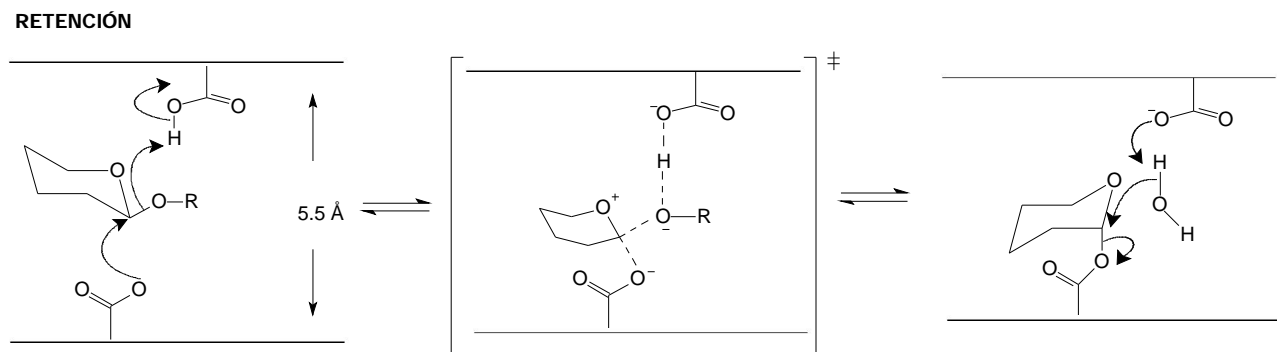


Figura 2: Mecanismo de retención de carbohidrasas

1.2 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

El gran número de reacciones catalizadas por enzimas y la especificidad que éstas presentan aumentan su valor en la industria. Sin embargo, su costo se incrementa al utilizarlas como reactivos en forma soluble, ya que una vez utilizadas es imposible recuperarlas porque su separación del medio de reacción no es económicamente factible. Por esta razón, se han realizado varios estudios en los últimos años sobre enzimas inmovilizadas. Según la European Federation of Biotechnology (1983) los biocatalizadores inmovilizados pueden definirse como: “Enzimas, células u organelos (o combinación de ellos) confinados o localizados en cierta región definida del espacio, con retención en su actividad catalítica y, si es necesario, de su viabilidad, y que pueden ser usados de modo repetido y continuo” **[Klein y col; 1983]**

Se ha logrado la inmovilización de enzimas en soportes inertes, reteniendo en gran parte su actividad catalítica original. Las reacciones enzimáticas se desarrollan en medios acuosos, lo que implica que el soporte utilizado debe ser insoluble en agua pero hidrófilo, de tal manera que garantice un buen contacto con el medio de reacción. **[Arroyo; 1998]**

La inmovilización de enzimas puede presentar ventajas como:

1. Estabilidad: Se pueden desarrollar estrategias de estabilización que protejan la actividad catalítica frente a condiciones extremas de pH, temperatura o concentración de sales que puedan presentarse durante la reacción.
2. Económicas: Está relacionada con la posibilidad de reutilización de la enzima, lo que aumenta la productividad por unidad de enzima con respecto al uso del catalizador soluble.
3. Reducción de las etapas durante el proceso: Dado que el producto se puede separar fácilmente de la enzima inmovilizada, se elimina la etapa de inactivación de la enzima necesaria para detener la reacción. Al realizar esta inactivación es posible que se deterioren las cualidades del producto obtenido. **[Blanco; 2005]**

De igual manera estos procesos de inmovilización presentan desventajas como:

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Puede existir pérdida de la actividad de la enzima durante la inmovilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

Los métodos más comunes de inmovilización son: La adsorción, unión covalente, microencapsulación, reticulación y entrecruzamiento. Estos métodos pueden clasificarse en dos grandes grupos: Inmovilización por retención física e inmovilización por unión química.

1.2.1 Inmovilización por retención física

Estos métodos se dividen en dos grupos los métodos por atrapamiento y los de inclusión en membranas.

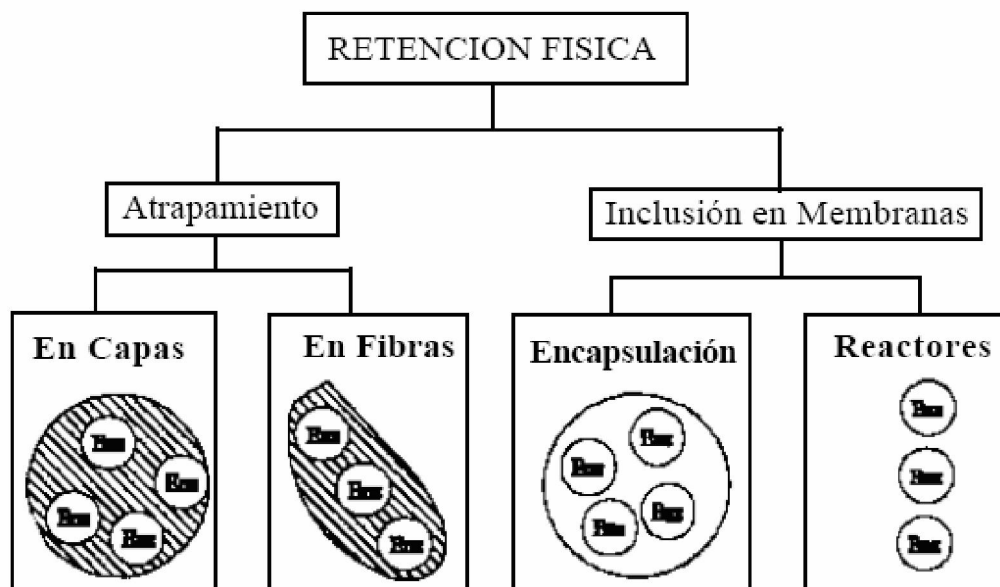


Figura 3: Métodos de inmovilización de enzimas por retención física (gráfica tomada del artículo "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones")

Los dos métodos de atrapamiento consisten en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida y porosa constituida generalmente de pre-polímeros foto-entrecruzables o polímeros como la poliacrilamida.

Los métodos de inclusión en membranas se dividen en dos: Microencapsulación y reactores de membranas. En la microencapsulación las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten la entrada de moléculas de sustrato y producto pero no de enzimas. Los reactores de membranas emplean membranas permeables al producto final y pueden ser permeables o no al sustrato y lógicamente impermeables a la enzima; y mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor.

1.2.2 Inmovilización mediante unión química

Estos métodos pueden ser mediante unión a soporte o mediante reticulado.

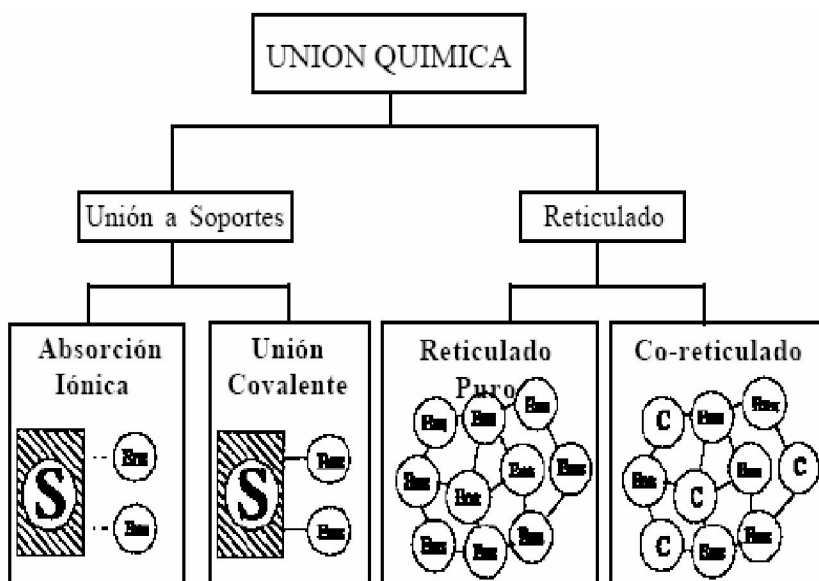


Figura 4: Métodos de inmovilización de enzimas por unión química (gráfica tomada del artículo “Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones)

Los métodos de unión a soporte son los más utilizados y de los que se tiene mayor información. La selección del soporte es de vital importancia, ya que debe ser un soporte inerte al ataque microbiológico para que su reutilización sea factible, de igual manera debe tener una resistencia mecánica a las condiciones de la reacción. Al igual que en cualquier técnica de inmovilización, se debe procurar que la afinidad de la enzima por el sustrato aumente y la inhibición disminuya, y se amplíe el rango de pH y temperatura óptima. Para este fin pueden ser utilizados soportes inorgánicos como las arcillas, la piedra pómez y la sílice; soportes orgánicos como la celulosa, el almidón y la quitina que son polímeros naturales, o el poliestireno y la poliacrilamida que son polímeros sintéticos. [Arroyo; 1998]

La unión a soportes puede realizarse mediante adsorción iónica o unión covalente. En la adsorción iónica la enzima se une al soporte mediante fuerzas de van der Waals y por puentes de hidrógeno; estas uniones se ven favorecidas por el pH del medio de reacción, la fuerza iónica del medio o por la presencia de iones que actúen como cofactores y ayuden a la unión con el soporte.

Este método de inmovilización presenta ventajas como:

1. Bajo costo
2. La preparación de biocatalizador es sencilla
3. No se presentan cambios en la especificidad enzimática

Pero su principal desventaja es que las fuerzas de unión entre el soporte y la enzima son demasiado débiles.

Por otro lado, en la técnica de unión covalente se garantiza la no-desorción de la enzima, ya que los grupos químicos del soporte son activados para que reaccionen con los residuos aminoacídicos de las enzimas, los más utilizados son la lisina, la cisteína, la histidina y la tirosina. Estos aminoácidos presentan la propiedad de ser hidrófilos por lo tanto se encuentran en la superficie de la proteína permitiendo la unión con el soporte.

La activación del soporte se realiza de acuerdo con la capacidad de reaccionar con los grupos de la enzima que suelen estar en la superficie. En la tabla 1 se recogen algunos ejemplos de grupos activos de soportes y los grupos de la enzima con los cuales reacciona.

Tabla 1: Grupos activos de soportes y grupos de enzima con los que pueden reaccionar

Grupo de la enzima	Métodos de activación (grupos) del soporte
Amino	Aldehídos Glutaraldehído Carboxilos Epóxidos Bromuro de cianógeno Ésteres de N-hidroxisuccinimida
Carboxilos	Hidrazida
Sulfhídricos	Yodoacetil o Bromoacetil Disulfuro de piridilo Epóxidos
Hidroxisilos	Bis-Epóxidos Divinil sulfona

Esta técnica presenta ventajas como:

1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla
2. La carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización
3. Poseen una mayor resistencia a la desactivación por cambios de pH y temperatura.

Sin embargo, para poder utilizar esta técnica es necesario conocer la densidad de los grupos activos por unidad de superficie ya que esto condiciona el número de uniones al soporte; debido a que estas uniones modifican la estructura de la proteína y por lo tanto su estructura terciaria presentando una pérdida significativa de la actividad catalítica [Blanco; 2005]. Además, se puede presentar el inconveniente de que la unión al soporte afecte la estructura del centro activo y por lo tanto la actividad enzimática se vea afectada.

Por otro lado, existe el método de reticulado, también denominado método de entrecruzamiento o “cross-linking”, que consiste en la utilización de reactivos bifuncionales; como el glutaraldehído y el isotiocianato; que originan uniones intermoleculares o

intramoleculares en la enzima. Como resultado se obtienen enzimas con uniones irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. Un método muy utilizado recientemente es la precipitación de enzimas y su posterior entrecruzamiento con glutaraldehído esta técnica se denomina CLEAs, entrecruzamiento de agregados enzimáticos **[Blanco; 2005]**.

1.3 HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA

La sacarosa (α -D-glucopiranosil β -D-fructofuranósido) es el producto final de la fotosíntesis, y es la forma principal en que los azúcares se transportan a través del floema a los sitios de almacenamiento de las plantas. Además, es una molécula que sirve como señal para muchos procesos fisiológicos **[Willem y col; 2007]**.

Para que la energía almacenada en la sacarosa pueda ser aprovechada es necesario que ocurra la hidrólisis del enlace 1- 2 glucosídico por medio de la invertasa, produciéndose una mezcla equimolar de glucosa y fructosa conocida como azúcar invertido **[Márquez y col; 2008]**

En los seres humanos la sacarosa es la fuente principal de glucosa, la cual ingresa al proceso de glucólisis, que es la vía metabólica encargada de obtener la energía necesaria para las células por medio de la oxidación de la glucosa. Al ser consumida, una parte de la sacarosa sufre una hidrólisis ácida en el estómago, mientras que la sacarosa restante es hidrolizada por la invertasa en el intestino delgado transportándose de esta forma la glucosa a las células del cuerpo.

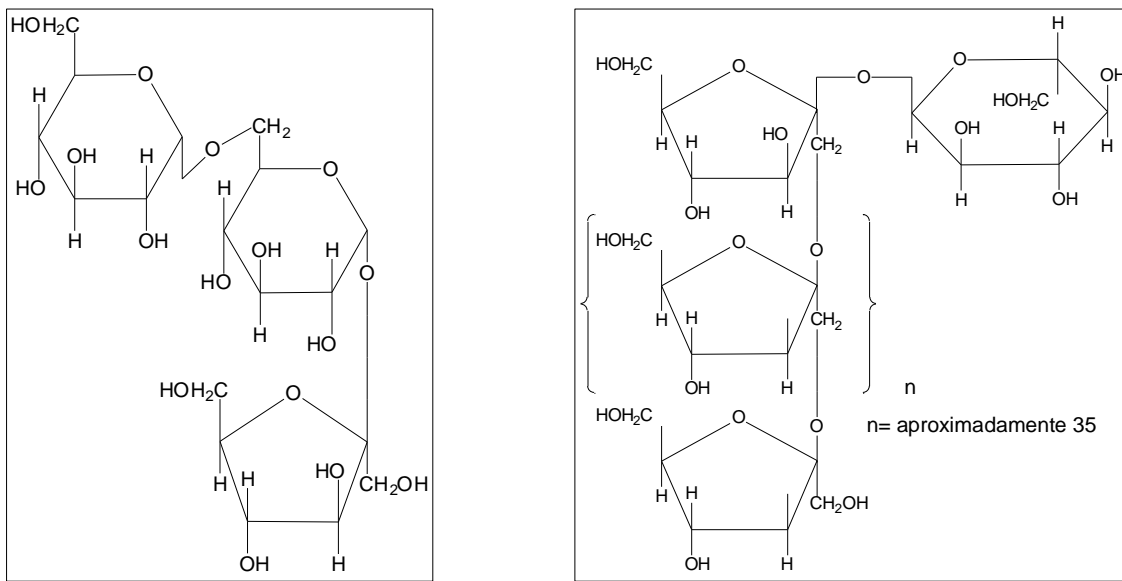
La fructosa producida durante la hidrólisis es introducida al metabolismo en diferentes niveles de la glucólisis, en primera instancia sufre una fosforilación; el producto fosforilado es degradado a gliceraldehído y dihidroxicetona fosfato los cuales siguen la ruta normal de la glicólisis **[David y col; 2004]**.

1.4 ESTRUCTURA DE LA INVERTASA (- FRUCTOFURANOSIDASA)

La función biológica de la enzima invertasa es participar en el metabolismo de la glucosa y puede encontrarse en diferentes fuentes tales como: bacterias, hongos, insectos, mamíferos y vegetales **[Márquez y col; 2008]**. En las plantas, constituye una de las formas principales de obtención de carbono y suplementos de energía.

La α -fructofuranosidasa cataliza de la hidrólisis de la sacarosa actuando bajo un mecanismo de retención; posee una selectividad relativa, pudiendo hidrolizar también sustratos como la rafinosa (Ver **Figura 5a**) que es un trisacárido constituido por dos moléculas de glucosa y una de fructosa; y la inulina que es un polisacárido complejo constituido por la unión de moléculas de fructosa (Ver **Figura 5b**). La fructosa producida durante la hidrólisis, puede combinarse con la invertasa libre de tal modo que compite con la sacarosa por los sitios activos de la enzima actuando de esta forma como un inhibidor competitivo **[Isla y col; 1995]**.

La invertasa de las plantas posee una variedad de formas las cuales pueden categorizarse en términos de solubilidad, pH óptimo, punto isoeléctrico y localización subcelular. Dos tipos de invertasa pueden ser aisladas de las plantas, la forma soluble o invertasa externa y las enzimas de la pared celular o invertasa interna. La invertasa externa se encuentra ampliamente glicosilada y puede encontrarse en el espacio periplasmático, es decir, en el compartimiento que rodea el citoplasma de las células. Esta enzima periplasmática puede clasificarse en invertasa ácida (pH óptimo 3.5-5.0) e invertasa alcalina o neutra (pH óptimo 7.0-8.0).



(a)

(b)

Figura 5: Estructura de la rafinosa (a) y de la inulina (b)

La invertasa ácida está involucrada en el metabolismo de la sacarosa y está ubicada en la vacuola de las plantas jóvenes, mientras que la invertasa alcalina se encuentra exclusivamente en el citoplasma de tejidos maduros y regula los niveles de hexosas y sacarosa en el citoplasma [Chia-Chen y col; 2005]. En la pared celular la invertasa se encuentra menos glicosilada que la invertasa externa y juega un papel importante en la fotosíntesis, manteniendo la concentración de la sacarosa entre los tejidos que la emiten y la asimilan. Una de las maneras de optimizar el metabolismo de la sacarosa en las plantas, así como su control y almacenamiento en las células, es con la existencia de múltiples isoformas de la invertasa periplasmática las cuales son determinadas por el pH y por lo tanto de la ubicación en la planta. Estas isoformas pueden ir desde octámeros hasta dímeros en el rango de pH de 4.5 a 8 (Ver Figura 6) con un peso molecular que varía de 260 a 560 kDa [Bahar y col; 2004].

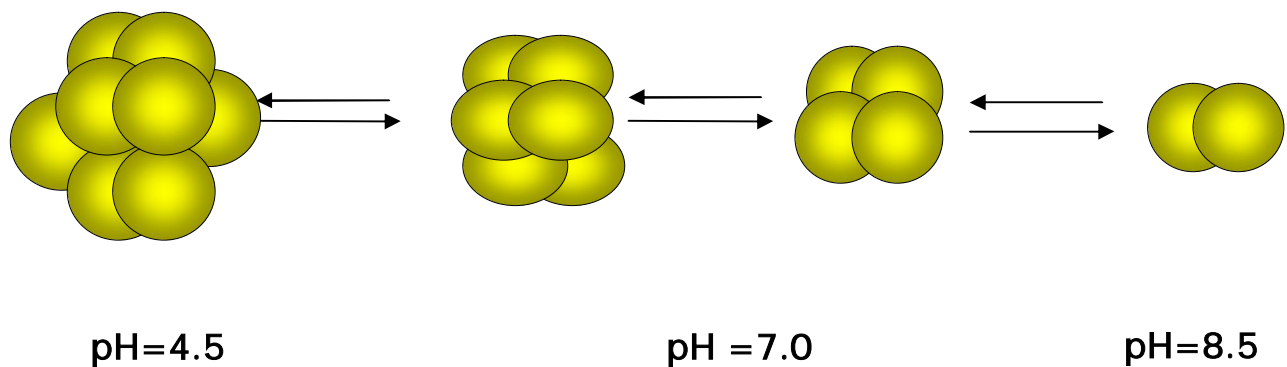


Figura 6. Equilibrio oligomérico de isoformas de la invertasa en un rango de pH de 4.5 a 8

La invertasa es una enzima hidrolasa perteneciente al grupo de las carbohidrasas. Según las normas de la IUPAC y la IUBMB la invertasa se nombra como E.C. 3.2.1.26, donde la numeración se refiere a:

- E.C. 3.-.-.- Hidrolasas
- E.C. 3.2.-.- Glicosilasas
- E.C. 3.2.1.- Glicosidasas
- E.C. 3.2.1.26 -fructofuranosidasa

Adicionalmente siguiendo lo propuesto por Henrissat y colaboradores esta enzima forma parte de las clases GH-J, lo que implica que posee una estructura de forma 5- α -plegada tipo propela (cinco hélices), y pertenece a la familia 32. En la **Figura 7** se puede apreciar la estructura tridimensional de un monómero de invertasa, la numeración I al V corresponden a las aspas que forman la “hélice propulsora” (α -plegada propela), siendo el código PDB de esta enzima 1TUW [Polaina; 2004].

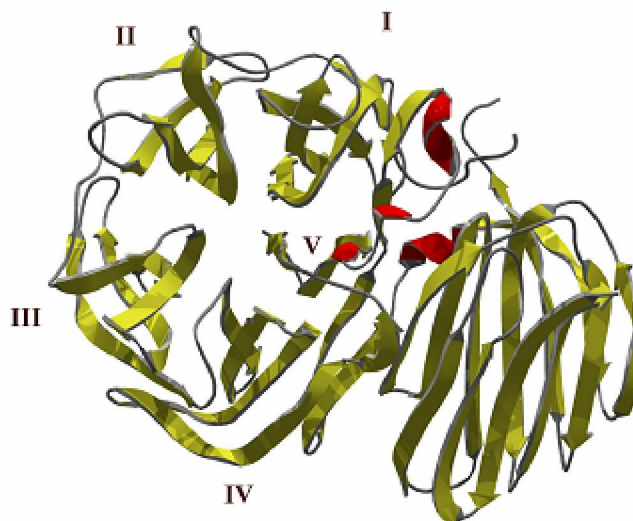


Figura 7. Estructura tridimensional del monómero de invertasa de *S. cerevisiae* (tomado de Protein Data Bank. Código de acceso: 1TUW.pdb)

1.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis es un método analítico en el cual se separan biomoléculas, como proteínas o ácidos nucleicos por diferencias en su peso molecular (PM) bajo el efecto de un campo eléctrico. Este método fue utilizado por primera vez en 1937 por Tiselius y en 1959. Posteriormente, Raymond y Weintraub utilizaron como soporte para la electroforesis geles de poliacrilamida. En 1970 el dodecil sulfato de sodio (SDS) fue introducido en la técnica y en 1972 se comienzan a utilizar, junto con el SDS y los geles de poliacrilamida, agentes reductores como el mercaptoetanol, para la determinación de pesos moleculares de proteínas; denominándose a esta técnica electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) [García Pérez; 2000].

El anión del SDS se une a las proteínas en una relación aproximada de una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácido. El SDS desnaturaliza las proteínas rompiendo los enlaces covalentes que determinan su estructura terciaria y cuaternaria. En el derivado SDS-proteína la cadena alifática del SDS se ubica en el interior de la estructura mientras los grupos sulfato se ubican en la superficie dándole una carga neta negativa al derivado. Además del SDS, se utiliza un agente reductor por ej. Mercaptoetanol, el cual es encargado de romper los enlaces bi-sulfuro de las proteínas, haciendo que estas se separen en las

subunidades que las componen. El uso de SDS y mercaptoetanol en la electroforesis con geles de poliacrilamida causa que las proteínas migren a través del gel por las diferencias en sus Pesos Moleculares; siendo la migración del derivado SDS-proteína hacia el ánodo inversamente proporcional al logaritmo de su PM [García Pérez; 2000]. Para determinar el PM de las proteínas separadas es necesaria la comparación con un marcador el cual se hace correr por el gel junto con las proteínas de interés, este marcador se divide en bandas con PM conocido las cuales se comparan con las bandas obtenidas de la proteína de interés.

Los geles de poliacrilamida se caracterizan por su transparencia, la cual permite visualizar más fácilmente las bandas de las proteínas; elasticidad; porosidad controlable; además son químicamente inertes lo que las hace ideales como medios de soportes para separaciones por electroforesis. La poliacrilamida se forma por co-polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida); esta reacción requiere un catalizador como la N,N,N,N'-Tetrametilendiamina (TEMED) la cual causa la formación de radicales libres del iniciador que es el persulfato de amonio (PSA), estos radicales producen radicales libres del oxígeno los cuales a su vez producen radicales libres del monómero que inician la reacción de polimerización. Las cadenas de poliacrilamida se entrecruzan al azar formándose una red de porosidad uniforme que puede ser controlada variando las condiciones de la reacción y las cantidades de acrilamida y bis-acrilamida adicionadas [Lomonte; 2007].

1.6 ESTADO DEL ARTE

Las formas inmovilizadas de las enzimas ofrecen ventajas sobre los catalizadores no biológicos convencionales e incluso sobre las formas solubles de las enzimas, ya que presentan una alta actividad catalítica, gran especificidad y lo más importante viabilidad económica; ya que pueden ser separadas fácilmente del medio de reacción y ser reutilizadas. 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.

Durante los últimos años la utilización de enzimas en la industria alimenticia ha ido en aumento, por tal razón existen leyes que regulan su uso en alimentos. Por ejemplo, para aquellas enzimas que provienen de organismo genéticamente modificadas o microorganismos específicos es necesario que una enzima sea "*Generalmente reconocida como segura*" (GRAS: "Generally Recognized as Safe"). Para que una enzima sea de tipo GRAS se requiere:

1. Demostrar la seguridad del proceso de producción, si no está establecida
2. Identificar el origen de la enzima
3. Definir el método de preparación
4. Especificaciones de la enzima: Si se trata de una enzima multimérica o monomérica o si proviene de células enteras.
5. Especificar los métodos de recuperación de la enzima, como por ejemplo los solventes a utilizar y los métodos físicos de separación auxiliares ya sea la filtración o la floculación.
6. Reportar los datos toxicológicos de la enzima o el microorganismo utilizado en el proceso **[Blanco; 2005]**.

Las enzimas inmovilizadas son utilizadas en procesos industriales como la obtención de jarabes de glucosa y fructosa a partir de la hidrólisis de la sacarosa utilizando la enzima invertasa. Esta hidrólisis se realizaba anteriormente con HCl **[Tomotani y col, 2006]**; el producto obtenido de la hidrólisis enzimática es incoloro, mientras que el obtenido en la hidrólisis ácida es colorado, lo que agrega más pasos al proceso de obtención del azúcar hidrolizado, ya que la solución deseada debe ser incolora. Éste producto ha sido utilizado en la producción industrial de azúcar líquido, producción artificial de miel y de mermeladas.

La invertasa puede encontrarse en tejidos de plantas como el trigo, maíz, caña de azúcar, zanahoria y en un estudio reciente se lograron inducir durante el cultivo de células de bambú de la especie *Bambusa edulis*. En este estudio, se encontró invertasa alcalina solo en el citoplasma de las células cultivadas. Por lo tanto, se consideró como una enzima citoplasmática, mientras que la invertasa ácida se encontraba tanto en el citoplasma como en la pared celular; un 62% de esta enzima era soluble (citoplasma) mientras que el 38% se encontraba unida a la pared celular, esto debido probablemente a la naturaleza de la proteína y el valor de su pH óptimo. **[Chia-Chen Liu y col, 2006]**.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la invertasa existe en dos formas: una forma glicosilada que se encuentra en el espacio periplasmático (invertasa externa) y una no glicosilada en el citosol (invertasa interna). La síntesis de la invertasa externa esta sujeta a una represión catabólica por la glucosa, es decir, es expresada únicamente cuando la concentración de glucosa en el espacio periplasmático es demasiado alta; mientras que la invertasa externa es sintetizada consecutivamente. A pesar de estas diferencias, la hidrólisis de la sacarosa transcurre con la misma eficiencia sin importar cual de las dos enzimas la realice **[Reddy and Maley; 1990]**.

Es importante mencionar la diferencia en pesos moleculares entre ambas formas de enzima; a la invertasa externa se le atribuye el 50% de su peso molecular a los enlaces entre los residuos de oligosacáridos, además esta enzima puede encontrarse en el espacio periplasmático como un octámero que puede disociarse a tetrámeros, hexámeros y dímeros cuyos pesos están entre 560, 360 y 260 kDa; la forma dimérica es la más estable, y requiere condiciones desnaturizantes para disociarse. Por otro lado, la invertasa interna, la cual es mas pequeña por no estar glicosilada, posee un peso molecular de aproximadamente 60k Da **[Chávez y col; 1997]**. Además, se encuentra en forma de dímero y es menos estable que la invertasa periplasmática; no obstante, es posible la formación de octámeros cuando la concentración de proteínas es alta **[Esmon y col; 1987]**. La estabilidad de estas dos formas de invertasa no viene determinada por la glicosilación. Un estudio realizado en 1988 por Schuelke y Schmid demostró que los factores cinéticos y la inactivación térmica irreversible son similares, por lo que sugieren que la estabilidad viene determinada por el plegamiento de cada enzima y este a su vez por el pH del medio en que se encuentre **[Schulke and Schmid; 1988]**.

La estructura de octámero de la invertasa periplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* se confirmó utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante (PAGE); para esto se utilizó invertasa acumulada en el retículo endoplasmático la cual fue incubada a 30°C durante 15, 30, 45 y 60 minutos; al obtener el gel se observó que la banda de la invertasa se separaba en cuatro formas distintas denominadas I8, I6, I4 e I2, y se determinó que las formas I6 a la I2 provenían de I8 que es la invertasa nativa, es decir, son producto de la disociación del octámero de invertasa en sus formas mas pequeñas **[Esmon y col; 1987]**.

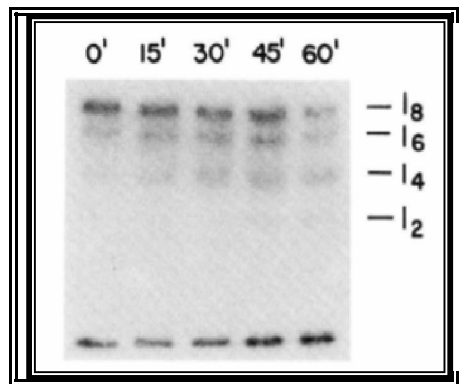


Figura 8: Disociación de invertasa periplasmática del retículo endoplasmático

Para conocer bien cual es el mecanismo de reacción de la invertasa es muy importante conocer la estructura del sitio activo de la invertasa. A comienzos del 2008 se publicó un estudio sobre la estructura cristalina de la invertasa de pared celular de *Arabidopsis thaliana* que es una pequeña planta herbácea que esta presente en los 5 continentes aunque es muy escasa en América del sur (Ver **Figura 8**).



Figura 9: Arabidopsis thaliana

En este estudio se determinó que el sitio activo de la invertasa estaba ubicado en el dominio con estructura α -propela (hélice); mientras que el C-terminal se encontraba formado por dos β -plegadas (hojas) y el N-terminal por 5-formas- α -propela. De igual manera se determinó la ubicación de los residuos aminoácidos que hacen parte del mecanismo de hidrólisis de la sacarosa (Ver **Figura 9**). Los residuos se denominaron: D23, el cual actúa como nucleófilo, y E203, el cual es el catalizador ácido/base; siendo ambos residuos de tipo

Asp [Reddy y Maley, 1990]. Existen otros residuos aminoácidos en el sitio activo, los cuales se encargan del reconocimiento del sustrato, el residuo denominado D239 (una Gly) es importante para el enlace óptimo de la sacarosa y la enzima. Además, existe un residuo denominado Y239, constituido por un residuo de Tyr, y se cree es el encargado de regular el pKa de la cadena que contiene el residuo E203. En la **Figura 10** se puede observar las interacciones producidas en el sitio activo de la invertasa durante la hidrólisis de la sacarosa [Lammens, y col; 2008].

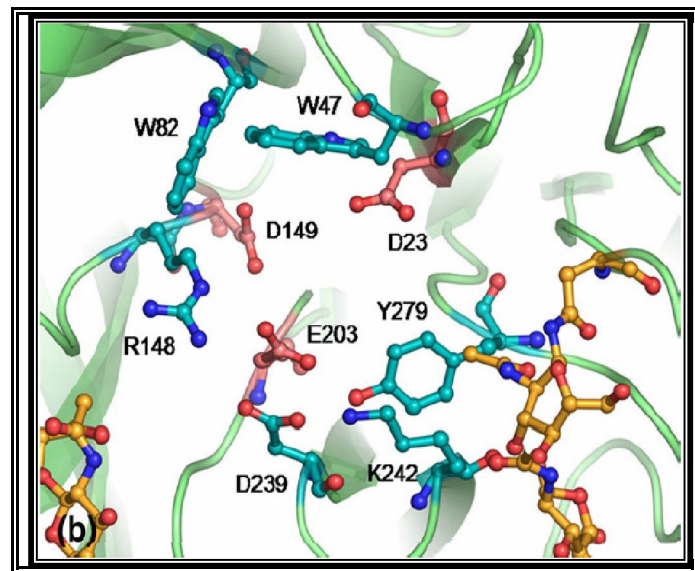


Figura 10: Representación del sitio activo de la invertasa de *Arabidopsis thaliana*

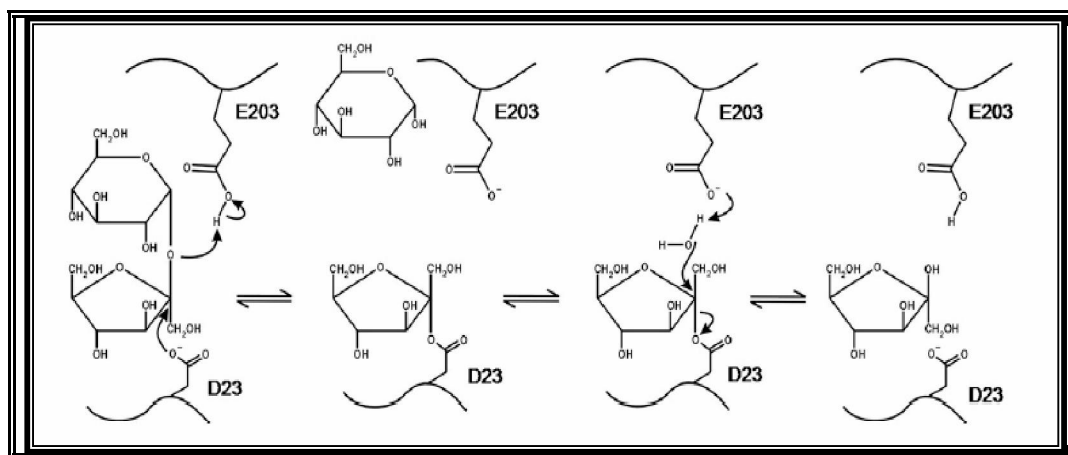


Figura 11: Interacciones entre los residuos aminoácidos del sitio activo de la invertasa durante la hidrólisis de la sacarosa

Para la optimización de la hidrólisis de la sacarosa se han utilizado diversas matrices biopoliméricas para la inmovilización por retención física de la invertasa, entre las cuales se encuentra la matriz de agarosa-goma guar. En este proceso de inmovilización se aprovecha que los biopolímeros, que son polisacáridos o proteínas en forma de hidrogeles, proveen un microambiente excelente para la compatibilidad con biocatalizadores sin presentar efectos tóxicos. La agarosa es un componente neutro del agar muy utilizado como agente gelificante en la industria alimentaria, ya que puede formar geles de fibras muy firmes y rígidas que permiten un buen acoplamiento con la enzima; por otro lado la goma guar, es un polisacárido complejo extraído de arbustos leguminosos como *Cyanosisi tetragonoloba*. La utilización de estos biopolímeros permite que la matriz de inmovilización sea lo suficientemente porosa para el paso de los productos y los reactivos, además el costo de la inmovilización se disminuye sin afectar los parámetros cinéticos de la enzima ni su estabilidad térmica. La invertasa se ha logrado inmovilizar en estos soportes con una eficiencia de un 91% **[Dipali B. y col, 2005]**.

Otra manera de inmovilizar la invertasa es por medio de encapsulación en granos de alginato de calcio. El alginato es un polisacárido obtenido de algas marrones como la *Laminaria hyperborea*, que prolifera en las costas de Noruega, las cuales contienen entre un 20% y 30% de alginato sobre su peso seco. Las soluciones de alginato varían su viscosidad dependiendo de la concentración. A altas concentraciones pueden formar un gel muy resistente que puede ser utilizado en la industria de alimentos sin ninguna contraindicación; utilizando este polisacárido como matriz de inmovilización se ha obtenido una alta actividad catalítica y una estabilidad térmica sin mayores modificaciones respecto a la enzima soluble. Además, la enzima inmovilizada pudo utilizarse en un reactor para la producción continua de azúcar invertido, durante 55 horas seguidas sin afectar significativamente la cantidad de producto obtenido **[Milovanovic y col, 2006]**.

De igual manera la invertasa se ha inmovilizado en diferentes soportes inertes, en estos casos la actividad catalítica de la enzima depende de factores como el tamaño, forma y composición del soporte así como del tipo unión con éste. Las enzimas inmovilizadas de esta forma se unen al soporte por sus componentes activos los cuales son generalmente los grupos amino de los aminoácidos **[Amaya-Delgado y col, 2006]**. Los soportes deben poseer capacidad para formar un gran número de enlaces y poder inmovilizar buena cantidad de

enzima; además deben ser químicamente estables e inertes, así como resistentes a contaminación microbológica [Emregul y col, 2006]. Los soportes fabricados con Concavalina A son los que presentan mayor interés debido a la habilidad de esta glicoproteína de formar complejos muy estables con biomoléculas que poseen grupos glicosil y manosil. Utilizando este soporte en la inmovilización de la enzima, la actividad específica de la invertasa aumentó de 495 U/mg (actividad específica de la enzima soluble) a 2061 U/mg (actividad específica de la enzima inmovilizada). De igual manera, disminuyó a la mitad el Km con respecto a la enzima soluble, lo que significa que la afinidad de la enzima por el sustrato aumentó dos veces cuando se inmovilizó en este soporte [Bahar y col; 2004].

A pesar de los excelentes resultados en la inmovilización de la invertasa utilizando soportes de Concavalina A se han realizado estudios con otro tipo de soportes como el DOWEX®, que es una resina de intercambio iónico constituida por poliestireno. Esta resina ha sido utilizada ampliamente en la industria y en el trabajo de laboratorio en la purificación, concentración y fraccionamiento en equipos de cromatografía; debido a su alta capacidad de intercambio iónico. Con la utilización de este soporte los parámetros catalíticos de la invertasa, como su Km, no se afectaron y además el porcentaje de hidrólisis de la sacarosa fue de un 95%. [Tomotani y col, 2006].

Otros soportes utilizados recientemente son los de poliacrilamida-gelatina y los de nylon-6. En el primer caso se utilizó la gelatina, uno de los productos de la hidrólisis del colágeno, como soporte, debido a su costo, su inercia fisiológica y su estabilidad estructural. Además, por poseer grupos funcionales reactivos como los hidroxilo, carboxilo y amino puede inmovilizar una gran cantidad de enzima. La poliacrilamida se utilizó como material de relleno para incrementar el área superficial del soporte. En este estudio las muestras inmovilizadas tenían una buena estabilidad y pudieron ser utilizadas por periodos de dos meses sin obtener una pérdida significativa de su actividad catalítica. El valor de pH óptimo para la invertasa no se vio afectado por la inmovilización y el rango de temperatura óptima se amplió significativamente. [Emregul y col, 2006].

Para el caso de los soportes con nylon-6 la enzima fue tratada previamente con un agente entrecruzante como el glutaraldehído. Al igual que en las inmovilizaciones anteriores, se

incrementó el pH y la temperatura óptima de la enzima. Sin embargo, lo especial en este experimento es el soporte utilizado, ya que el nylon-6 es un material no tóxico, económico y de fácil manejo. Además, cumple con todas las características antes mencionadas para un buen soporte, es decir, es inerte y estable así como microbiológicamente resistente y con una buena capacidad para formar enlaces con los sitios reactivos de la enzima [Amaya-Delgado y col; 2006].

Sin embargo, se está utilizando recientemente un tipo de inmovilización que consiste en el entrecruzamiento de las enzimas. Entre las técnicas de entrecruzamiento se distinguen las siguientes: Entrecruzamiento de enzimas disueltas (CLEs), entrecruzamiento de cristales de enzimas (CLECs) y entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs). La técnica de formación de CLEAs consiste en entrecruzar covalentemente la enzima previamente precipitada por sales inorgánicas o solventes orgánicos, que permiten la agregación de la enzima sin llegar a desnaturalizarla cuando el agente precipitante es escogido adecuadamente [H.W. Yu y col, 2006].

Los CLEs, a diferencia de los CLEAs, utilizan la enzima disuelta y la entrecruzan covalentemente por medio de un agente bifuncional sin previa precipitación; esto hace que esta técnica requiere muchos mas factores a analizar, por ejemplo, la cantidad de agente entrecruzante, el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Además presentan inconvenientes como la baja retención en la actividad de la enzima, baja reproducibilidad y poca resistencia mecánica de la enzima insoluble obtenida.

El proceso de entrecruzamiento, bien sea en CLEAs o CLEs, consiste en la formación de bases de *Schiff* por la reacción de los grupos aldehído del agente entrecruzante y los grupos amino de los residuos aminoácidos de las enzimas. La diferencia entre CLEAs y CLEs radica en la proximidad de las moléculas de proteína y la posibilidad de un entrecruzamiento mas ordenado. Se ha utilizado el entrecruzamiento de agregados enzimáticos para inmovilizar enzimas como la lipasa *Candida rugosa* y la Tripsina [Ping Chen y col, 2006].

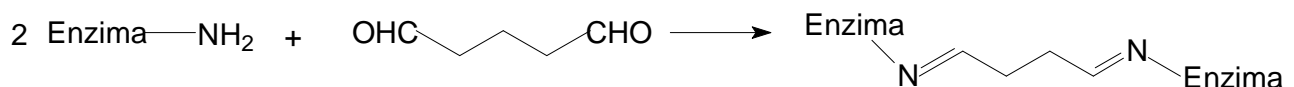


Figura 12. Reacción entre el glutaraldehído y los residuos amino de las enzimas

2. METODOLOGÍA

2.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA INVERTASA SOLUBLE

Se cuantificó la concentración de proteínas en la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* en un espectrofotómetro marca Spectronic 20 Genesis mediante el método de Bradford (1975). Se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (BSA), con concentraciones entre 0.1 y 1 mg/ml para la curva patrón del método.

En un tubo de ensayo se adicionaron 2.5 ml de Bradford y 50 μ L de enzima (BSA para la curva patrón), se dejó reaccionar durante 3 minutos y se determinó la absorbancia a 595nm. La concentración de proteínas se estableció por interpolación en la curva patrón la cual relaciona la concentración de glucosa frente la absorbancia. Esta concentración se expresa en mg de proteína por ml de solución. Todos los análisis se desarrollaron por triplicado.

2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

La determinación de la actividad de la invertasa se determinó utilizando como sustrato sacarosa a una concentración de 125 g/L a diferentes tiempos de reacción, de forma de determinar el rango de linealidad. Para cuantificar los productos formados, azúcares reductores, se utilizó el método del ácido di-nitrosalicílico (DNS) [Gail Lorenz, 1959]. Las curvas patrones respectivas se llevaron a cabo utilizando glucosa comercial, con concentraciones entre 0.1 y 1 mg/ml y cuantificando a 540 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic 20 genesis.

Los ensayos enzimáticos fueron realizados a Temperatura ambiente, y se utilizó un buffer de acetato de sodio 50 mM a pH 4.5. Para establecer el rango de linealidad de las reacciones catalizadas por le enzima se utilizaron diluciones de la enzima de 1/50, 1/80, 1/100, 1/160 y 1/200 de una solución original de 10 mg de enzima sólida/mL.

2.3 ENTRECruzamiento INTERMOLECULAR DE LA INVERTASA

2.3.1 Elaboración de CLEAs

Para la elaboración de los CLEAs se mantuvo constante la temperatura de reacción, la cual fue de 4°C, y la concentración del agente entrecruzante (glutaraldehído, 1% v/v). Se utilizó como agente precipitante Sulfato de amonio; a concentraciones de 35%, 50% y 60% (p/v).

El procedimiento para la formación de los agregados enzimáticos se presenta en la siguiente figura:

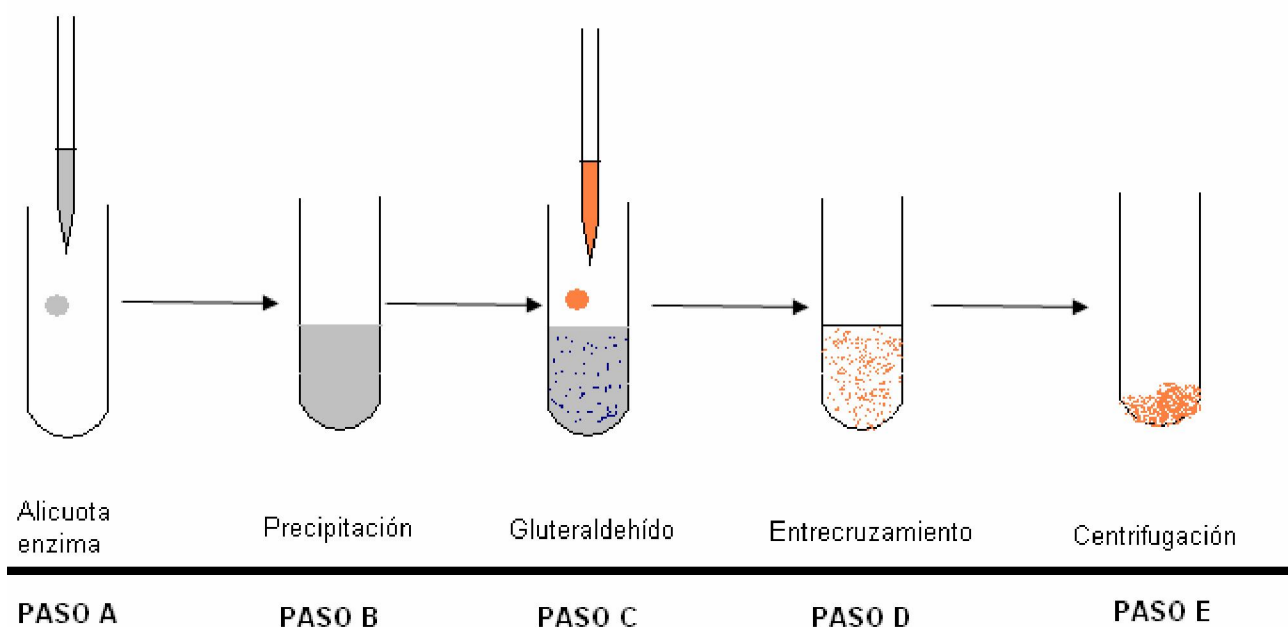


Figura 13: Procedimiento para la formación de agregados Enzimáticos

1. Paso A: Se adicionaron 0.5ml de invertasa 10g/L a diferentes pH en un tubo de ensayo.
2. Paso B: Se adicionaron 0.5ml de agente precipitante. Se permitió la precipitación por un tiempo de 2 horas con agitación constante y en un baño de hielo.
3. Paso C: Se adicionó a la mezcla glutaraldehído al 1% (v/v).
4. Paso D: Se permitió la reacción con el glutaraldehído durante 2, 8 y 12 horas.

5. Paso E: La mezcla de reacción se centrifugó, se realizaron lavados con buffer acetato al precipitado para eliminar el exceso de glutaraldehído; posteriormente se re-dispersaron los CLEAs en una cantidad de buffer y se les determinó la actividad enzimática como se menciona en la sección 2.3.

2.3.2 Elaboración de entrecruzados enzimáticos (CLEs)

Para la elaboración de entrecruzados enzimáticos se realizó el mismo procedimiento para la formación de CLEAs pero se omitió el paso B, es decir, no se realizó precipitación previa al entrecruzamiento. El tiempo de reacción y la concentración del glutaraldehído fueron los mismos que para la formación de CLEAs.

2.3.3 Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de proteínas de los CLEAs y los CLEs se tomaron alícuotas del sobrenadante obtenido en el paso E del procedimiento mencionado en la sección 2.3.1, y se utilizó el método de Bradford para determinar la cantidad de proteínas disueltas; después utilizando la siguiente fórmula se determinó la concentración de proteínas en los CLEAs y CLEs:

$$\text{Masa Proteína CLEA o CLE} = \text{Masa de Proteína enzima soluble} - \text{Masa Proteína sobrenadante}$$

2.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE A LOS CAMBIOS DE TEMPERATURA y pH

Se determinó la estabilidad térmica de la invertasa soluble e inmovilizada incubando la preparación enzimática respectiva en un termostato. Para llevar a cabo las pruebas de estabilidad se tomaron alícuotas de 250 µL de la enzima a diferentes tiempos y se determinó su actividad enzimática usando sacarosa 125 g/L como sustrato.

La estabilidad de las preparaciones soluble e inmovilizada se determinó a diferentes temperaturas (rango 35-75°C) y pH (rango 4.5-10). Adicionalmente se determinaron las constantes de inactivación a cada temperatura.

2.5 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA INVERTASA SOLUBLE FRENTE A SOLVENTES ORGÁNICOS MISCIBLES EN EL MEDIO DE REACCIÓN

La enzima soluble e inmovilizada fue incubada en THF, Etanol y Acetona, de concentraciones de 10%, 35% y 60% (v/v), bajo agitación constante y en un baño de hielo permitiendo que la temperatura se mantuviera a 4°C. Se tomaron alícuotas a los 5, 20, 40 y 60 minutos de incubación y se determinó la actividad como se indica en la sección 2.3 usando como sustrato sacarosa a 125 g/L.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA INVERTASA SOLUBLE

3.1.1 Cálculo de la actividad enzimática

Se determinó la actividad de la invertasa soluble de una concentración de 10mg/ml a pH 4.6, 5.6, 6.6, 7.9 y 10 y a diferentes diluciones. Para determinar la actividad específica de la enzima se calculó la concentración de proteína en la muestra original obteniéndose un valor de 0.796+/-0.051 mg/ml. La curva de calibración del método del Bradford y del DNS así como los cálculos realizados para la determinación de la concentración de proteína y actividad catalítica se muestran en los anexos A y B.

Los resultados obtenidos para la determinación de la actividad a cada pH se presentan a continuación:

Tabla 2: Actividades volumétricas y específicas de la invertasa a pH=4.6.

Dilución	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1/50	558	704
1/100	586	738
1/200	549	692
Promedio	564±19	711±24

Tabla 3: Actividades volumétricas y específicas de la invertasa a pH=5.6.

Dilución	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1/50	549	692
1/100	458	577
1/200	295	369
Promedio	434±129	546±164

Tabla 4: Actividades volumétricas y específicas de la invertasa a pH=6.6.

Dilución	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1/50	421	531
1/100	439	554
1/200	516	646
Promedio	458\pm50	577\pm61

Tabla 5: Actividades volumétricas y específicas de la invertasa a pH=7.9.

Dilución	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1/50	229	288
1/100	110	138
1/200	183	231
Promedio	174\pm60	219\pm76

Tabla 6: Actividades volumétricas y específicas de la invertasa a pH=10.

Dilución	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1/50	146	185
1/100	37	46
1/200	110	138
Promedio	98\pm56	123\pm71

Las actividades obtenidas tanto volumétricas como específicas de la invertasa a diferentes pH son:

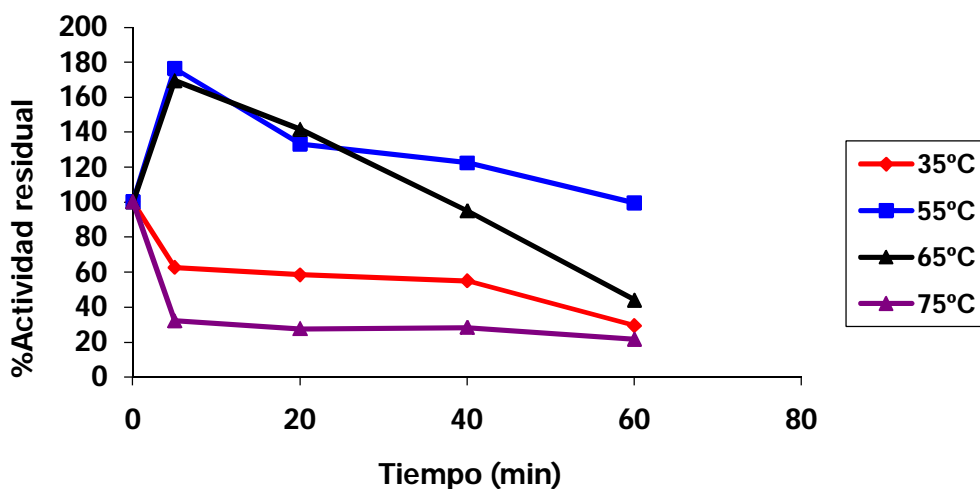
Tabla 7: Actividades volumétricas y específicas de la invertasa

pH	Actividad volumétrica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
4,6	564	711
5,6	434	546
6,6	458	577
7,9	174	219
10	98	123

Como se observa en la tabla la mayor actividad se encuentra en el rango de pH entre 4.6 y 6.6, lo que es característico para una invertasa de tipo ácida [Chia-Chen y col, 2006]. Estos resultados demostraron que las formas ácidas de esta invertasa son las más activas comprobándose que el equilibrio oligomérico estaría desplazado hacia las formas ácidas de la proteína soluble [Chia-Chen y col, 2006]. Sin embargo, fue necesario evaluar la estabilidad de estas preparaciones solubles y compararlas con aquellas inmovilizadas para comparar no sólo las propiedades de actividad de las preparaciones sino su estabilidad.

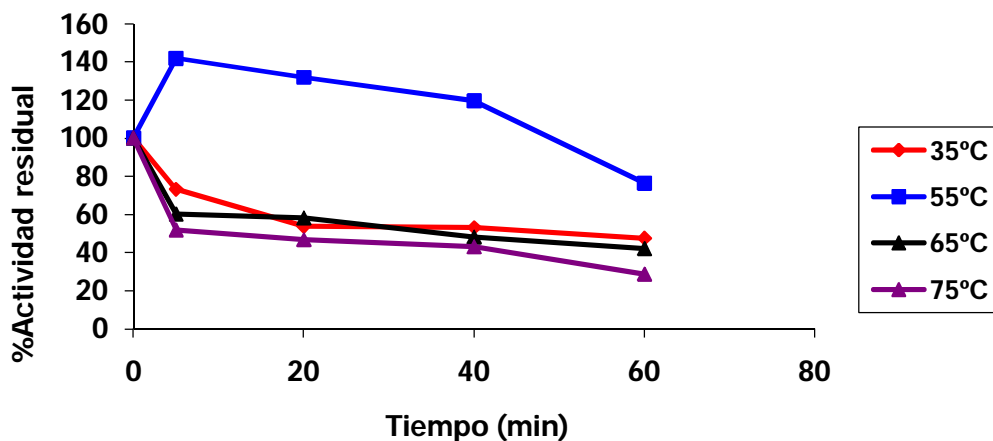
3.1.2 Determinación de la estabilidad térmica

Para el cálculo de la estabilidad térmica se realizaron gráficas de porcentaje de actividad residual frente a tiempo. Para hallar el porcentaje de actividad residual se tomó como 100% la actividad que la invertasa presenta a temperatura ambiente. A continuación, se muestran los resultados la variación de la actividad de la invertasa soluble frente a los cambios de temperatura en un tiempo de incubación de 0 a 60 minutos.



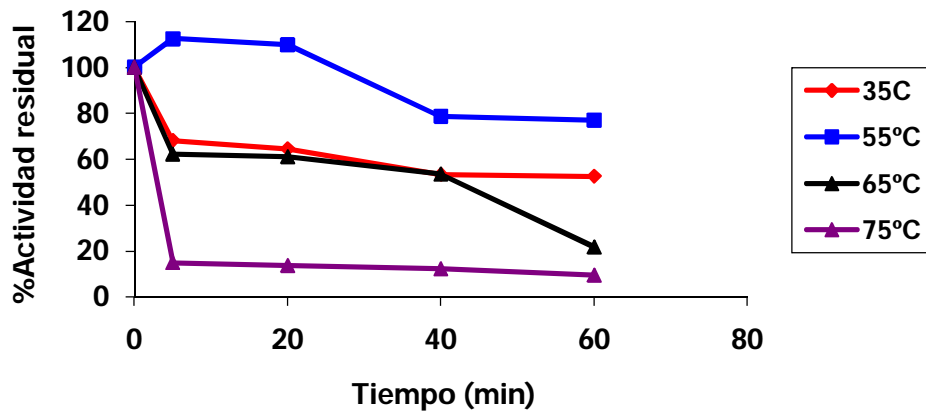
Gráfica 1. Estabilidad térmica de la invertasa soluble a pH=4.6

La temperatura óptima de la invertasa se encuentra en un rango de 50°C a 60°C según Milanovik et. al., [2006].; esto coincide con los datos presentados en la gráfica 1 donde se observa que a un temperatura de 55°C la invertasa tiene un 76% más de actividad que la invertasa a temperatura ambiente mientras que a 35°C ha perdido alrededor del 40% de su actividad original. Por otro lado, a una temperatura de 65°C se observa que la invertasa posee alrededor de un 69% más de actividad que la enzima a temperatura ambiente.



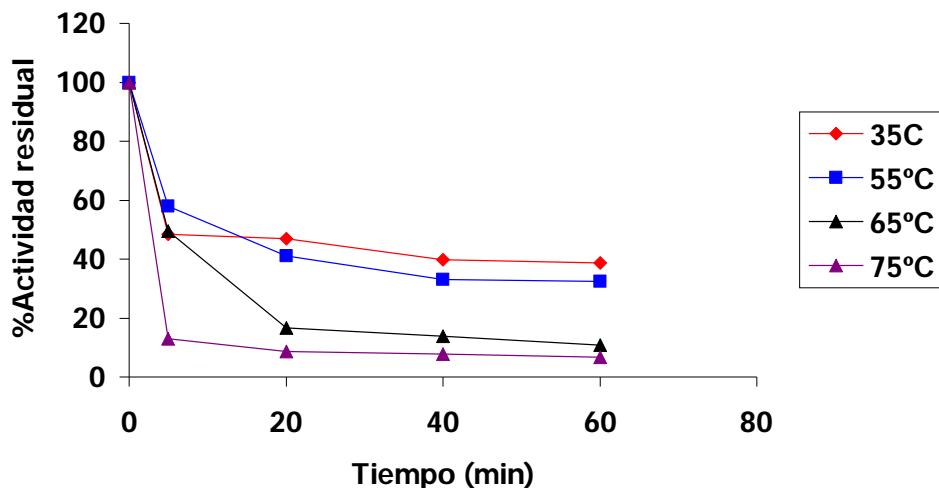
Gráfica 2. Estabilidad térmica de la invertasa soluble a pH=5.6

De igual manera se puede apreciar que la mayor actividad a pH=5.6 se presenta a una temperatura de 55°C y un tiempo de incubación de 5 minutos obteniéndose aproximadamente un 41% de actividad adicional a la enzima a temperatura ambiente. Sin embargo, a partir de este pH=5.6 se empieza a evidenciar una disminución significativa de la actividad a temperaturas superiores a 60°C. Esto se presentó posiblemente porque al variar el pH se modificaría la conformación de la enzima presentándose diferentes formas oligoméricas en cada pH, lo que estaría confirmando la hipótesis de las diferencias no sólo de actividad biológica sino que de estabilidad de los diferentes oligómeros de la invertasa [Esmon y col, 1986].



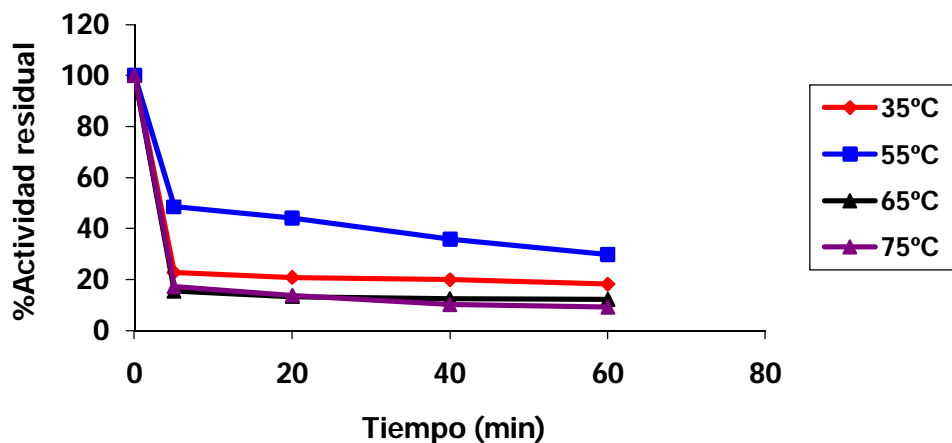
Gráfica 3. Estabilidad térmica de la invertasa soluble a pH=6.6

A pH= 6.6 y a 55°C y un tiempo de incubación de 5 minutos la enzima obtiene aproximadamente un 12% de actividad adicional a la invertasa a temperatura ambiente



Gráfica 4. Estabilidad térmica de la invertasa soluble a pH=7.9

En la gráfica 4 se observa que a una temperatura de 55°C y a un tiempo de incubación de 5 minutos la invertasa perdió aproximadamente el 50% de la actividad en comparación con la enzima a temperatura ambiente. Sin embargo, en estas condiciones la enzima fue más estable en comparación con las otras temperaturas, lo que indica que 55°C sigue siendo la temperatura óptima de la enzima.



Gráfica 5. Estabilidad térmica de la invertasa soluble a pH=10

Lo mismo se puede observar en la gráfica 5 donde a una temperatura de 55°C y un tiempo de incubación de 5 minutos la enzima perdió aproximadamente un 60% de su actividad original.

En general, en las gráficas se puede observar que la temperatura en la cual la enzima presentó su mayor actividad es a 55°C en un tiempo de incubación de 5 minutos y adicionalmente es a un pH de 4.6 donde la invertasa adquirió su mayor valor de actividad alcanzando un 176.27% de actividad residual.

Otro aspecto importante es que a pHs alcalinos la enzima es menos estable (por ej. a pH 10), decayendo su actividad enzimática rápidamente, lo cual demuestra que las formas diméricas de la enzimas son menos estables que las formas tetra u octaméricas que están en mayor proporción a pHs relativamente ácidos [Esmon y col, 1986].

Con estos resultados de estabilidad térmica, se determinaron las constantes de inactivación térmica para cada temperatura, con el fin de obtener una información cuantitativa de la pérdida de la actividad de la invertasa soluble. Los datos obtenidos de dichas constantes se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 8. Constantes de inactivación térmica de la invertasa en min^{-1}

pH	Temperatura (°C)			
	35	55	65	75
4,6	0,007	0,002	0,007	0,008
5,6	0,548	0,476	0,558	0,655
6,6	0,004	0,003	0,009	0,011
7,9	0,005	0,007	0,015	0,014
10	0,008	0,007	0,010	0,013

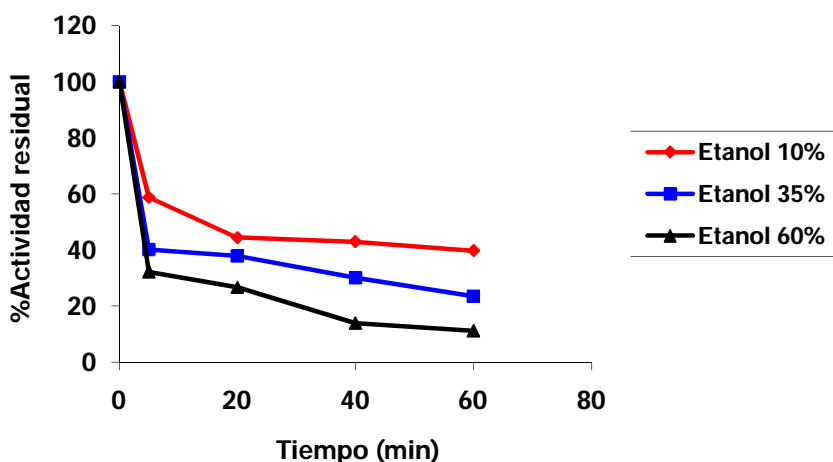
En la tabla 8 se observa que a la temperatura de 55°C se presentaron los menores valores para las constantes de inactivación, lo que indica que es a esta temperatura que la enzima pierde menos actividad. A 65°C y 75°C se observan valores más altos para estas constantes lo que significa que la actividad específica de la invertasa soluble comienza a disminuir. Esto coincide con lo presentado en las gráficas 1 a la 5.

Además, se puede ver que la enzima es alrededor de 2 órdenes de magnitud más estable a pH 4,6 que en el resto de los valores de pHs y condiciones de inactivación analizadas en este estudio. Esto podría deberse fundamentalmente a que el equilibrio oligomérico está desplazado hacia la forma más estable que es la de pH 4,6, la cual no fue sensible a inactivación en el rango de pH estudiado (pHs 4,6 a 10).

3.1.3. Determinación de la estabilidad frente a solventes orgánicos miscibles en agua.

3.1.3.1. Efecto del etanol sobre la estabilidad de la invertasa soluble

Para determinar la estabilidad enzimática de la invertasa se trabajó con mezclas etanol/buffer a concentraciones de 10%, 35% y 60% (v/v). A modo de ejemplo, se exponen los resultados obtenidos para pH 4,6, los cuales mostraron líneas de tendencia similar para los otros valores de pH.



Gráfica 6. Estabilidad de la invertasa soluble a pH=4.6 frente a mezclas de etanol/buffer

En la gráfica 6 se puede apreciar que la invertasa pierde actividad a medida que aumenta la concentración del etanol. Esto pudo ocurrir posiblemente debido a un cambio conformacional de la enzima en presencia de este solvente, lo que hace que las moléculas de agua unidas a la proteína se desorban de la estructura proteica. Otra causa de la pérdida de actividad se

puede atribuir a que el sitio activo de la enzima está constituido por residuos aminoacídicos ácidos los cuales pudieron reaccionar con el etanol para producir alquilglucósidos, lo cual puede cambiar significativamente la conformación del sitio activo, con la consecuente disminución significativa la capacidad catalítica de la invertasa [Rodríguez y col, 1997].

En la tabla 14 se presentan las constantes de inactivación a todos los pHs de la invertasa.

Tabla 9: Constantes de inactivación frente a la mezcla etanol/buffer de la invertasa en min^{-1}

pH	[Etanol] %(v/v)	Constantes inactivación k_i (min^{-1})		
		10%	35%	60%
4,6		0,0052	0,0079	0,0133
5,6		0,0024	0,0068	0,0118
6,6		0,0033	0,0050	0,0069
7,9		0,0031	0,0060	0,0114
10		0,0073	0,0273	0,0237

En la Tabla 9 se observa claramente como la invertasa perdió actividad a medida que se aumentó la concentración de la mezcla etanol/buffer; A una concentración de esta mezcla del 10% la enzima es aproximadamente 3 veces más estable que a una concentración del 60%, mientras que a una concentración del 35% es alrededor de 1.5 veces más estable en comparación con la mezcla del 60%. Se puede observar también el efecto de la estructura oligomérica de la enzima debido a la pérdida de actividad presentada a medida que se aumenta el pH, la enzima a pH 4.6 donde se encuentra en forma octamérica es 2 veces más estable que a pH 10 donde prevalecen las formas dimericas de la invertasa [Chia-Chen y col., 2007].

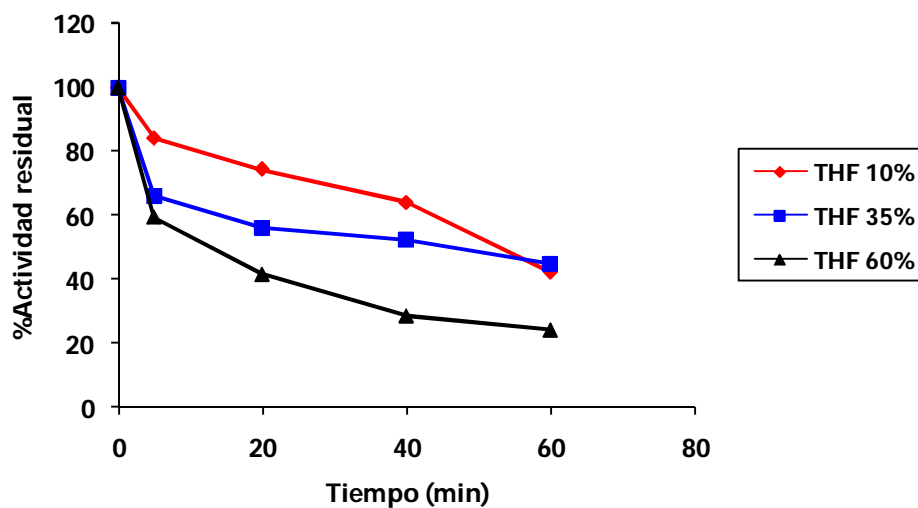
Adicionalmente a pH 4.6 la invertasa perdió aproximadamente el 50% de su actividad original al interactuar con la mezcla etanol/buffer al 10% (v/v), mientras que a pH 7.9 solo perdió alrededor del 10% de su actividad (Datos no mostrados). Esto puede ocurrir si se considera que en el primer pH la enzima se encuentra mayoritariamente en forma de

octámero [Esmon y col, 1986], por lo tanto, cualquier variación en el medio no solo afectó la conformación del sitio activo sino que además se vio afectada la conformación total de la enzima facilitando el paso de octámero a hexámero u oligómeros de menor tamaño.

A un pH de 10 la actividad de la invertasa solo dependerá de la conformación del sitio activo por lo que la pérdida de la actividad fue mucho más rápida y notoria perdiendo aproximadamente el 70% de su actividad original al interactuar con la mezcla etanol/buffer al 10% (v/v) (datos no mostrados)

3.1.3.2. Efecto del THF sobre la estabilidad de la invertasa soluble

Se utilizaron mezclas THF/buffer a concentraciones de 10%, 35% y 60% v/v. A modo de ejemplo se exponen los resultados obtenidos a pH de 4.6:



Gráfica 7. Estabilidad de la invertasa soluble a pH=4.6 frente a mezclas THF/buffer.

El THF es un solvente orgánico soluble en agua y muy polar, capaz de aceptar protones actuando como una base de Lewis; por esta razón es posible que interactúe de alguna manera con los residuos ubicados en la superficie de la enzima modificando la conformación de esta y afectando la capacidad catalítica de la invertasa. Esto puede deducirse de los datos obtenidos en la gráfica 7, en la cual se puede observar que a medida que se aumentó la concentración de THF disminuyó la actividad enzimática de la invertasa [Kilbanov, 1997].

El mismo comportamiento se puede observar en los demás pH donde la actividad de la enzima disminuyó a medida que aumentó la concentración de la mezcla THF/buffer. En la tabla 10 se presentan las constantes de inactivación de la invertasa en min^{-1} y en ella se aprecia que frente a una concentración del 10% y 35% de la mezcla THF/buffer la enzima fue alrededor de 3 y 2 veces más estable respectivamente que a una concentración del 60%.

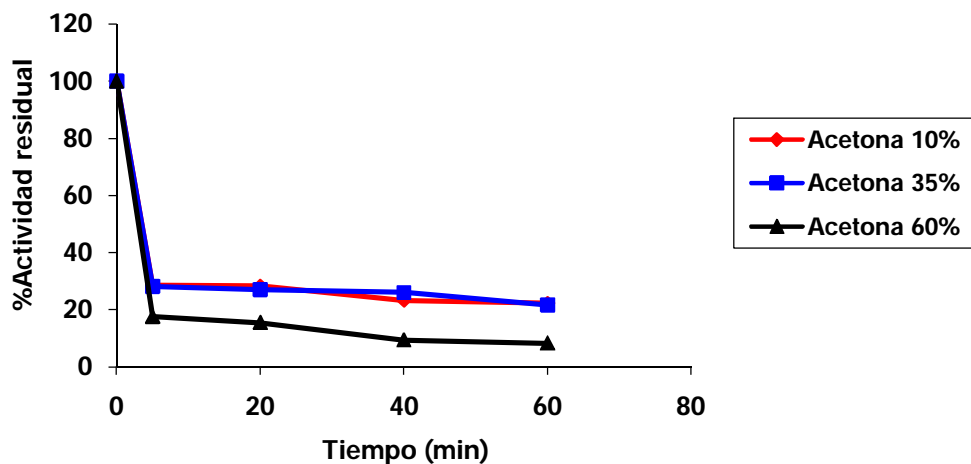
Tabla 10: Constantes de inactivación frente a la mezcla THF/buffer de la invertasa en min^{-1}

pH	[THF] % (v/v)	Constantes inactivación k_i (min^{-1})		
		10%	35%	60%
	4,6	0,0055	0,0046	0,0094
	5,6	0,0028	0,005	0,0143
	6,6	0,0051	0,0061	0,0072
	7,9	0,0038	0,0045	0,0067
	10	0,0005	0,0005	0,0079

En este caso el efecto de las formas oligoméricas se puede apreciar con mayor facilidad; si se tiene en cuenta que a pH de 4.6 el equilibrio se desplaza hacia la forma de octámero la cual es más fácil de disociar a oligómeros de menor tamaño, por lo tanto es razonable observar que la inactivación hubiese sido ligeramente mayor con respecto a los demás pHs ya que al estar en contacto con la mezcla THF/buffer ocurren los procesos de disociación junto con el proceso de interacción del solvente con los aminoácidos superficiales compitiendo con la interacción que ocurre entre estos y las moléculas de agua del medio, produciendo cambios conformacionales en la proteína.. De igual manera a pH de 10 el equilibrio oligomérico se desplaza hacia la forma de dímero la cual no posee mas posibilidades de disociación por lo tanto su inactivación obedeció únicamente a la interacción del THF con el sitio activo de la proteína [Esmon y col, 1986].

3.1.3.3. Efecto de la acetona sobre la estabilidad de la invertasa soluble

Se utilizaron mezclas acetona/buffer a concentraciones de 10%, 35% y 60% v/v. A modo de ejemplo se exponen los resultados obtenidos a pH de 4.6:



Gráfica 8. Estabilidad de la invertasa soluble a pH=4.6 frente a mezclas acetona/buffer

En la gráfica 8 se observa la disminución de la actividad catalítica de la invertasa a medida que aumenta la concentración de acetona. Al igual que el THF la acetona es un solvente muy polar, por lo tanto al interactuar con los residuos aminoacídicos de la superficie de la enzima se produjo un posible cambio conformacional significativo que afectó la capacidad catalítica de la enzima haciendo que esta disminuyera. Es probable que se rompan interacciones de hidrógeno que estabilizan la conformación 3D de la proteína o que se pierdan muchas moléculas de agua unidas a la proteína, todo lo cual afecta la actividad enzimática de la invertasa en el tiempo [Dordick, 1989].

En la tabla 11 se presentan las constantes de inactivación frente a la acetona en min^{-1} a los todos los pHs de la enzima, allí se observa de igual manera la variación de la estabilidad con el aumento de la concentración de la mezcla acetona/buffer presentándose al 10% y 35% formas de la enzima 2 y 1.5 veces mas estables que las presentadas a una concentración del 60%.

Tabla 11: Constantes de inactivación frente a la mezcla acetona/buffer de la invertasa en min^{-1}

pH	[Acetona] (v/v)	Constantes inactivación K_i (min^{-1})		
		10%	35%	60%
	4,6	0,0075	0,0073	0,0137
	5,6	0,0055	0,0104	0,0087
	6,6	0,0059	0,008	0,0086
	7,9	0,0036	0,0069	0,0144
	10	0,0059	0,0103	0,0101

De la misma forma que con los solventes anteriores se observa que a pH de 4.6 se presentó una inactivación ligeramente mayor a causa de los formas de octámeros presentados a este pH, las cuales fueron afectados por dos procesos de inactivación: la disociación a oligómeros de menor tamaño y la interacción de los aminoácidos de la superficie de la enzima con el solvente produciendo un desplazamiento de las moléculas de agua de la proteína y por ende un cambio conformacional de la estructura de la enzima.

Para comparar los efectos de los diferentes solventes se presenta a continuación las constantes de inactivación obtenidas para cada concentración de la mezcla solvente/buffer:

Tabla 12: Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 10%

pH	Solvente	Constantes inactivación K_i (min^{-1})		
		Etanol	THF	Acetona
	4,6	0,0052	0,0055	0,0075
	5,6	0,0024	0,0028	0,0055
	6,6	0,0033	0,0051	0,0059
	7,9	0,0031	0,0038	0,0036
	10	0,0073	0,0005	0,0059

Tabla 13: Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 35%

pH	Solvente	Constantes inactivación		
		k_i (min^{-1})		
		Etanol	THF	Acetona
	4,6	0,0079	0,0046	0,0073
	5,6	0,0068	0,005	0,0104
	6,6	0,0050	0,0061	0,008
	7,9	0,0060	0,0045	0,0069
	10	0,0273	0,0005	0,0103

Tabla 14: Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 60%

pH	Solvente	Constantes inactivación		
		k_i (min^{-1})		
		Etanol	THF	Acetona
	4,6	0,0133	0,0094	0,0137
	5,6	0,0118	0,0143	0,0087
	6,6	0,0069	0,0072	0,0086
	7,9	0,0114	0,0067	0,0144
	10	0,0237	0,0079	0,0101

En las tablas 12, 13 y 14 se observa que el solvente en el cual la invertasa soluble presentó mayor inactivación es la acetona, observándose las constantes de inactivación más altas.

3.2 ESTUDIO DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE INVERTASA ENTRECruzADA

3.2.1 Cálculo de la actividad enzimática de los CLEAs

Basándose en los datos obtenidos para la estabilidad de la invertasa frente a la acetona, el etanol y el THF se descartaron estos solventes como agentes precipitantes. Es por ello que

se utilizó sulfato de amonio saturado como agente precipitante a concentraciones de 35%, 50% y 60% p/v. La etapa de entrecruzamiento se permitió hasta un tiempo máximo de 12 horas para evitar una posible inactivación de la enzima a causa del glutaraldehído.

En la Tabla 15 se observa el resumen de los datos para los diferentes CLEAs obtenidos a 12h de entrecruzamiento y se compara con los datos de la enzima soluble

Tabla 15: Comparación de actividades entre CLEAs y enzima soluble¹

pH	Actividad invertasa soluble (U/mg)	Actividad CLEAs (U/mg)		
		[(NH ₄) ₂ SO ₄] 35%	[(NH ₄) ₂ SO ₄] 50%	[(NH ₄) ₂ SO ₄] 60%
4,6	711	323,00	415,06	223,19
5,6	546	434,52	109,75	271,75
6,6	577	188,57	276,18	268,56
7,9	219	197,93	132,03	174,90
10	123	156,62	88,38	110,15

¹Datos obtenidos con glutaraldehído al 1% (v/v) y 12 h de entrecruzamiento proteico. Cantidad de Enzima inicial = 0.793 mg proteína/mL

Como se observa en la tabla todos los valores de actividad específica de los CLEAs obtenidos fueron significativamente más bajos que la actividad de la invertasa soluble, a excepción de los CLEAs formados a pH 10 donde la actividad se logró aumentar en un 27%, a una concentración del 35% de agente precipitante, de la actividad original. Sin embargo, se debe tener en cuenta que a este pH no se encuentran las formas más estables de la invertasa [Esmon y col, 1986].

Es posible que la inactivación de la enzima ocurriera por una reacción de los iones amonio (NH₄⁺) con los grupos ácidos del sitio activo de la invertasa [Shulke y Schmid, 1988], por tal razón el (NH₄)₂SO₄ no fue un agente precipitante adecuado para la preparación de CLEAs.

3.2.2 Cálculo de la actividad enzimática de los CLEs

Basándose en los datos obtenidos de actividad de CLEAs se prosiguió a realizar el entrecruzamiento sin la etapa de precipitación para la formación de CLEs. Se utilizaron los

mismos tiempos de reacción de entrecruzamiento con el gluteraldehído; es decir; 2, 8 y 12 horas de entrecruzamiento. De igual manera se determinó la concentración de proteínas y la actividad enzimática obteniéndose los siguientes resultados. A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos a 12 h de entrecruzamiento.

Tabla 16: Cantidad de proteína obtenida en los CLEs obtenidos a los diferentes pH y 12 h de entrecruzamiento¹.

pH \ Tiempo	12 h
4,6	0,450
5,6	0,563
6,6	0,515
7,9	0,325
10	0,228

¹ Concentración inicial de invertasa para formación de CLEAs fue 0.793 mg/mL. Volumen de solución de proteína usado para formar CLEAs = 1 mL.

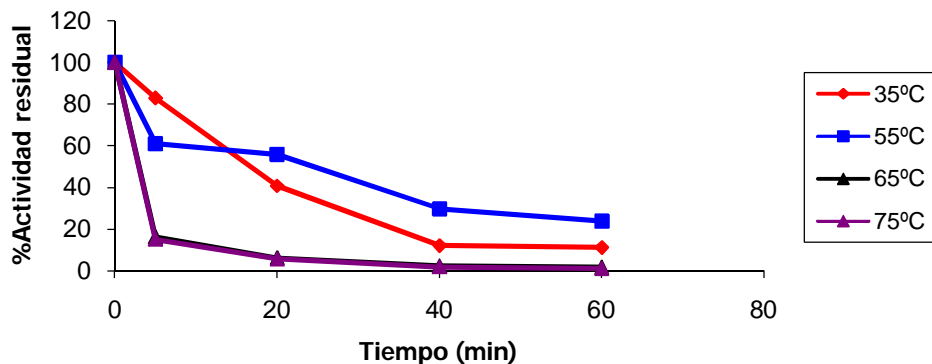
Tabla 17: Actividad enzimática en U/mg de proteína precipitada de los CLEs obtenidos a 12 h de entrecruzamiento

pH \ Tiempo	12 h
4.6	914,29
5.6	597,63
6.6	610,39
7.9	305,2
10	142,42

De la tabla 17 se observa que los CLEs alcanzaron una actividad mayor, lográndose superar la actividad enzimática de la invertasa soluble. Con estos datos se puede confirmar que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ está directamente involucrado con la inactivación presentada por los CLEAs.

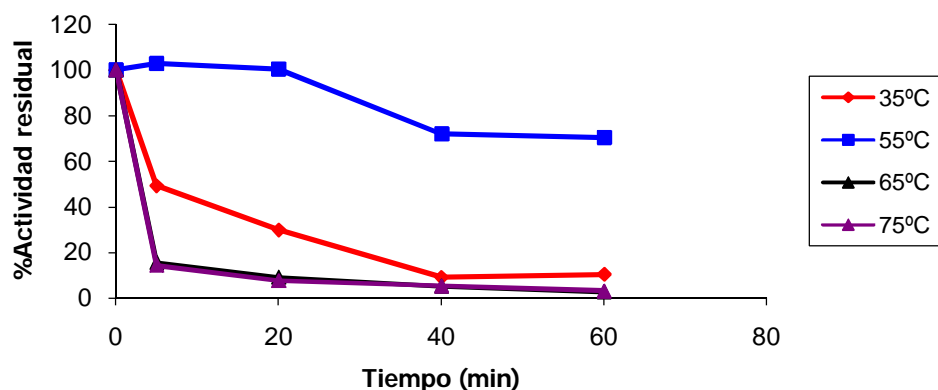
Una vez obtenidos entrecruzados enzimáticos más activos que la invertasa soluble se prosiguió a la determinación de la estabilidad térmica y frente a los solventes orgánicos acetona, etanol y THF.

3.2.3 Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa



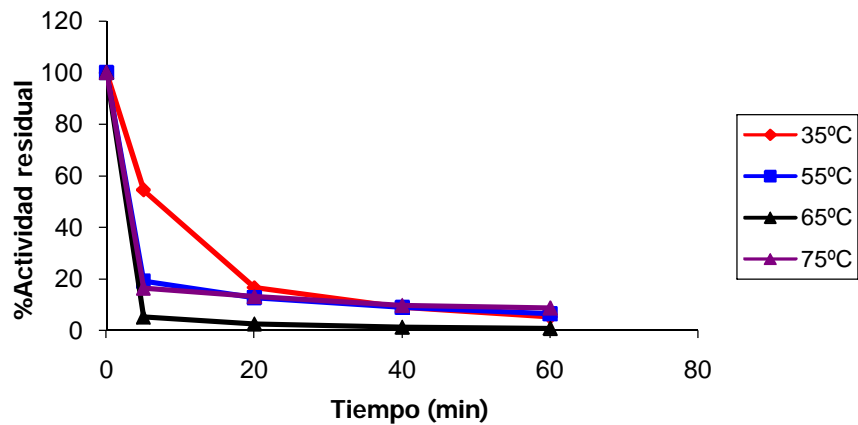
Gráfica 9: Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH 4.6

En la gráfica se observa que a una temperatura de 35°C los CLEs se inactivan rápidamente perdiendo aproximadamente el 80% de la actividad a los 60 minutos de incubación. A una temperatura de 55°C la pérdida de actividad es menos drástica, sin embargo, a los 60 minutos de incubación se ha perdido alrededor del 75% de la actividad. A las temperaturas de 65°C y 75°C la actividad se perdió prácticamente desde los 5 minutos de incubación llegando a valores menores del 20% de la actividad original.



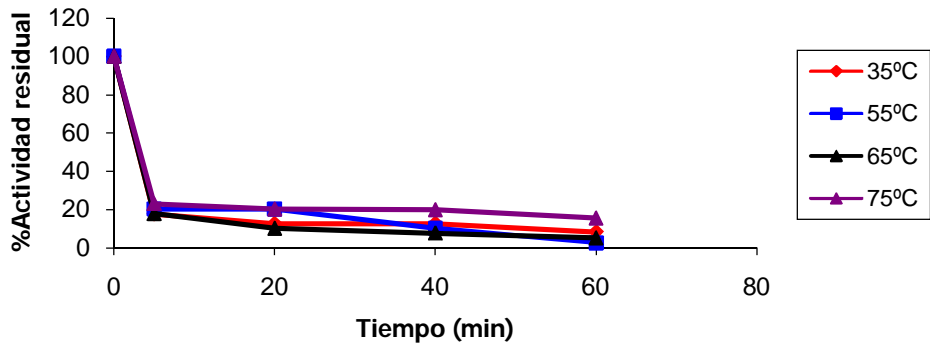
Gráfica 10: Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH 5.6

A un pH de 5.6 y una temperatura de 35°C, los CLEs pierden actividad rápidamente llegando a tener aproximadamente el 50% de la actividad original a los 5 minutos de incubación. Sin embargo, a una temperatura de 55°C, la actividad de los CLEs se incrementa aproximadamente en un 2% a los 5 minutos de incubación; a partir de ese punto se comienza a presentar una inactivación paulatina mostrando una buena estabilidad a esta temperatura. Sin embargo, al aumentar la temperatura de incubación a 65°C y 75°C la pérdida de actividad es más pronunciada llegando a desactivarse por completo a los 60 minutos de calentamiento.



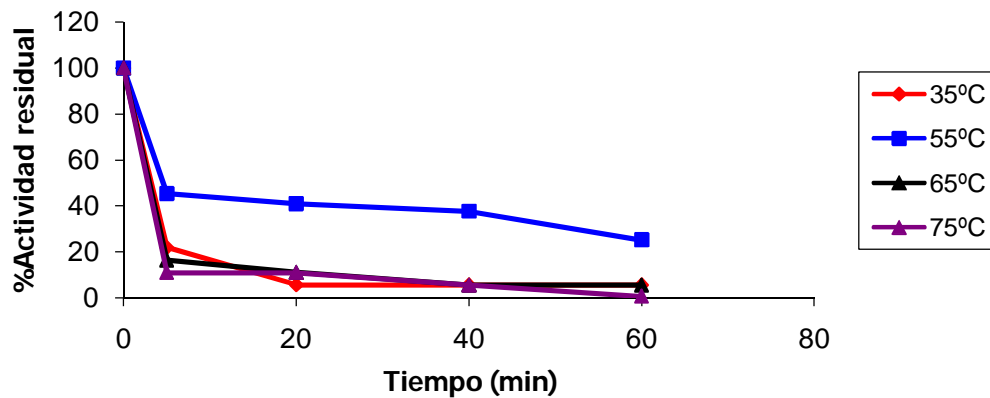
Gráfica 11: Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH de 6.6

A pH de 6.6 la inactivación es muy drástica a partir de 55°C, donde a los 5 minutos de incubación se ha perdido casi el 80% de la actividad original.



Gráfica 12: Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH 7.9

Lo mismo se puede observar a un pH de 7.9 donde se ha perdido alrededor del 80% de la actividad original de los CLEs a los cinco minutos de incubación a una temperatura de 35°C.



Gráfica 13: Estabilidad térmica de los CLEs de invertasa a pH de 10

A pH de 10 se vuelve a observar una menor inactivación a 55°C, sin embargo a las temperaturas de 35°C, 65°C y 75°C la inactivación sigue el mismo patrón presentado por los demás pHs, una inactivación drástica a partir de los 5 minutos de incubación.

En los pH de 6.6 y 7.9 los CLEs presentaron una tendencia a inactivarse a partir de los 35°C y 5 minutos de incubación. A los de 4.6, 5.6 y 10 los CLEs presentaron una mayor estabilidad a 55°C en comparación con las demás temperaturas, sin embargo, no presentan la activación adicional presentada en la enzima soluble donde a esta temperatura se alcanzan hasta 70% de actividad adicional.

Por esta razón, se puede decir que los CLEs de invertasa obtenidos a las 12 horas de entrecruzamiento son más activos pero menos estables a los cambios de temperaturas que la invertasa soluble.

Para tener una comparación cuantitativa de la inactivación sufrida por los CLEs, se determinaron las constantes de inactivación térmica. Estos datos se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 18. Constantes de inactivación térmica de CLEs de invertasa en min^{-1}

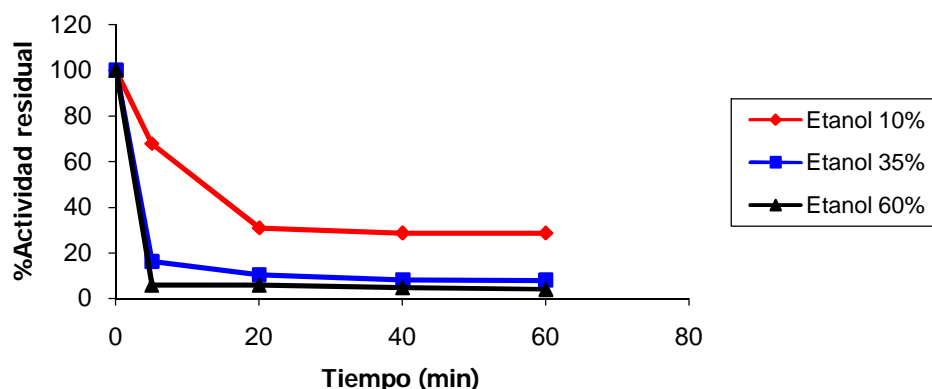
pH	Temperatura (°C)			
	35	55	65	75
4,6	0,016	0,009	0,025	0,028
5,6	0,016	0,003	0,021	0,019
6,6	0,020	0,015	0,013	0,027
7,9	0,011	0,008	0,020	0,015
10	0,017	0,007	0,016	0,029

En la tabla 18 se observa que a una temperatura de 55°C las constantes para los diferentes pH son las más bajas en comparación con las otras temperaturas, es decir, es a esta temperatura donde se presentan una menor inactivación. A las temperaturas de 65°C y 75°C se observan los valores más altos para estas constantes, lo que implica que es a estas temperaturas donde la enzima comienza a perder actividad.

3.2.4 Estabilidad de los CLEs de invertasa frente a solventes orgánicos miscibles en agua

3.2.4.1 Efecto del etanol sobre la estabilidad de CLEs de invertasa

Se utilizó mezclas de etanol/buffer a concentraciones de 10%, 35% y 60% v/v. Se presentan a modo de ejemplo la gráfica para los datos obtenidos a pH 4.6:



Gráfica 14: Estabilidad de los CLEs de invertasa a pH 4.6 frente a mezclas etanol/buffer

En la gráfica 14 se puede observar que la actividad de los CLEs pierde alrededor del 33% de su actividad original a los cinco minutos de incubación y a una concentración del 10% de Etanol. Sin embargo, al aumentar el tiempo hasta los 60 minutos la actividad disminuye hasta obtener solo un 28% de la actividad original. Comparando estos datos con los obtenidos para la enzima soluble (Gráfica 6) se observa que la invertasa pierde alrededor de 42% de su actividad original a los cinco minutos de incubación con la misma concentración de etanol, aun así al transcurrir 60 minutos de incubación llega a una actividad del 40% de la actividad original, un valor mayor que el obtenido con los CLEs. Por lo tanto, se puede afirmar que la invertasa soluble es más estable frente al etanol al 10%.

Para una concentración del 35% los CLEs pierden más del 80% de la actividad original al transcurrir tan solo cinco minutos de incubación, caso contrario a lo sucedido con la invertasa soluble que aun conserva el 40% de la actividad original al mismo tiempo de incubación y

concentración de Etanol. De igual manera los CLEs obtenidos son más inestables que la invertasa soluble frente a Etanol al 35%. Lo mismo ocurre a una concentración del 60% donde a los cinco minutos de incubación los CLEs pierden alrededor del 95% de la actividad original, mientras la invertasa soluble solo pierde el 70% bajo las mismas condiciones de tiempo y concentración de etanol.

Los datos obtenidos para los CLEs de invertasa a pH 5.6 (datos no presentados) son bastante estables a una concentración del 10% de Etanol, obteniéndose una actividad del 420 U/mg lo que representa alrededor del 60.41% de actividad residual al transcurrir 60 minutos de incubación. Al comparar estos datos con los obtenidos para la invertasa soluble se observa un comportamiento similar a esta misma concentración de Etanol, presentándose un valor de actividad de 353 U/mg lo que corresponde a un 60.56% de actividad residual al transcurrir 60 minutos de incubación. Se puede afirmar entonces que la estabilidad de los CLEs y la invertasa soluble son similares.

Al 35% de etanol los CLEs pierden solo el 30% de la actividad original al transcurrir cinco minutos de incubación, mientras que la enzima soluble pierde el 47%; cuando el tiempo de incubación aumenta a 40 minutos los CLEs siguen reteniendo mayor actividad que la enzima soluble perdiendo solo 53% mientras la invertasa ha perdido 62%. Sin embargo, al llegar a 60 minutos de incubación los CLEs pierden el 77% de la actividad en comparación con la invertasa soluble que pierde el 70%. Aun así la estabilidad de los CLEs a pH de 5.6 a una concentración del 35% de Etanol es similar a la presentada por la enzima soluble a las mismas condiciones.

A una concentración del 60% los CLEs pierden más del 90% de la actividad original a partir de los 5 minutos de incubación, mientras la enzima solo pierde el 60% al mismo tiempo de incubación; al aumentar el tiempo de incubación a 60 minutos los CLEs pierden aproximadamente el 95% de la actividad mientras la enzima soluble pierde 85%,. De todo esto se puede afirmar que los CLEs son menos estables al etanol a una concentración del 60% que la invertasa soluble.

Los datos para los CLEs a pH 6.6 (datos no presentados) pierden el 60% de la actividad al transcurrir 5 minutos de incubación con etanol al 10% y al 35%, al mismo tiempo y a una concentración del 60% los CLEs pierden el 80% de la actividad original. Comparando estos datos con los obtenidos para la invertasa soluble, donde solo se pierde el 40% de la actividad a una concentración del 10% y 35% de etanol a los 5 minutos de incubación, se deduce que los CLEs obtenidos a pH de 6.6 son menos estables frente al etanol que la invertasa soluble.

De igual manera, al comparar los datos obtenidos para la invertasa soluble a pH de 7.9 se observa que los CLEs a estos pHs (datos no presentados) son menos estables que la enzima libre frente a la mezcla etanol/buffer.

Tabla 19: Constantes de inactivación frente a la mezcla etanol/buffer de la invertasa en min^{-1}

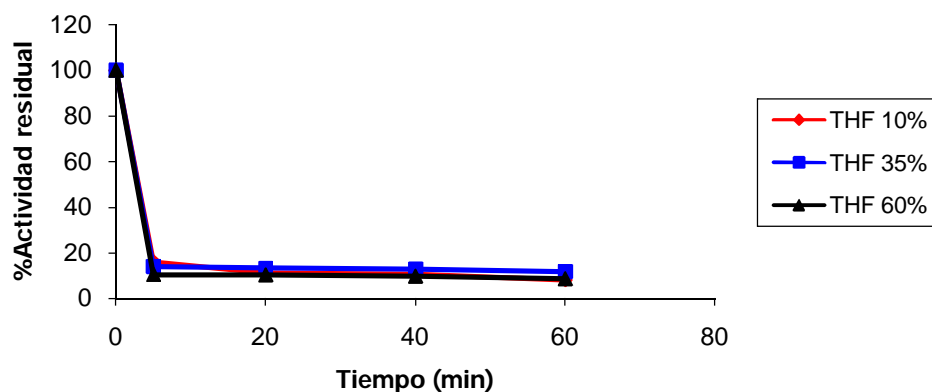
pH	[etanol] (v/v)	Constantes inactivación K_i (min^{-1})		
		10%	35%	60%
	4,6	0,0085	0,0136	0,0153
	5,6	0,0028	0,0086	0,0130
	6,6	0,0066	0,0072	0,0214
	7,9	0,0025	0,0065	0,0195
	10	0,0084	0,0083	0,0351

En la tabla 19 se presentan las constantes de inactivación obtenidas para los diferentes pHs y a las concentraciones utilizadas de la mezcla Etanol/buffer. En los datos se observa que a medida que aumenta la concentración de solvente, incrementa el valor de las constantes de inactivación, es decir, incrementa la inactivación de los CLEs. Al comparar con las constantes obtenidas para la enzima soluble (tabla 9) se observan valores mayores para las constantes de inactivación de los CLEs lo que implica una mayor inactivación frente al etanol que la presentada por la invertasa sin entrecruzar. Es posible que esto ocurra a una exposición mayor de los aminoácidos del sitio activo a la reacción con etanol permitiendo una desactivación mayor de los CLEs frente a este solvente. Esta mayor exposición del sitio

activo es probable que ocurra al momento de la reacción del glutaraldehído con los grupos amino de los residuos aminoacídicos de la enzima para la formación de bases de Schiff, produciéndose un ligero cambio conformacional que aunque no afecta la actividad de la invertasa en medio acuoso si facilita la interacción con los solventes adicionados al medio de reacción produciendo la inactivación drástica de la enzima [H.W. Yu y col, 2006]

3.2.4.2 Efecto del THF sobre la estabilidad de CLEs de invertasa

Se utilizó mezclas THF/buffer a concentraciones de 10%, 35% y 60% v/v. A manera de ejemplo se presenta la gráfica con los datos obtenidos para la enzima preparada a pH de 4.6:



Gráfica 15: Estabilidad de los CLEs de invertasa a pH 4.6 frente a mezclas THF/buffer

En la gráfica 15 se observa un cambio drástico en la actividad de la enzima al transcurrir los primeros cinco minutos de incubación a las tres concentraciones de solvente, pero al aumentar el tiempo de incubación la actividad de la enzima disminuyó muy poco manteniéndose casi constante, podría decirse entonces que tuvo cierta estabilidad frente al THF, o que existe una fracción de moléculas con mayor estabilidad. Sin embargo, al comparar las actividades obtenidas de los CLEs a una concentración del 10% con las obtenidas de la invertasa soluble (gráfica 7), se apreció que los CLEs perdieron alrededor del 80% de su actividad mientras la enzima solo el 16%. No obstante, al observar el comportamiento de la actividad de la enzima con el tiempo se pudo ver que esta disminuyó más rápido hasta llegar a un valor mínimo del 42% de la actividad original a la misma

concentración de solvente. Por lo tanto, se puede afirmar que los CLEs a pH 4.6 fueron más estables pero perdieron mayor actividad frente al THF que la invertasa soluble.

La actividad de los CLEs a pH de 5.6 (datos no presentados) decreció hasta llegar a un valor del 20% de la actividad original en presencia de una concentración del 10% de THF y a los 60 minutos de incubación. Sin embargo, después de los primeros cinco minutos de incubación se presentó un cambio brusco en la actividad disminuyendo hasta un 20% de actividad inicial, manteniéndose posteriormente constante en el tiempo evaluado. Al comparar estos resultados con los obtenidos para la enzima soluble se pudo afirmar que los CLEs a pH 5.6 son menos estables que la invertasa soluble frente a la mezcla THF/buffer.

A los pHs de 6.6 y 7.9 (datos no presentados) se observó un comportamiento similar donde decayó la actividad durante los primeros cinco minutos de incubación llegando a valores de 14% y 44% a una concentración de THF del 10% a los pH de 6.6 y 7.9, respectivamente. No obstante, al aumentar el tiempo de incubación a 60 minutos los valores alcanzados son de 25% y 32% respectivamente. Comparando estos datos con los de la invertasa soluble se observó que la estabilidad de la invertasa soluble sigue siendo mayor que los CLEs a pH de 6.6 y 7.9 frente a mezclas THF/buffer.

A pH de 10 (datos no presentados) la pérdida de actividad fue drástica durante los primeros cinco minutos de incubación, obteniéndose una caída del 12% de la actividad original. Sin embargo, comparando estos resultados con los obtenidos para la enzima soluble donde a los 5 y 60 minutos de incubación se perdió el 1% y el 7% respectivamente, se pudo afirmar que los CLEs a pH de 10 son menos estables que la enzima libre.

Al igual que el etanol el THF es un solvente soluble y polar por lo que al estar en el medio de reacción reemplaza al agua en la interacción con los aminoácidos ubicados en la superficie de la invertasa, produciendo de esta manera un cambio conformacional que afecta la actividad de la enzima [Dordick, 1989]. El hecho que la invertasa soluble fuera más estable al solvente que los CLEs ocurrió debido a un posible cambio en la estructura de la enzima al reaccionar con el gluteraldehído, este cambio pudo que no afectar de manera significativa la actividad de la enzima en medio acuoso pero pudo permitir una mayor interacción con el THF produciendo un notable cambio en la estabilidad de los CLEs.

Los CLEs obtenidos a pH de 10 fueron más estables que los CLEs obtenidos a los demás pHs; esto se debió a que a este pH sólo se encuentran principalmente las formas diméricas de la enzima, teniendo menos sitios de interacción entre la enzima y el THF, por lo tanto la actividad se ve menos afectada a concentraciones bajas del solvente. Aunque se debe recordar que los dímeros son las formas menos estables de la enzima [Esmon y col, 1986].

Tabla 20: Constantes de inactivación frente a la mezcla THF/buffer de la invertasa en min^{-1}

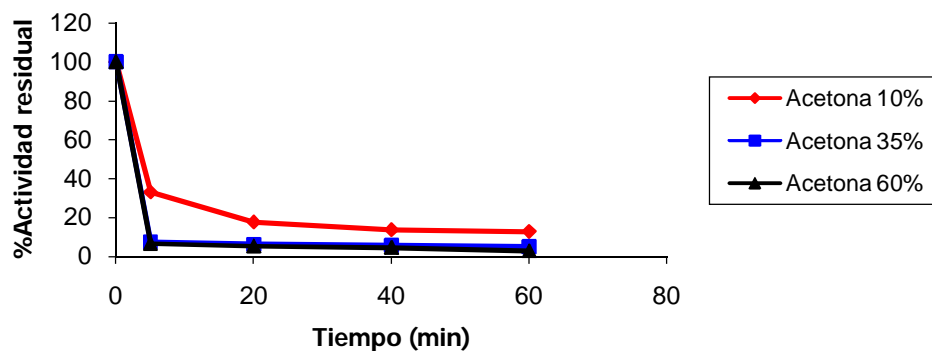
pH	[THF] (v/v)	Constantes inactivación K_i (min^{-1})		
		10%	35%	60%
	4,6	0,0129	0,0098	0,0112
	5,6	0,0072	0,0098	0,0125
	6,6	0,0066	0,0156	0,0115
	7,9	0,0056	0,0182	0,0186
	10	0,0018	0,0109	0,0162

En la tabla 20 se presentan las constantes de inactivación de la invertasa frente al THF, en ella se pudo observar el mismo comportamiento que el observado para el Etanol, es decir se presentó una mayor inactivación al aumentar la concentración de la mezcla THF/buffer. De igual manera, se pudo observar que a pH de 4.6 se presentó un ligero aumento en la inactivación debido a la presencia de octámeros en la solución lo que implica los procesos de disociación del oligómero. A su vez, se produce la interacción de los aminoácidos superficiales de la proteína con el solvente, lo cual provocó una inactivación mayor. Así, a pH de 10, se encuentran sólo las formas diméricas de la enzima lo que permite que la inactivación se debiera solamente a la competencia entre el THF y el agua por la interacción con los aminoácidos de la superficie de la enzima [Dordick, 1989].

Al comparar las constantes obtenidas para los CLEs y las obtenidas para la enzima soluble se observó que los valores de esta última son menores que los de la enzima entrecruzada, lo que implica que la estabilidad de la invertasa soluble frente a la mezcla THF/buffer es mayor que la presentada por los CLEs.

3.2.4.3 Efecto de la acetona sobre la estabilidad de CLEs de invertasa

Se utilizó mezclas de acetona/buffer a concentraciones de 10%, 35% y 60% v/v. A modo de ejemplo se presenta la gráfica con los datos de estabilidad obtenidos para la invertasa a pH 4.6:



Gráfica 16: Estabilidad de los CLEs de invertasa a pH 4.6 frente a mezclas acetona/buffer

Comparando los datos obtenidos en la gráfica 16 con los datos obtenidos para la invertasa soluble (gráficas 8) se pudo observar que al igual que con el etanol y el THF los CLEs preparados a los diferentes pHs analizados fueron menos estables frente a este solvente que la enzima libre.

A continuación se presentan las constantes de inactivación obtenidas para la mezcla acetona/buffer:

Tabla 21: Constantes de inactivación frente a la mezcla Acetona/buffer de la invertasa en min^{-1}

pH	Acetona (v/v)	Constantes inactivación k_i (min^{-1})		
		10%	35%	60%
	4,6	0,0123	0,0142	0,0177
	5,6	0,0110	0,0100	0,0169
	6,6	0,0139	0,0111	0,0228
	7,9	0,0086	0,0079	0,0141
	10	0,0055	0,0124	0,0265

En la tabla 21 se observa que las constantes con mayor valor fueron las obtenidas a una concentración del 60%, es decir los CLEs que interaccionan con una concentración del 10% y 35% de acetona/buffer son 2 y 1.8 veces más activas que los obtenidos a 60% (v/v). Comparando estas constantes con las obtenidas para la enzima soluble (tabla 11), se presentó un incremento de sus valores, indicando una mayor inactivación en los CLEs que en la proteína soluble. Para comparar los efectos de los diferentes solventes se presenta a continuación las constantes de inactivación obtenidas para cada concentración de la mezcla solvente/buffer:

Tabla 22: Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 10%

pH	Solvente	Constantes inactivación k_i (min^{-1})		
		Etanol	THF	Acetona
	4,6	0,0085	0,0129	0,0123
	5,6	0,0028	0,0072	0,0110
	6,6	0,0066	0,0066	0,0139
	7,9	0,0025	0,0056	0,0086
	10	0,0084	0,0018	0,0055

En esta tabla se pudo observar que la mayor inactivación de los CLEs a una concentración de la mezcla solvente/buffer se presenta con la Acetona, siendo los CLEs en etanol/buffer y THF/buffer 2.3 y 1.8 veces más estable.

Tabla 23: Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 35%

pH	Solvente	Constantes inactivación		
		k_i (min^{-1})		
		Etanol	THF	Acetona
	4,6	0,0136	0,0098	0,0142
	5,6	0,0086	0,0098	0,0100
	6,6	0,0072	0,0156	0,0111
	7,9	0,0065	0,0182	0,0079
	10	0,0083	0,0109	0,0124

Para una concentración solvente/buffer del 35% se observo nuevamente que la mayor inestabilidad de los CLEs se presentó frente a la mezcla acetona/buffer, siendo los CLEs en etanol/buffer y THF/buffer 1.3 y 1 veces más estables.

Tabla 24: Constantes de inactivación en min^{-1} de las mezclas solvente/buffer a una concentración del 60%

pH	Solvente	Constantes inactivación		
		k_i (min^{-1})		
		Etanol	THF	Acetona
	4,6	0,0153	0,0112	0,0177
	5,6	0,0130	0,0125	0,0169
	6,6	0,0214	0,0115	0,0228
	7,9	0,0195	0,0186	0,0141
	10	0,0351	0,0162	0,0265

Para una concentración solvente/buffer del 60% se observó de igual manera que la mayor inestabilidad de los CLEs se presentó frente a la mezcla acetona/buffer, siendo los CLEs en etanol/buffer y THF/buffer 1 y 1.5 veces más estables. En este caso el etanol presentó una capacidad de inactivación muy cercana a la de la acetona, esto posiblemente se debió a que al aumentar la concentración el etanol puede reaccionar más rápidamente con los residuos ácidos que forman el sitio activo de la invertasa para la formación de alquilglicósidos **[Rodríguez y col, 1997]**.

4. CONCLUSIONES

- Los CLEAs de invertasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados con sulfato de amonio, mostraron una actividad específica menor en comparación con la invertasa soluble.
- Los iones NH_4^+ produjeron probablemente una inactivación en la invertasa, por esta razón los CLEAs obtenidos con sulfato de amonio fueron 2 veces menos estables que la invertasa soluble. Es probable que el glutaraldehído haya afectado el sitio activo de la enzima, el cual está formado por aminoácidos ácidos.
- Los CLEs de invertasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), mostraron una actividad específica 1.5 veces mayor que la invertasa soluble. Esto demostró que las formas entrecruzadas de la proteína favorecen la obtención de formas más activas.
- Los CLEs de invertasa (*Saccharomyces cerevisiae*), presentaron una estabilidad térmica menor que la enzima soluble, siendo 2 veces menos estables que la enzima soluble. De igual manera, los CLEs de invertasa presentaron una estabilidad frente a solventes orgánicos solubles usados 1.5 veces menor que la presentada por la invertasa soluble.
- El pH y la temperatura en los cuales la invertasa presentó su mayor actividad fueron de 4.6 y 55°C respectivamente, lográndose un valor de 1253 U/mg; lo que corresponde a un 76% más de actividad que la presentada a temperatura ambiente.
- Los CLEs obtenidos presentaron un estado de entrecruzamiento bastante alto lo que impidió que corrieran a través de los geles de poliacrilamida de un 8%, no siendo posible la utilización de electroforesis para la determinación de las formas oligoméricas de la invertasa.

RECOMENDACIONES

- Utilizar solventes menos polares para disminuir la interacción con los residuos aminoacídicos de la superficie de la enzima y así evitar la inactivación de esta durante la precipitación de proteínas.
- Realizar la precipitación de la enzima con sales inorgánicas que no contengan iones amonio para así evitar la inactivación de la invertasa y conseguir la precipitación para la formación de CLEAs
- Determinar las isoformas entrecruzadas de invertasa a través de métodos como la cromatografía de filtración en gel, ya que por electroforesis SDS-PAGE no se lograron conseguir poros lo suficientemente grandes para el paso de los entrecruzados enzimáticos de invertasa.
- Realizar un análisis de microscopio de barrido electrónico (SEM) para evaluar el tipo de estructura tridimensional de los CLEAs y los CLEs

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Kilbanov. **Why are enzymes less active in organic solvents than in water?** Trends in Biotechnology. 15 (1997) 97-101
2. Aldave, Tena; Jorrín Novo; Novo, Manuel and V, Jesús. **Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería.** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba.
3. Amaya-Delgado, L; Hidalgo-Lara, M.E and Montes-Horcasitas, M.C.. **Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads.** Food Chemistry 99 (2006) 299–304.
4. A.N. Deryabin, I.M. Dubinina, E.A. Burakhanova, N.V. Astakhova, E.P. Sabel'nikova, T.I. Trunova. **Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature.** Journal of Thermal Biology 30 (2005) 73–77.
5. ARROYO, M. **Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones.** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid
6. Bahar, T. and Tuncel, A. **Concavalin A carrying reactive beads for yeast invertase purification.** Reactive and functional polymers 61 (2004) 203-210.
7. Blanco, R. M. Biocatalizadores inmovilizados de interés en biotransformaciones en el ámbito de tecnología de alimentos. Instituto de Catálisis CSIC. Número 1, febrero de 2005.

8. Chávez, Francisco; Rodríguez, Luis; Díaz, Joaquín; Delgado, Julio y Cremata, José. **Purification y characterization of an invertase from *Candida utilis*. Comparasion with natural and recombinant yeast invertases.** Journal of Biotechnology, 53 (1997) 67-74.
9. Chia-Chen Liu, Li-Chun Huang, Chen-Tien Chang, Hsien-Yi Sung. **Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells.** Food Chemistry 96 (2006) 621–631.
10. DARREN J. VORSTER and FREDERIK C. BOTHA. **PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF SUGARCANE NEUTRAL INVERTASE.** PII: F&O31-9422(98)00204-O.
11. David L. Nelson and Cox, Michael. **LEHNINGER, PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY.** Cuarta edición, 2004. Pág. 521-535.
12. Dipali Bagal, Meena S. Karve. **Entrapment of plant invertase within novel composite of agarosa-guar gum biopolymer membrane.** Analytica Chimica Acta 555 (2006) 316-321.
13. Emregul, Emel; Sungur, Sibel and Akbulut, Ural. **Polyacrylamide gelatine carrier system used for invertase immobilization.** Food Chemistry 97 (2006) 591–597.
14. Esmon, Pamela C.; Esmon, Brent E.; Schauer, Irene E.; Taylor, Alice and Schekman, Randy. **Structure, assemble and secretion of octameric Invertase.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 262, No. 9, issue of March 25, pp. 4387-4394, 1987.
15. Fernández Reyes, Emilio y Galván Cejudo, Aurora. **Métodos para la cuantificación de proteínas.** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

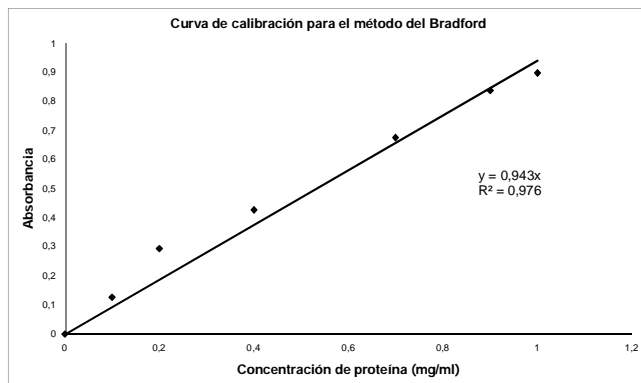
16. Gail Lorenz, Millar. **Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical chemistry, Vol 31, No. 3, 1959.
17. Gascón, Santiago and Lampen, J. Oliver. **Purification of the internal invertase of yeast.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 243, No. 7, issue of April 10, pp.1567-1572, 1968
18. García Pérez, Hilda. **Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia.** Laboratorios Beterá. Univ. Diag. 2000; 1 (2): 31-41.
19. G. Sanjay, S. Sugunan. **Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10.** Food Chemistry 94 (2006) 573–579.
20. Hashizume, Hiroshi; Tanase, Koji; Shiratake, Katsuhiro; Mori, Hitoshi and Yamaki, Shohei. **Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit.** Phytochemistry 63 (2003) 125–129.
21. H.W. Yu a, H. Chenb, X. Wang, Y.Y. Yang, C.B. Ching. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2006).
22. J.S. Dordick. **Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents.** Biotechnol. Prog. 8 (1992) 259-267.
23. Isla, Maria Inés; Salerno, Graciela; Ponéis, Horacio; Vattuone, Marta Amelia y Sampietro, Antonio Rodolfo. **Purification and properties of the soluble acid invertase from *oryza sativa*.** Phytochemistry. Vol 38, No. 2, pp. 321-325, 1995.
24. Jing Chen, Jianling Zhang, Buxing Han, Zhonghao Li, Junchun Li, Xiaoying Feng. **Synthesis of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in CO₂-expanded micellar solutions.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 48 (2006) 72–76.
25. Klein, J. and Wagner, F. (1983). **Methods for the immobilization of microbial cells.** Appl. Biochem. Bioeng. 4, 11-51.

26. Lomonte, B. **Manual de métodos inmunológicos**. 2007, pp. 92-101.
27. Marquez, L.D.S; Cabral, B.V; Freitas, F.F; Cardoso, V.L y Ribeiro, E.J. **Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis**. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic 51 (2008) 86-92.
28. Milanovic, A; Bozic, N y Vujci , Z. **Cell wall invertase immobilization with calcium alginate beads**. Food Chemistry 2006, 11.001.
29. Montes Horcasitas, Ma. del Carmen y Magaña Plaza, Ignacio. **Enzimas con aplicación industrial**. Avance y perspectiva. Vol. 21, septiembre-octubre del 2002. Pag. 279-282.
30. Polaina, J. **Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas aplicadas en la digestión de carbohidratos**. Mensaje Bioquímico, Vol. 28, 2004.
31. Reddy, Anthony and Maley, Frank. **Identification of an Active site residue in Yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis**. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 265, No. 19, pp. 10817-10819. 1990.
32. Rodríguez, M; Gómez, A; González, F; Barzana, E. and López-Munguía, A. **Stability of invertase in alcoholysis reactions with methanol**. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic 2 (1997) 299-306.
33. Schülke, Norbert and Schmid, Franz X. **The stability of yeast invertase is not significantly influenced by glycosylation**. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 263, No. 18, issue of June 25, pp. 8827-8831, 1988.
34. Soberón Mainero, Xavier. **Ingeniería genética y un campo de aplicación: La biocatálisis y la industria química limpia**. Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI, 2002.

35. Tomotani, Ester J. and Vitolo, Michele. **Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin.** Process Biochemistry 41 (2006) 1325–1331.
36. Valenzuela L. D, Hanz y Ortiz L. R, Ortiz. **Estabilidad de la Glucosa oxidasa en sistemas amorfos formados por los disacáridos sacarosa, maltosa y trehalosa.** Química Nova. Vol. 30, No. 7, 1633-1637. 2007.
37. Vrábek, Peter; Polakovic, Milan; Stefuca, Vladimír and Báles, Vladimír. **Analysis of mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Evaluation of multitemperature data applied to inactivation of yeast invertase.** Enzyme and microbial technology 20:348-354, 1997
38. Vrábek, Peter; Polakovic, Milan; Godó, Stefan; Báles, Vladimír; Docolomansky, Peter and Gemeiner, Peter. **Influence of immobilization on the thermal inactivation of yeast invertase.** Enzyme and microbial technology 21:196-202, 1997.
39. Willem Lammes, Katrien Le Roy, André Van Laere, Anja Rabijns and Wim Van den Ende. **Crystal Structures of *Arabodopsis thaliana* cell-wall Invertase mutants in complex with sucrose.** Journal Molecular Biological. 2007.
40. Y.L. Khmel'nitsky, A.V. Levashov, N.L. Klyachko y K. Martinek. **Engineering biocatalytic systems in organic media with lower water content.** Enzyme Microb. Technol. 10 (1998) 710.
41. Y.L. Khmel'nitsky and J. Rich. **Biocatalysis in nonaqueous.** Current opinion in chemical biology. 3:1 (1999) 47-53.

ANEXO A

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

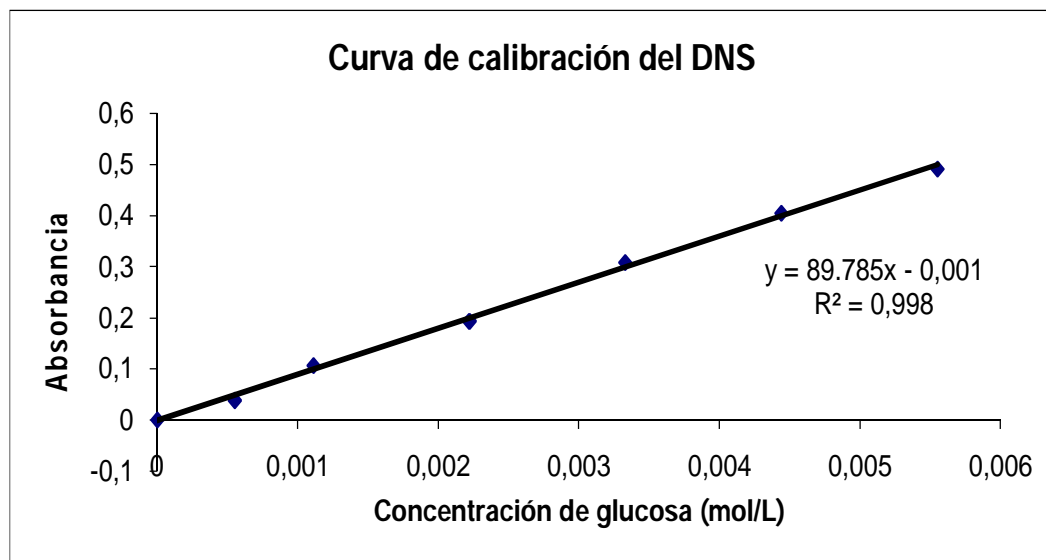


De la curva de calibración obtenemos la siguiente ecuación en la cual interpolamos para obtener la concentración de proteínas tanto en la invertasa soluble como inmovilizada:

$$[\text{Concentración}] = \text{absorbancia} / 0.9433$$

ANEXO B

Curva de calibración utilizada para la determinación de la actividad enzimática con el método de DNS



El cálculo de la actividad se realizó utilizando la pendiente de la curva de calibración junto con la pendiente de las curvas obtenidas durante cada ensayo para la determinación de la actividad; por medio de la siguiente ecuación:

$$\frac{m_1}{89.785 \times 2} \times \frac{1 \times 10^6}{1 \times 10^3} \times Vd \times \frac{Vm}{Ve}$$

Donde:

m1: Pendiente obtenida en cada uno de los ensayos

Vd: Factor de dilución

Vm: Volumen del ensayo

Ve: Volumen de enzima

El valor 89.785 corresponde al valor de la pendiente obtenido en la curva de calibración y tiene unidades de Abs/(mol/L), este valor se multiplica por dos ya que la actividad de la invertasa se determina por la concentración equimolar de glucosa y fructosa obtenidas, y en la curva de calibración se está tomando como patrón solo la glucosa.

ANEXO C

Las constantes de inactivación térmica se obtuvieron asumiendo un modelo cinético de primer orden:

$$E = E_0 e^{-k_f t}$$

$$a = \frac{E}{E_0}$$

$$a = e^{-k_f t}$$

Donde

a: Actividad volumétrica en U/ml del extracto enzimático

K: constante de inactivación en unidades de min^{-1}

t: Tiempo de incubación para cada temperatura

Para hacer posible el cálculo de la constante se procedió a realizar la linealización de la curva

$$\ln(a) = -k_f t$$

Donde la pendiente de esta curva corresponde a las constantes de inactivación térmica.