



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**

**INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE UNA  
ENDOPOLIGALACTURONASA DE LEVADURA  
SOBRE ALGINATO DE CALCIO**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO DE  
MASTER EN BIOTECNOLOGÍA, MENCIÓN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**

**AUTORA: LIC. TAMARA VALVERDE NÚÑEZ**

**TUTOR: DR. C. MANUEL DE JESÚS SERRAT DÍAZ**

**CONSULTANTE: DRA. C. MARCIA DÍAZ CASTILLO**

**Santiago de Cuba, 2005  
“Año de la Alternativa Bolivariana para las Américas”**

# *Indice*

# ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1. Enzima endopoligalacturonasa (endoPG)	4
1.1.2. Aplicación de las enzimas endoPG	4
1.2. Inmovilización	5
1.2.1. Métodos de inmovilización por Unión Química	5
1.2.1.1. Unión Covalente	7
1.2.2. Activación de los grupos químicos del soporte	7
1.3. Alginato: soporte utilizado para la inmovilización de la enzima	9
1.3.1. Origen	9
1.3.2. Estructura química	9
1.3.3. Solubilidad	11
1.3.4. Geles de alginato	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Obtención de la enzima endoPG	12
2.2. Inmovilización de la enzima endoPG por enlace covalente a alginato de calcio	13
2.2.1. Preparación del soporte	13
2.2.2. Determinación de la accesibilidad de la enzima al soporte	13
2.2.3. Activación del soporte con glutaraldehído (GA)	13
2.2.4. Activación del soporte con metaperyodato de sodio	14
2.2.5. Inmovilización de la enzima endoPG sobre alginato	15
2.2.5.1. Inmovilización de la endoPG sobre las perlas activadas con GA 2 %.	15
2.2.5.2. Inmovilización de la enzima sobre el soporte activado por oxidación con metaperyodato de sodio	15
2.2.6. Expresiones utilizadas para el cálculo de los parámetros que caracterizan la eficiencia del proceso de inmovilización	15
2.3. Obtención de hidrolizados de pectina	16
2.4. Determinación de la actividad enzimática endoPG	17
2.4.1. Determinación de la actividad endoPG soluble	17
2.4.2. Determinación de la actividad endoPG inmovilizada	17
2.5. Determinaciones analíticas	18
2.5.1. Determinaciones espectrofotométricas	18

	Pág.
2.5.2. Determinación de grupos carbonilo por el método del bisulfito	18
2.6. Análisis estadístico de los resultados	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Obtención de la enzima endoPG	19
3.2. Inmovilización de la enzima endoPG por enlace covalente a alginato de calcio	20
3.2.1. Preparación del soporte	20
3.2.2. Determinación de la accesibilidad de la enzima al soporte	21
3.2.3. Activación del soporte con GA	22
3.2.4. Activación del soporte con metaperyodato de sodio	22
3.2.5. Inmovilización de la enzima	25
3.2.5.1. Inmovilización de la enzima endoPG sobre las perlas activas con el reactivo GA 2 %	25
3.2.5.2. Inmovilización de la enzima sobre soporte activo oxidado con metaperyodato de sodio.	26
3.3. Obtención de hidrolizados de pectina	28
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	36

*Dedicataria*

*A mis dos familias y a mi esposo.*

# *Agradecimientos*

***La realización y culminación exitosa de este trabajo pudo ser posible, gracias al apoyo espiritual o material de :***

- ***Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz, ante todo por haber aceptado tutoriar esta tesis, por su confianza y exigencias, por a las largas horas de dedicación y esfuerzo, por contribuir con su sabia experiencia.***
- ***Al claustro de profesores, quienes ampliaron mis conocimientos.***
- ***A todos los trabajadores del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, por haberme aceptado como uno de ellos.***
- ***A los profesores del Departamento de Química, en especial a Domínguez, Biguín, Acevedo, Carlos, Luis González y Roberto.***
- ***Al MSc Jorge Marín, por sus oportunas ideas.***
- ***Al personal que contribuyó con los servicios y equipos prestados: Yunior, Lester, Falcón, Adolfo del Centro de Biofísica Médica; a los Drs. Vivian Tamayo y Ulises del Hospital Oncológico; a la MSc. Marlene Toledano del Labex.***
- ***Y a mis amigos Yamila, Dulce María, Dagmara, Zenia, Yanet, Zoraida, Margarita, Gabi, Morris y Roberto, por haber compartido conmigo en todo momento.***

***A todos muchas gracias.***

***Tamara***

# Resumen

## RESUMEN

Los inconvenientes que se tienen en la industria con catalizadores enzimáticos solubles son superados cuando se inmoviliza la enzima, al tiempo que permite que los procesos biotecnológicos sean rentables.

En el presente trabajo, se realizó la inmovilización de la enzima endopoligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 en alginato de calcio activado con glutaraldehído y peryodato de sodio, respectivamente. El preparado enzimático soluble obtenido en el laboratorio, se purificó y concentró hasta una actividad enzimática de 393 U/mL y una actividad específica de 288.9 U/mg. Se demostró por cromatografía de exclusión molecular que el acceso de la enzima al interior del gel es prácticamente nula. Las perlas de alginato de calcio de concentración 2 % (m/v), adquirieron durante la activación con glutaraldehído un número considerablemente superior de grupos formilo (5.8 moles de grupos carbonilo por mol de unidades monoméricas), disponibles para el enlace con la endoPG, que el alcanzado por la oxidación con peryodato. De igual forma, los mejores resultados en cuanto a rendimiento global de inmovilización (19.4 %) y una aceptable actividad del biocatalizador inmovilizado (195 U/g) se reportaron para la variante realizada con una relación enzima/soprote de 10 U/mg sobre el gel activado alginato-glutaraldehído. La endoPG inmovilizada, se empleó a razón de 0.5 U/mL para la obtención de hidrolizados biológicamente activos (grado de polimerización de 7-16) de pectinas con diferentes grados de esterificación (28.9-75 %), lo cual se logró para un tiempo de reacción relativamente corto (40 min), permitiendo su separación por simple decantación del hidrolizado.

## SUMMARY

The inconveniences that are had in the industry with free enzymatic catalysts are overcome when the enzyme is immobilized, at the time that allows that the biotechnical processes are profitable.

In this research, it was carried out the immobilization of the endopolygalacturonase enzyme of *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 in calcium alginate activated with glutaraldehyde and sodium periodate, respectively. The free enzymatic preparation obtained at the laboratory, became purified and concentrated until an enzymatic activity of 393 U/mL and a specific activity of 288.9 U/mg. It was demonstrated by molecular exclusion chromatography that the enzyme's access into the alginate beads is very limited. The glutaraldehyde-activated calcium alginate gel 2 % (m/v) added a higher number of carbonyl groups (5.8 mol of carbonyl groups by monomeric units), than the one reached by the periodate oxidation. The same way, the global immobilization yield (19.4%) and an acceptable activity of the immobilized biocatalyst (195 U/g) were reported when the enzyme/soprote rate was 10 U/mg and the alginate beads were activated with glutaraldehyde. The immobilized endoPG was used (0.5 U/mL) to obtain biologically active pectin hydrolyzated (degree of polymerization 7-16) for substrates with several esterification degrees (28.9-75%), which was achieved for a relatively short reaction time (40 min). The active oligogalacturonides were easy separated by decantation.

# *Introducción*

## INTRODUCCIÓN

Sin las enzimas no habría vida en la tierra. Esto se aplica tanto a las plantas, como a los insectos y otros animales superiores. Incluso, hasta para los microorganismos unicelulares, que son la forma de vida más sencilla, son necesarias para absorber y convertir los nutrientes del entorno que los rodea (Novo Nordisk, 1992).

Las enzimas constituyen la clase de moléculas proteicas más numerosa y especializada y se utilizan en cuatro campos bien diferenciados: como agentes terapéuticos, como herramientas para la manipulación de materiales biológicos, como reactivos analíticos y como catalizadores industriales.

A medida que las diferentes industrias vayan dándose cuenta de la necesidad de proteger el medio ambiente, las enzimas desempeñarán un papel cada vez más importante, ya que son catalizadores totalmente biodegradables, producidos en condiciones suaves, mediante la fermentación, por microorganismos clasificados como inocuos (Novo Nordisk, 1992; Lui *et al.*, 2004).

En la actualidad, más de 2 000 enzimas han sido aisladas y caracterizadas. El problema del tecnólogo de enzimas radica en ser capaz de discernir de qué fuente aislar la enzima deseada. La solución viene dada en gran parte por las características que se soliciten de la enzima y por el coste del proceso global de aislamiento (Lenhinger, 1972; Trevan MD *et al.*, 1990). Entre las enzimas con mayor aplicación industrial se encuentran las enzimas pécticas o pectinasas, para las cuales se estimó un mercado de unos 42 millones de dólares en fecha relativamente reciente (Serrat, 2003).

Las pectinasas son particularmente importantes en el procesamiento de productos agrícolas. Intervienen en los procesos de extracción, clarificación y macerado de frutas y vegetales, degradando la molécula de pectina (Fogarty y Kelly, 1983). Debido a la estructura compleja de este polisacárido, su modificación o completa degradación requiere de la participación de diferentes enzimas. Entre ellas se encuentran las esterases y las depolimerasas. Estas últimas se clasifican, según su mecanismo de acción, en hidrolasas y liasas (De Vries y Visser, 2001). Dentro de las hidrolasas se encuentran las poligalacturonasas (PG): endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.15) y exopoligalacturonasas (EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82). Las endoPG son las encargadas de promover la ruptura de la molécula de pectina mediante un ataque al azar a la cadena principal de poligalacturonano, con mínima liberación de azúcares reductores (Armand *et al.*, 2000; Singh y Rao, 2002).

Hasta el presente, la totalidad de las pectinasas que se comercializan se producen a partir de hongos; pero su producción por levaduras constituye una opción a la que se viene prestando especial atención en los últimos años, pues, a pesar de que su productividad se considera baja (Blanco *et al.*, 1999) presentan mayor velocidad de crecimiento y estructura unicelular, cualidades que les confieren importantes ventajas respecto a los mohos para el cultivo sumergido a gran escala. Otra excelencia de las levaduras, radica en el hecho de que solo producen endoPG, a diferencia de los hongos, los cuales originan una compleja mezcla de enzimas pécticas y otras carbohidrasas (Sieiro *et al.*, 2003). Investigaciones realizadas por este equipo de trabajo han demostrado la factibilidad técnica de co-producir endoPG y

etanol a escala industrial mediante una cepa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* (Serrat *et al.*, 2004a).

Novedosos campos de aplicación, relacionados con la producción de oligogalacturónidos, se prevén para las PG. Estos hidrolizados se han erigido en nuevos ingredientes para alimentos funcionales y a muchos de ellos se le atribuyen propiedades benéficas para la salud del consumidor, por lo que son considerados prebióticos (Crittenden *et al.*, 1996). Los prebióticos combinan los efectos de estimular tanto la flora bacteriana intestinal endógena como a los probióticos (nuevos microorganismos) incorporados habitualmente en alimentos vegetales con mínimo grado de procesamiento, y representan una perspectiva de las tendencias futuras de la biotecnología alimentaria en el mercado de productos vegetales (Lang y Döernenburg, 2003). En la medida que las propiedades funcionales beneficiosas de los oligogalacturónicos sean más comprendidas, el empleo de preparaciones de PG purificadas para su producción a gran escala cobrará mayor relevancia (Crittenden y Playne, 1996).

En muchas ocasiones, las enzimas, a pesar de sus excelentes propiedades catalíticas, no poseen todas las cualidades necesarias para su implantación como catalizadores en reactores industriales. Así, las enzimas son solubles, generalmente inestables y a menudo inhibidas por altas concentraciones de sustratos y productos de reacción. Por tanto, necesitan ser mejoradas antes de que pueda procederse a su utilización industrial. Una de las alternativas más usadas es la inmovilización en un soporte insoluble.

La inmovilización representa un enfoque para mejorar la estabilidad de la enzima por enlace covalente a una matriz insoluble o por atrapamiento dentro de un gel bajo condiciones suaves (por ejemplo, gelificación ionotrópica o por polimerización). Un soporte para inmovilización muy utilizado por bajo costo ha sido el alginato. Munjal y Sawhney (2002) describieron la inmovilización de enzimas por atrapamiento en geles de alginato y demostraron que, bajo condiciones drásticas, la enzima atrapada presenta un mayor perfil de actividad que en forma libre. Sin embargo, las enzimas atrapadas en tales geles tienden a “escaparse” en el tiempo, imposibilitando su conservación durante largos períodos. Una alternativa para resolver este problema es la inmovilización covalente.

Las enzimas inmovilizadas obtenidas por enlace covalente a una matriz insoluble poseen muchas ventajas sobre la enzima libre, por ejemplo, un incremento en la estabilidad de la enzima y la facilidad para separarla del medio de reacción por filtración o centrifugación. Consecuentemente, la reacción enzimática puede ser controlada sin la adición de inhibidores y así los productos formados no son contaminados. Además, el biocatalizador inmovilizado recuperado puede ser reutilizado varias veces y almacenado por largos períodos de tiempo sin pérdida apreciable de actividad (Engasser y Horvath, 1976; Dumitriu y Chornet., 1998; Le-Tien *et al.*, 2004).

Los enlaces en la unión covalente se forman normalmente entre los grupos funcionales presentes en la superficie de la matriz y los grupos funcionales de residuos de aminoácidos de la proteína. Esto generalmente conduce a una pérdida considerable de actividad enzimática (Fadnavis *et al.*, 2003). La inmovilización puede realizarse usando reactivos como agentes de acoplamiento (p. ej., carbodi-imida) o glutaraldehído (Engasser y Horvath,

1976; Dumitriu y Chornet, 1998; Cetinus *et al.*, 2000) o utilizando soportes ya activados como la p-benzoquinona-agarosa (Mateescu *et al.*, 1990). La oxidación con peryodato puede también ser empleada para la activación de materiales polihidroxílicos, como es el caso del alginato. Esta es una reacción altamente específica, dirigida a grupos hidroxilos vecinales, que puede también usarse en el análisis estructural de carbohidratos (Van Calsteren *et al.*, 2002). Cuando se trata a los polisacáridos con peryodato, se rompen los enlaces C-C correspondientes a dioles vecinales, generando pares de grupos formilo, disponibles para el acoplamiento con los grupos amino primarios de las proteínas (Le-Tien *et al.*, 2004).

La selección del tipo de matriz es también un parámetro importante, y depende del campo de aplicación del biocatalizador. Si se trata de uso biomédico, farmacéutico o en el procesamiento de alimentos, la matriz debe ser no tóxica y biocompatible. Sobre esta explicación, varios estudios sugieren al alginato, un polisacárido natural extraído de algas marinas, como una matriz interesante (Shapiro *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta los beneficios que reporta la aplicación de la enzima PG en procesos industriales, así como la importancia de su inmovilización y que el alginato de sodio se produce nacionalmente, nos trazamos la siguiente hipótesis:

El tratamiento del alginato antes o después de gelificar, con glutaraldehído o peryodato, posibilitará su unión covalente a la endoPG, obteniéndose un biocatalizador inmovilizado con cualidades funcionales apropiadas para su empleo en la obtención de hidrolizados de pectina biológicamente activos.

Partiendo de esta perspectiva, nuestro equipo de trabajo se propuso los siguientes objetivos:

**Objetivo general:**

- Evaluar la inmovilización por unión covalente de una endoPG de levadura en geles del soporte orgánico alginato de calcio.

**Objetivos específicos:**

- Obtener la enzima endoPG a partir de la levadura pectinolítica *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.
- Estudiar la activación del alginato con glutaraldehído y metaperyodato de sodio, como alternativas para inmovilizar covalentemente la enzima.
- Caracterizar la hidrólisis enzimática de pectinas con diferente grado de esterificación empleando el catalizador inmovilizado.

# *Revisión Bibliográfica*

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. 1. Enzima endopoligalacturonasa (endoPG)

Las endoPG (EC 3.2.1.15) se clasifican como enzimas pécticas o pectinasas por participar en la degradación natural de la pectina. Estas enzimas promueven la ruptura de la cadena principal de esta molécula mediante la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1,4)-glicosídicos que unen los residuos de ácido D-galacturónico. Su ataque ocurre al azar, promoviendo una rápida disminución del peso molecular de la pectina (25-360 kDa) con una mínima liberación de extremos reductores (Serrat, 2003). Una investigación realizada usando la base de datos PROSITE, revela la presencia de una secuencia C<sup>218</sup>XGGHGXSIGSVG<sup>230</sup> que se supone constituya el sitio activo de la endoPG (Šiekštele *et al.*, 1999; Jianhua y Whels 2000).

Las endoPG se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en plantas, mohos, levaduras y bacterias, donde desempeñan las más diversas funciones biológicas relacionadas con el crecimiento, desarrollo, nutrición, reproducción y fitopatogenicidad, entre otras (Meakin y Roberts, 1991; Taylor *et al.*, 1993; Chatterjee *et al.*, 1995; Shevchik *et al.*, 1996; Sitrit *et al.*, 1996; Patino *et al.*, 1997; Bergey *et al.*, 1999; Wubben *et al.*, 1999; Alebeek *et al.*, 2003). En levaduras la actividad pectinolítica es una cualidad relativamente rara y está restringida a unas pocas especies de los géneros de *Kluyveromyces*, *Cándida*, *Deberomyces*, *Pichia*, *Sacharomyces*, entre otras (Luh y Phaff, 1951; Sánchez *et al.*, 1984; Ravelomanana *et al.*, 1986; Strauss *et al.*, 2001; Serrat, 2003). La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao y del café, de uvas, higos y asociados al deterioro de algunos alimentos y frutas en conservas (Blanco *et al.*, 1999) y se caracterizan por producir exclusivamente endoPG extracelular (Serrat *et al.*, 2004b).

Las pectinasas comerciales son preparados de origen fúngico, principalmente de la especie *Aspergillus niger*, producidos por diferentes compañías (Gist-Brocades, NOVOZYMES, Rahm, Biocom, Genecon Internacional, Miles Kalichemie ABM Sturge, Amano, A.T.P, Shin-Nihon) (García *et al.* 2002). Estos preparados enzimáticos constituyen mezclas complejas de enzimas donde están presentes, además de la endoPG, otras actividades enzimáticas indeseables, como la pectina esterasa que libera metanol, la arabinofuranosidasa, que promueve la formación de sedimentos y opalescencia, y la exopoligalacturonasa, que libera azúcares reductores al medio potenciando con ello el desarrollo de reacciones de pardeado no enzimático. Por todas estas razones, cada día son más reclamados preparados puros de endoPG.

#### 1.1.2. Aplicación de las enzimas endoPG

Muchas de las aplicaciones industriales de las pectinasas están basadas en la actividad hidrolítica que ejerce la endoPG sobre la pectina. Su utilización se encuentra muy extendida en los procesos de extracción, clarificación y concentración de zumos de frutas, incrementando el rendimiento al reducir la viscosidad de los concentrados y solubilizar las estructuras pécticas. El tratamiento enzimático en el macerado de las hortalizas para la producción de purés, logra hidrolizar protopectinas de productos frescos, tales como zanahoria, patata y tomate. Actualmente se prefiere el macerado enzimático al mecánico, ya que permite la separación de las células enteras intactas, con

lo cual se preservan de la acción del oxígeno las vitaminas y los compuestos responsables del aroma y el color (Lang y Dörnenburg, 2000).

Nuevas y prometedoras aplicaciones de esta enzima, están relacionados con la obtención de hidrolizados y fragmentos de pectina con actividad biológica (reguladora), siendo de gran utilidad en la agricultura. Los oligalacturónidos con grado de polimerización entre 7 y 16 inducen la respuesta defensiva en plantas frente a patógenos, estimulan el crecimiento celular y la maduración de frutos (caña de azúcar, café, cítricos, papa, tomate, ajo, tabaco, plátano, etc.) (Cabrera, 1999). Además, pueden sustituir parcial o totalmente las hormonas tradicionales de los esquemas de micropropagación de diferentes cultivos (Serrat, 2003). También se les atribuye actividad benéfica sobre las bifidobacterias (valor prebiótico) y constituyen una importante fuente de fibra dietética. Los poligogalacturónidos también se usan como aditivos alimentarios, en la producción de alimentos infantiles (Lang y Dörnenburg, 2000).

## **1.2. Inmovilización**

Los catalizadores biológicos presentan una elevada actividad catalítica, muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad), y son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica. Pero a pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte, al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar (Arroyo, 1998).

Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

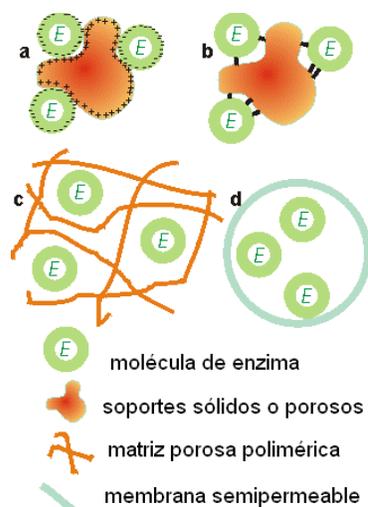
La inmovilización es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringe, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas por su unión a un soporte (Arroyo, 1998).

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: Retención Física (atrapamiento e inclusión en membranas) y Unión Química (unión a soportes y reticulado). En la Figura 1 se muestra un sistema de enzimas inmovilizadas por las diferentes vías.

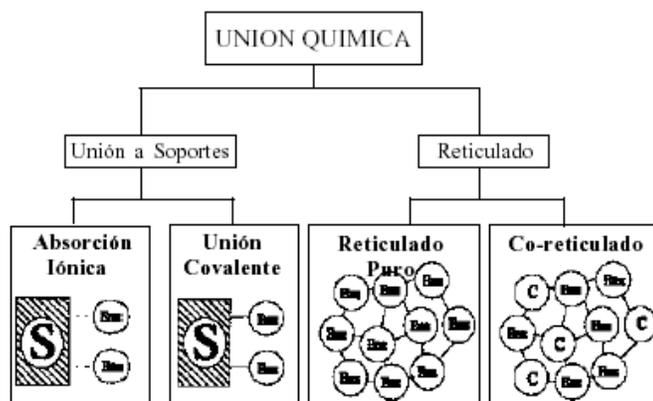
### **1.2.1. Métodos de inmovilización por Unión Química**

Los métodos de inmovilización por Unión Química se pueden clasificar en dos grandes grupos: Unión a Soporte y Reticulado (Figura 2).

Los métodos de inmovilización por Unión a Soportes son los más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y el tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, que el soporte que



**Figura 1.** Sistemas de enzimas inmovilizadas. (a) enzima adsorbida no covalentemente a una partícula insoluble; (b) enzima covalentemente enlazada a una partícula insoluble; (c) enzima atrapada en el interior de una partícula insoluble por un polímero entrecruzado; (d) enzima confinada en el interior de una membrana semipermeable. (Fuente: <http://www.lsbu.ac.uk/water/chaplin.html>, Agosto 29, 2003).



**Figura 2.** Métodos de inmovilización mediante unión química (Fuente: Arroyo, 1998)

se seleccione, retenga el mayor tiempo posible la actividad de la biomolécula, es decir, que sea estable para una operación continua, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación de los reactores y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se ha utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en representación de cilindros, hojas, fibras, y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grupos:

- *Soportes Inorgánicos*. Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) ó materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).
- *Soportes Orgánicos*: Se pueden clasificar en polímeros naturales, a su vez, divididos en polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, alginatos, quitina, quitosana, etc.); y polímeros sintéticos tales como poliolefinas, polímeros acrílicos y otros tipos.

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción iónica o por unión covalente.

#### **1.2.1.1. Unión Covalente**

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizás el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Dentro de los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en las estructuras de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, cisteína, tirosina y la histidina y en menor medida la metionina, triptófano, arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de los aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente.

Este método presenta las siguientes ventajas:

1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla.
2. La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización.
3. Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
4. Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.
5. Las biomoléculas unidas están expuestas a moléculas de todos tamaños.

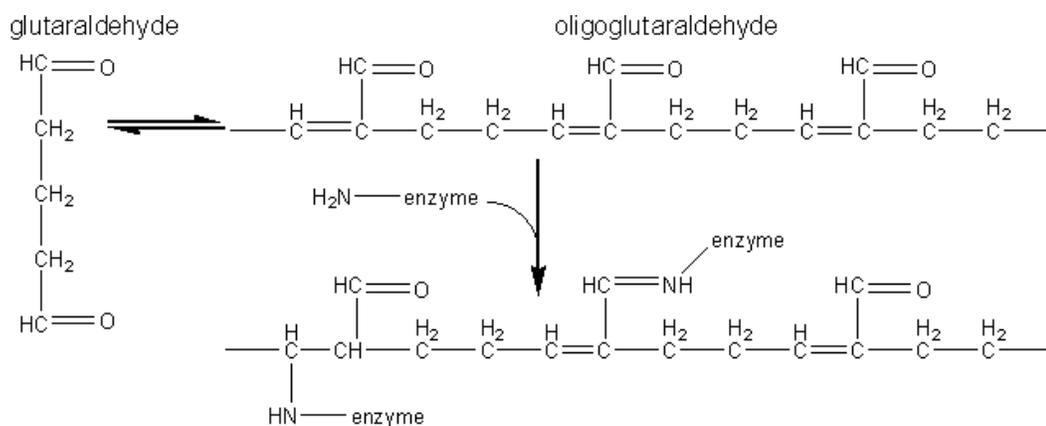
En cambio, esta inmovilización también presenta una serie de inconvenientes:

1. Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
2. El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
3. La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

#### **1.2.2. Activación de los grupos químicos del soporte**

a) La activación del soporte con glutaraldehído es una de las técnicas más ampliamente utilizadas, por ser simple y barata. Sin embargo, el glutaraldehído presenta desventajas como la excesiva reactividad y el complejo mecanismo de reacción con grupos

nucleófilos (Spagna *et al*, 1995). En la Figura 3 se muestra la reacción entre el glutaraldehído y una enzima.

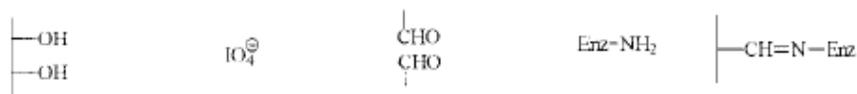


**Figura 3.** Esquema de la reacción de acoplamiento enzima – glutaraldehído.

(Fuente: <http://www.lsbu.ac.uk/water/chaplin.html> , Agosto 29, 2003)

La reacción de activación con glutaraldehído a varios pH sigue diferentes modelos, causando una reactividad diferente del soporte activado. En un medio ácido, las moléculas de glutaraldehído reaccionan individualmente con los centros activos del soporte, haciendo un gran número de grupos formilo disponibles para formar enlaces con la enzima. En un medio alcalino, las moléculas de glutaraldehído tienden a formar  $\alpha$ - $\beta$  polímeros insaturados (condensación aldólica), causando la formación de una red de polialdehídos sobre un soporte. Esta reduce la cantidad de grupos formilo disponibles y normalmente hace la matriz más hidrofóbica (Spagna *et al*, 1995).

b) El metaperiodato, es un agente oxidante fuerte capaz de romper los enlaces C-C de grupos hidroxilos vecinales formando dos grupos formilo, los cuales quedan disponibles para el acoplamiento con los grupos aminos de la enzima. Otra forma de activación, puede ser introduciendo el grupo funcional carbonilo en una glicoproteína por oxidación de la porción polisacáridica con peryodato, sin afectar considerablemente la actividad enzimática. La enzima puede entonces ser enlazada covalentemente a soportes conteniendo grupos amino libres, mediante la formación de bases de Schiff. Enzimas como glucosidasa, peroxidasa, invertasa, etc., han sido inmovilizadas usando esta técnica (Kolot, 1981; Melo y D'Souza, 1992; D'Urso y Fortier, 1996). En la Figura 4 se muestra la oxidación del soporte y la inmovilización de la enzima a este.



**Figura 4.** Unión covalente enzima-soporte mediante la formación de una base de Schiff a partir de soportes que portan grupos hidroxilos vecinales

### 1.3. Alginato: soporte utilizado para la inmovilización de la enzima

#### 1.3.1. Origen

Los primeros estudios sobre la extracción de alginatos a partir de las algas pardas, datan del siglo diecinueve y fueron realizados por el químico británico E.C.Stanford, quien encontró que la sustancia a la que denominó alginato, poseía varias propiedades interesantes y propuso diversas aplicaciones industriales, aunque la producción a gran escala fue desarrollada mucho tiempo después. Krefting en 1896 obtuvo ácido algínico puro, e investigadores posteriores, determinaron muchas de las propiedades de las sales de este ácido (Dalla, 1997). Sin embargo, la producción comercial de alginatos no comenzó hasta el año 1929 y tuvo un notable incremento después de la segunda guerra mundial con la instalación de empresas extractoras en todo el mundo. La continuación de esta investigación y su ampliación originó una gran cantidad de datos sobre la estructura del ácido algínico, las propiedades de sus soluciones y sus reacciones químicas (<http://www.aqa.org.ar/iyqparte2.htm>; Julio, 2004). En nuestro país, desde hace ya algunos años se produce el alginato a escala industrial.

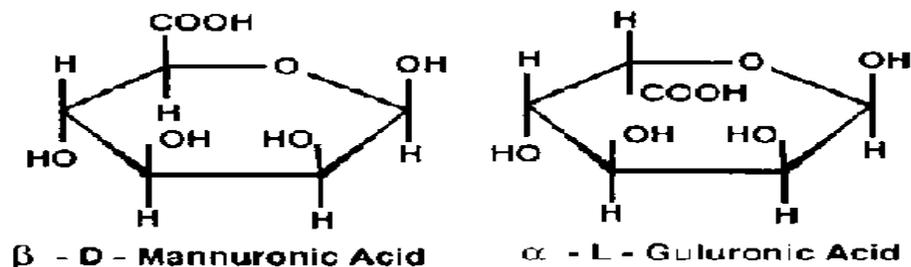
Los alginatos disponibles en el mercado se comercializan en su mayoría, en forma de sales hidrosolubles, libres de celulosa, blanqueadas y purificadas, entre las que se incluyen las siguientes:

- E400 Acido algínico
- E401 Alginato de sodio
- E402 Alginato de potasio
- E403 Alginato de amonio
- E404 Alginato de calcio
- E405 Alginato de propilienglicol.

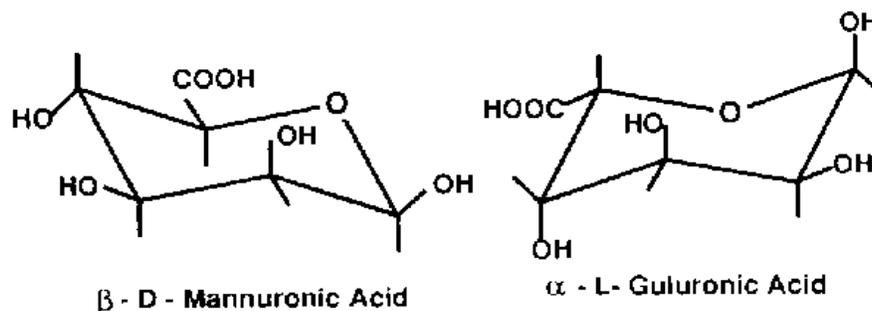
La importancia de estos alginatos como insumos para las industrias alimenticia, farmacéutica y química en general, está dada por su capacidad hidrocoloide; esto es, su capacidad de hidratarse en agua caliente o fría para formar soluciones viscosas, dispersiones o geles. Los alginatos son, de esta manera, únicos en cuanto a sus propiedades como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadores de películas; resultando en un sinnúmero de aplicaciones. (Dalla, 1997)

#### 1.3.2. Estructura química

Químicamente los alginatos son polímeros cuyas unidades monoméricas son los ácidos urónicos (azúcares donde el grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$  del C6 ha sido reemplazado por un grupo  $\text{COOH}$ ). Una de las unidades deriva de la D-manosa y se llama ácido D-manurónico (M), la otra es su epímero en C5, el ácido L- gularónico (G). Estos monómeros difieren en las conformaciones espaciales lo que provoca una gran diferencia estructural entre los bloques poliédricos, de modo que si bien los ácidos algínicos son copolímeros lineales de ambos ácidos por formación de enlaces glucosídicos (1-4), no todos son iguales. Se encuentran bloques de homopolímeros tanto (G) como (M) y también heteropolímeros secuenciales alternados (G-M). La distribución de estos bloques determina las propiedades individuales del compuesto obtenido. Los ácidos algínicos tienen un grado de polimerización variable de 100 a 3.000 unidades y la relación porcentual entre los ácidos D-manurónico y L-gularónico oscila de 0,4 a 2,4 (<http://www.aqa.org.ar/iyqparte2.htm>; Julio, 2004).



**Figura 5a.** Fórmulas clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido alginico



**Figura 5b.** Fórmulas en formas de silla de las unidades monoméricas del ácido alginico.

Las fórmulas clásicas de Haworth para los dos monómeros se muestran en la Figura 5a, mientras la Figura 5b ilustra las llamadas fórmulas de silla, que permiten ver en forma más clara el arreglo tridimensional de las moléculas (Dalla, 1997).

Dentro del polímero existen las tres clases de bloques MM, GG y MG, teniendo estos últimos alternancia uniforme. Todas las uniones son 1-4, siendo las del ácido manurónico de configuración  $\beta$  y las del gulurónico de configuración  $\alpha$ . La reactividad con el calcio para la formación de geles es una función directa de la longitud promedio de los bloques (G); de esta forma, los alginatos que poseen grandes fracciones (G-G) presentan una fuerte capacidad gelificante; siendo esta junto con la viscosidad, las principales propiedades de los alginatos.

En las Figuras 6 y 7 se muestran las configuraciones espaciales que adoptan los bloques M y G debido a los diferentes enlaces glucosídicos entre los carbonos C-1 y C-4 de las unidades monoméricas. Las regiones de bloques M corresponden a cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle.

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica. Éste modelo fue propuesto por Grant en 1973 (modelo “caja de huevo”) (Grant *et al.*, 1973) para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas.

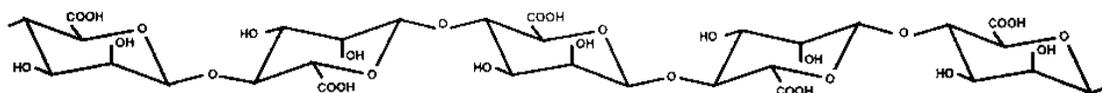


Figura 6. Bloques MM en la molécula de ácido algínico.

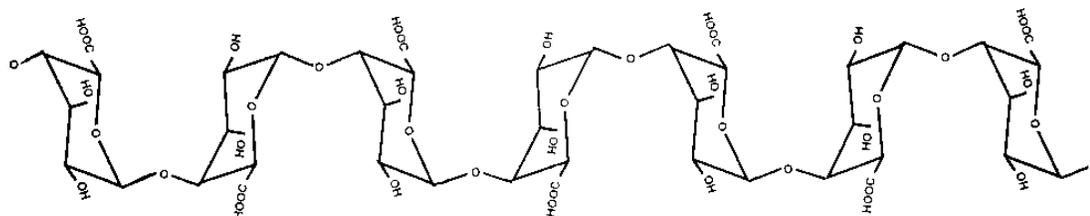


Figura 7. Bloques GG en la molécula de ácido algínico.

### 1.3.3. Solubilidad

Esta propiedad se ve afectada tanto por factores físicos como químicos, los que se analizan a continuación.

**Factores físicos:** La cantidad de alginato que se disolverá en agua está limitada por la naturaleza física de las soluciones, más que por la solubilidad del compuesto en sí. Al incrementarse la concentración de alginato, la solución pasa de un estado de líquido viscoso a una pasta espesa, punto en el cual se vuelve muy difícil de dispersar el alginato remanente.

**Factores químicos:** La solubilización de estos productos en agua resulta dificultosa si se realiza en presencia de compuestos que compiten con las moléculas de alginato por el agua necesaria para su hidratación. Así, la presencia de azúcares, almidón o proteínas en el agua reducirá la proporción de hidratación y se requerirán mayores tiempos de mezcla. Las sales de cationes monovalentes (como el NaCl) tienen un efecto similar a concentraciones cercanas al 0.5%. Lo mejor es agregar todas estas sustancias después de que el alginato fue hidratado y disuelto.

### 1.3.4. Geles de alginato

Las soluciones de alginato permiten, a concentraciones tan bajas como 0,25% a 0,5% estabilizar emulsiones, suspensiones y espumas; mientras que a concentraciones mayores y en presencia de ciertos iones (principalmente calcio) forman geles de tipo químico, no reversibles al calentarlos y de dureza variable según los pesos moleculares de los polisacáridos componentes. Éstos encuentran variadas aplicaciones en la industria, particularmente cuando el calcio es usado como ión divalente.

# ***Materiales y Métodos***

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Obtención de la enzima endoPG

Esta investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, en el período comprendido desde Junio/2004 hasta Marzo/2005.

La cepa *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 de la colección de cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, fue el microorganismo utilizado para la producción de endoPG.

La propagación del microorganismo se efectuó en cultivo agitado a 160 rpm (**Zaranda rotacional P Selecta, España**), 30 °C durante 24 horas en un Erlenmeyer de 800 mL conteniendo 150 mL del medio de cultivo YNB (Barnett *et al.*, 1983) – glucosa 20 g/L. Posteriormente, este cultivo se utilizó como inóculo (10% v/v) del medio de producción YNB – glucosa 100 g/L. En esta fase el cultivo tuvo lugar bajo condiciones estáticas, a la temperatura de 30 °C durante 168 horas.

Terminada la fermentación, el cultivo se centrifugó (**Hitachi, Japón**) a 4 °C, 3000 rpm durante 20 minutos para separar la biomasa, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro bacteriológico de 0.22 µm (**Millipore**) y se llevó a pH 5.0 con una solución de NaOH 0.1 N.

El filtrado se concentró 50 veces por ultrafiltración (**Amicon**) a través de una membrana YM10 (exclusión de peso molecular 10 000 Da). El concentrado se dializó dos veces contra 50 volúmenes tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5.0 por espacio de 12 horas. Se centrifugó a 3000 rpm, 5 min y se guardó a 4 °C.

Al crudo enzimático obtenido se le realizó el control de calidad sobre la base del contenido de azúcares reductores residuales (expresado como glucosa), actividad enzimática y actividad enzimática específica. Se determinó además el recobrado del proceso a través de la siguiente fórmula:

$$R = \frac{(AE \cdot V)_f}{(AE \cdot V)_i} \cdot 100 \quad (1)$$

donde:

- R: recobrado (%)
- AE: actividad enzimática (U/mL)
- V: volumen (mL)
- f: final
- i: inicial.

## 2.2. Inmovilización de la enzima endoPG por enlace covalente a alginato de calcio

### 2.2.1. Preparación del soporte

La preparación del soporte se realizó según el procedimiento descrito por Mc Ghee *et al.* (1989). Para ello, se prepararon soluciones al 2 %, 1 % y 0.5 % (m/v) de alginato de sodio de *Laminaria hiperborea* (BDH). Con ayuda de una jeringuilla (aguja # 26), estas soluciones se gotearon sobre 500 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.05 mol/L y se agitaron durante dos horas. Se escurrieron las perlas, se agregaron entonces otros 500 mL de CaCl<sub>2</sub>, y se agitó nuevamente durante 18 horas a 10 °C. Finalmente se escurrieron las perlas y se lavaron con agua destilada.

Una muestra representativa de las perlas obtenidas a las diferentes concentraciones de alginato se secó sobre papel de filtro, se pesó (Sartorius AG, Alemania) y se les determinó el diámetro con ayuda de un micrómetro, así como la densidad por el método de desplazamiento del líquido.

### 2.2.2. Determinación de la accesibilidad de la enzima al soporte

Se realizó mediante una cromatografía de exclusión molecular. Para ello, las perlas se empacaron en una columna de 8 cm x 2 cm cuidando no quedasen burbujas de aire. La columna se equilibró con un volumen equivalente a 5 veces el volumen del lecho con tampón acetato 50 mM, pH 5.0. Una vez equilibrada, se aplicó entonces 1 mL de la enzima con una concentración aproximada de 500 µg/mL, la cual fue previamente diluida en el mismo tampón, y se eluyó con un flujo de 1.2 mL/min. Inmediatamente se comenzó a tomar fracciones (1 mL) del eluato para la determinación de proteína por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando la primera fracción para la preparación del blanco de reactivo.

El volumen de exclusión se determinó como la diferencia entre el volumen de lecho y el volumen de gel, determinado este último a partir de los datos de masa unitaria y volumen específico de las perlas de alginato de calcio.

### 2.2.3. Activación del soporte con glutaraldehído (GA)

Se preparó una solución de GA (25 %, Fluka) al 2 % (m/v) en tampón citrato de sodio 50 mM, pH 3.5.

A un Erlenmeyer de 30 mL, se le añadió 15 mL de la solución de GA 2 % y 100 perlas de alginato de calcio 2 %. La mezcla de reacción se incubó por espacio de 1.5 horas, a 25 °C y con agitación (160 rpm) en una zaranda rotacional (P Selecta, España). Terminada la activación, se escurrieron las perlas y la solución se guardó para su posterior análisis. Se lavaron las perlas con abundante agua destilada hasta no detectarse presencia de GA según el ensayo de la 2,4-fenilhidracina (Mc Elvain, 1970).

Tanto a la solución de partida de GA 2 %, como a la colectada después de la activación se les determinó el contenido de grupos carbonilos de aldehídos por el método del bisulfito

(Weiss, 1970). Para la determinación de grupos carbonilos en las perlas de alginato de calcio activadas, estas se disgregaron en presencia de EDTA 0.1 mol/L (50 perlas en 10 mL de la solución de EDTA).

El grado de activación de las perlas se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$GAS = \frac{n(CHO)s}{n(Um)} \quad (2)$$

donde:

GAS: Grado de activación del soporte

n(CHO)s: moles de grupos CHO enlazados al soporte

n(Um): moles de unidades monoméricas del soporte en el ensayo

#### 2.2.4. Activación del soporte con metaperyodato de sodio

Este experimento se realizó a dos concentraciones diferentes del agente oxidante, de modo tal que se lograra la oxidación del 10% y el 2% de las unidades monoméricas del soporte, considerando un rendimiento teórico del 100 %. Se emplearon, además, dos vías para la activación del soporte, que consistieron en efectuar la oxidación antes y después de la gelificación del alginato en presencia de iones calcio. A continuación se describe cada uno de los ensayos realizados.

- Ensayo 1: Se utilizó la cantidad de peryodato necesaria para oxidar el 10 % de las unidades monoméricas presentes en el alginato de sodio y se realizó la oxidación del polímero antes de proceder a la gelificación. Para ello, se tomó 1 gramo de alginato de sodio y se disolvió en 50 mL de agua destilada. A esta solución se le añadió 0.244 g de metaperyodato de sodio (**B.D.H, Inglaterra**) disueltos en 1.5 mL de agua destilada. Con el fin de determinar el tiempo de reacción, la cinética de oxidación se siguió por espectroscopia de Infrarrojos (**MIDAC Corporation; Irvine, California, USA**) utilizando ventanas de Zn-Se. Se obtuvieron los espectros para los 15, 30 y 60 minutos de reacción. Se determinó también la concentración de azúcares reductores presentes en las muestras de alginato de sodio, antes y después de sometido a oxidación con el peryodato. Se procedió a la formación del gel tomando la solución de alginato oxidada y añadiéndola con ayuda de una jeringuilla a una solución de CaCl<sub>2</sub> de concentración 0.05 mol/L según se describió en 2.2.1.
- Ensayo 2: Se concibió para la oxidación del 2 % de las unidades monoméricas del alginato. Para ello se pesó 0.049 g de NaIO<sub>4</sub> y se hicieron reaccionar con 1 g de alginato de sodio disuelto en 50 mL de agua destilada por espacio de 60 minutos. Para cuantificar los grupos carbonilos formados se utilizó el método del bisulfito y el método de Somogy-Nelson para azúcares reductores. Luego se procedió a la formación de las perlas de alginato de calcio según el procedimiento descrito con anterioridad
- Ensayo 3: Se obtuvieron primero las perlas de alginato de calcio. Esto se realizó por duplicado; en un caso las perlas obtenidas se suspendieron en agua destilada y en el otro

en solución de  $\text{CaCl}_2$  50 mM. Luego se procedió a la adición de la cantidad necesaria de peryodato para la oxidación del 2 % de las unidades monoméricas. El tiempo de reacción fue de 60 minutos.

El grado de activación del soporte se calculó según la ecuación 2.

### **2.2.5. Inmovilización de la enzima endoPG sobre alginato**

La inmovilización de la enzima se efectuó utilizando como soportes activos las perlas tratadas con GA y las oxidadas con el metaperyodato de sodio.

Previo a los ensayos de inmovilización, se procedió a la evaluación de la actividad de la enzima a inmovilizar frente al alginato de sodio. Para ello, se utilizó como sustrato una solución de alginato de sodio 0.5 % (m/v) en tampón acetato 50 mM, pH 5.0. El contenido de reductores en la mezcla de reacción se determinó a las 1, 2, 4 y 24 horas por el método de Somogyi-Nelson.

#### **2.2.5.1 Inmovilización de la endoPG sobre las perlas activadas con GA 2 %.**

Se realizaron dos ensayos. En el primero se utilizó 1 mL de perlas activas, equivalente a 17.5 mg de alginato de calcio y 12 mL de solución de la enzima a 13.8 U/mL (165 U) en tampón acetato 50 mM, pH 5.0, para una relación enzima/ soporte de aproximadamente 10 U/mg. La reacción se desarrolló durante 16 horas a 25 °C, con agitación a 60 rpm (**Zaranda, P Selecta, España**).

En la segunda experiencia se utilizó 5 perlas activas (1.75 mg) y 8 ml del preparado enzimático en tampón acetato 50 mM, pH 5.0. En este caso la relación enzima/ soporte fue de aproximadamente 65 U/mg. Se emplearon dos variantes: solución A: conteniendo  $\text{CaCl}_2$  0.02 mol/L y solución B: sin  $\text{CaCl}_2$ . La reacción tuvo lugar a 25 °C durante 16 horas y con una agitación de 60 rpm. Transcurrido este tiempo se escurrieron las perlas y se guardó la fracción líquida.

#### **2.2.5.2 Inmovilización de la enzima sobre el soporte activado por oxidación con metaperyodato de sodio**

En este ensayo se utilizaron las perlas preparadas según se describió en 2.2.4, ensayos 2 y 3. Se trabajó con 5 perlas activas y 8 mL de la solución del enzima a 17 U/mL (aprox. 136 U) en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM. La relación enzima/ soporte en este experimento fue de 75 U/mg. La reacción se efectuó con agitación a 60 rpm, durante 16 horas a 25 °C.

### **2.2.6 Expresiones utilizadas para el cálculo de los parámetros que caracterizan la eficiencia del proceso de inmovilización**

$$A_2 = A_0 - A_1 \quad (3)$$

$$U_i = A_i \cdot V \quad (4)$$

$$Y_{uc} = \frac{U_2}{U_o} \cdot 100 \quad (5)$$

$$Y_{imm} = \frac{U_3}{U_2} \cdot 100 \quad (6)$$

$$Y_G = (Y_{uc}/100) \cdot (Y_{imm}/100) \cdot 100 \quad (7)$$

donde:

$A_i$ : actividad enzimática (U/mL)

$A_0$ : actividad enzimática en la solución de partida (U/mL)

$A_1$ : actividad enzimática residual en solución (U/mL)

$A_2$ : diferencia entre la actividad enzimática inicial y residual (U/mL)

$A_3$ : actividad enzimática inmovilizada (U/mg)

$V$ : volumen utilizado durante el ensayo (mL)

$U_i$ : cantidad de enzima (U)

$U_0$ : cantidad de enzima en la solución de partida (U)

$U_2$ : cantidad de enzima inmovilizada en el soporte (U)

$U_3$ : cantidad de enzima inmovilizada activa (U)

$Y_{uc}$ : rendimiento de la unión covalente (%)

$Y_{imm}$ : rendimiento de inmovilización (%)

$Y_G$ : rendimiento global (%)

### 2.3. Obtención de hidrolizados de pectina

En este experimento se utilizaron como sustratos: pectina cítrica (**Sigma, USA**), pectina clásica (**Herbstreith and Fox KG, Alemania**) y pectina de manzana (**Ensufarma, La Habana, Cuba**), cuyas principales características se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de los sustratos

Sustratos	Masa Molecular (g/mol)	Grado de esterificación (%)	Contenido de ácido galacturónico (%)
Pectina cítrica	65 600	63.4	79.0
Pectina clásica <sup>a</sup>	50 000	75	70
Pectina de manzana LM	25 700	28.9	68.6

<sup>a</sup> Pectina de manzana HM; la masa molecular se estimó de la viscosidad específica; los datos de grado de esterificación y contenido de ácido galacturónico se le asignaron según lo reportado por Fluka (Suiza) para este tipo de pectina; HM, alto metoxilo; LM, bajo metoxilo.

Las reacciones de hidrólisis se desarrollaron bajo las siguientes condiciones: sustratos al 1 % (m/v) en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5.0, temperatura de 37 °C, sin agitación. Los sustratos se esterilizaron previamente a 121 °C durante 15 minutos. El biocatalizador inmovilizado en alginato de calcio se adicionó a razón de 1 mL de biocatalizador por cada 15 mL de sustrato. La actividad enzimática volumétrica en la mezcla de reacción fue de 0.5 U/mL. La reacción se siguió durante 7 días, realizando tomas de muestra a intervalos

periódicos. A cada una de las alícuotas del hidrolizado se le determinó el contenido de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson.

Del hidrolizado se calcularon el grado de hidrólisis y el grado de polimerización (promedio en número) del sustrato según las siguientes expresiones:

$$h = \frac{Cr - Co}{Cum - Cp} \quad (8)$$

$$Nh = \frac{No}{h(No - 1) + 1} \quad (9)$$

donde:

- h: grado de hidrólisis
- Cr: concentración molar de reductores al tiempo t ( $\mu\text{mol/mL}$ )
- Co: concentración molar de reductores al tiempo cero ( $\mu\text{mol/mL}$ )
- Cum: concentración molar de unidades monoméricas ( $\mu\text{mol/mL}$ )
- Cp: concentración molar del polímero al tiempo cero ( $\mu\text{mol/mL}$ )
- No: grado de polimerización inicial del polímero
- Nh: grado de polimerización del polímero para un grado de hidrólisis h

## 2.4. Determinación de la actividad enzimática endoPG

### 2.4.1 Determinación de la actividad endoPG soluble

Se empleó como sustrato ácido poligalacturónico (PGA) (**Sigma**) 0.5 % (m/v) en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5.0. La mezcla de reacción consistió de 400  $\mu\text{L}$  de sustrato y 100  $\mu\text{L}$  de una dilución adecuada del enzima en el mismo tampón del sustrato. La reacción enzimática se desarrolló a 37 °C durante 10 min. La actividad de endoPG se estimó del incremento del poder reductor en el sustrato, determinado según el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1957). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol/min}$  de extremos reductores (como ácido galacturónico) bajo las condiciones de ensayo.

### 2.4.2 Determinación de la actividad endoPG inmovilizada

A un Erlenmeyer de 30 mL conteniendo 5 perlas del biocatalizador inmovilizado, se le adicionaron 1.5 mL del sustrato (PGA 0.5 % disuelto en tampón acetato 50 mM, pH 5.0), ambos previamente incubados a 37°C durante 5 min. A partir de este momento se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de esta mezcla de reacción a los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 min de reacción y se añadieron a tubos de ensayos que contenían 1 mL de solución cúprica alcalina y 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, para la determinación del contenido de azúcares reductores presentes según el método de Somogyi - Nelson. La actividad enzimática se estimó de la pendiente de la curva de concentración de reductores (en  $\mu\text{g/mL}$ ) vs. el tiempo de reacción (en minutos) (ver Anexos, Figuras D y E), mediante la siguiente expresión:

$$AE = \frac{K \cdot V \cdot D}{M \cdot m} \quad (10)$$

donde:

AE: actividad enzimática (U/mg)

K: pendiente de la curva de **concentración de reductores** vs. **tiempo** ( $\mu\text{g/mL} \cdot \text{min}$ )

V: volumen del sustrato (mL)

D: factor de dilución en el ensayo de azúcares reductores (= 5)

M: masa molar del ácido galacturónico (194 g/mol)

m: masa de soporte utilizada en el ensayo (mg)

## 2.5. Determinaciones analíticas

### 2.5.1 Determinaciones espectrofotométricas

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Ultrospec III (**Pharmacia LKB**). Todas las determinaciones se ejecutaron según el método de curva de calibración (los datos se muestran en Anexos, Figuras A, B, C).

Los azúcares reductores se determinaron según el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1957) usando como patrones glucosa o ácido galacturónico (ambos de **Sigma**), según el caso, en el rango de 40 – 200  $\mu\text{g/mL}$ .

La concentración de grupos carbonilo de aldehídos se estimó, cuando fue necesario, colorimétricamente mediante el método de Somogyi-Nelson para azúcares reductores.

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 650 nm y se utilizó como patrón seroalbúmina bovina (BSA) (**BDH, Inglaterra**). La solución *stock* de BSA se calibró espectrofotométricamente a 280 nm.

### 2.5.2. Determinación de grupos carbonilo por el método del bisulfito

Un Erlenmeyer con 25 mL de solución bisulfito de sodio 0.1 % se puso en baño de hielo durante 15 minutos. Se le añadió 5 mL de muestra, conteniendo aproximadamente 200 mg/L de aldehído (como acetaldehído) y 0.25 mL de la solución indicadora de almidón. Se valoró rápidamente con solución de yodo 0.1 N hasta un valor estimado de 0.5 mL del punto final de la valoración. Luego se continuó la valoración con la solución de yodo 0.01N hasta coloración azul permanente. (Weiss, 1970).

## 2.6. Análisis estadístico de los resultados

Cuando fue necesario se utilizaron los estadígrafos media aritmética y desviación estándar.

# *Análisis y Discusión de Resultados*

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Obtención de la enzima endoPG

Al medio de fermentación donde se creció la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 se le determinó periódicamente la concentración de azúcares reductores, con el fin de conocer cuándo el cultivo alcanzaba la fase estacionaria, momento en el cual se obtiene el máximo acumulado de la enzima endoPG en el medio de cultivo (Serrat, 2003). Teniendo en cuenta que a las 168 horas, aún el cultivo no había arribado a la fase estacionaria (la concentración de azúcares reductores residual era de 70 g/L, para un 30% de consumo), se decidió determinar la actividad enzimática endoPG acumulada, la cual fue de 10.7 U/mL. Los valores reportados para esta cepa, bajo las mismas condiciones, son del orden de las 18 U/mL, para un consumo de la fuente de carbono de alrededor del 50 % (Serrat *et al.*, 2002), de modo que existe correspondencia con lo observado en esta experiencia.

Lo mismo puede decirse con respecto al lento crecimiento de esta cepa en medio mínimo bajo condiciones anaerobias autoinducidas, reportado también por estos autores (Serrat, 2003). Además, al tratarse de un cultivo bajo condiciones estáticas, este fenómeno se acentúa, pues la biomasa forma un sedimento con lo cual se dificulta el acceso a los nutrientes y la remoción del dióxido de carbono formado, afectando así el crecimiento de la levadura. Al considerar que el acumulado de actividad enzimática satisfacía los requerimientos de este trabajo y teniendo en cuenta la lentitud de la fermentación, se decidió poner fin a la misma a las 168 horas.

Una vez centrifugado el cultivo a 4 °C y filtrado, el pH del sobrenadante se llevó de 3.0 a 5.0 ya que la enzima se muestra completamente estable en 24 horas para valores de pH mayores o iguales a 5.0, no ocurriendo así para pHs inferiores, donde ocurre una pérdida significativa de actividad (Serrat, 2004a). Debe destacarse que la acidez del medio, estimada del consumo de hidróxido de sodio, es superior a 0.03 mol/L, aspecto este que puede ejercer también un efecto indeseable sobre el crecimiento del microorganismo y que debe ser especialmente considerado al valorar el escalado de la producción de la enzima a la industria.

El crudo enzimático se concentró 50 veces por ultrafiltración, eliminándose así los componentes de bajo peso molecular (< 10 kDa), con la cual se logra una purificación parcial de la enzima al tiempo que se concentra. En el permeado no se detectó actividad enzimática.

El concentrado se dializó dos veces contra 300 mL de tampón acetato 50 mM, pH 5.0 y luego se centrifugó quedando totalmente transparente. El recobrado de la enzima en el proceso fue de 73.4 %, lo cual puede considerarse aceptable (Serrat *et al.*, 2004a). Similares resultados han obtenido otros autores para la semipurificación de PG extracelulares fúngicas (Barnby *et al.*, 1990; Gainvors *et al.*, 2000; Singh y Rao, 2002).

El proceso de purificación utilizado reúne como ventajas su sencillez y su efectividad para concentrar y purificar la enzima (Serrat, 2003), obteniéndose un preparado con elevadas actividad enzimática y actividad enzimática específica (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados obtenidos de los diferentes análisis realizados al concentrado

Actividad enzimática (U/mL)	Actividad enzimática específica (U/mg)	Azúcares reductores (µg/mL)	Proteínas (mg/mL)
393	288.9	57.7	1.36

### 3.2. Inmovilización de la enzima endoPG por enlace covalente a alginato de calcio

#### 3.2.1. Preparación del soporte

La reacción entre el alginato de sodio, a las concentraciones estudiadas, y el CaCl<sub>2</sub> 0.05 mol/L, permitió obtener unas perlas translúcidas de gel de alginato de calcio (Figura 8), cuyas principales características se resumen en la Tabla 3.



**Figura 8.** Perlas de alginato de calcio al 2 % (m/v).

**Tabla 3.** Principales características de las perlas de alginato de calcio obtenidas para diferentes concentraciones del polisacárido.

Concentración del gel [% (m/v)]	Forma geométrica / textura	Peso unitario (mg) <sup>a</sup>	Densidad (g/mL)	Diámetro (mm) X ± s
2	Esféricas / duras	8.02	1.0456	3.23 ± 0.17
1	Ovaladas / duras	4.87	1.0227	ND <sup>b</sup>
0.5	Irregulares / blandas	1.74	1.0380	ND <sup>b</sup>

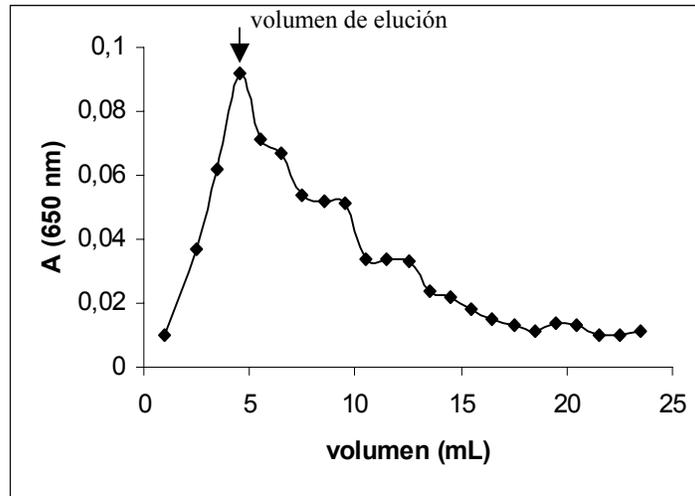
<sup>a</sup> Promedio de 50 unidades

<sup>b</sup> ND: no determinado

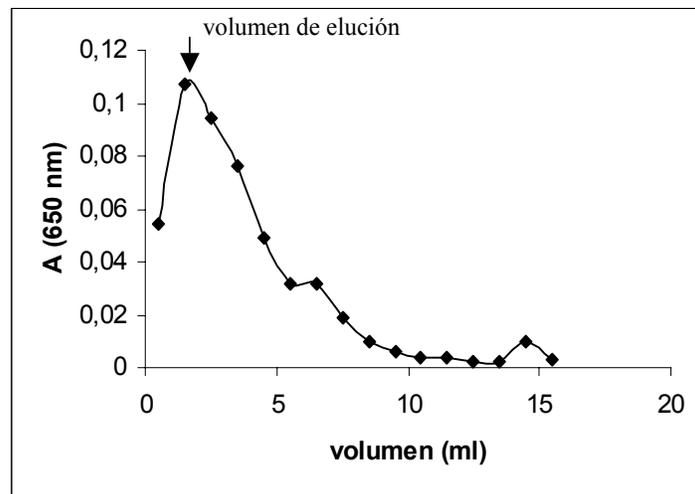
El diámetro de las perlas de alginato de calcio 2 % (m/v) resultó muy similar al referido por otros autores (Rossi-Alva y Rocha-Leão, 2003). El soporte, una vez secado a 105 °C durante 1 hora, reduce considerablemente su diámetro y peso, tornándose de color pardo amarillo. Su peso seco promedio unitario (3.10 mg) nos indica, que a la temperatura de secado utilizada, el gel retiene aún el 88.7 % de humedad (el contenido de sólidos estimado de la formulación del gel es de 0.35 mg/unidad). Este dato resulta de gran valor, considerando la formulación futura de un preparado comercial del biocatalizador inmovilizado en este soporte. Cuando se deja al gel en ausencia de solvente a temperatura ambiente, experimenta similar deshidratación, trayendo como ventaja que no se afecta la termoestabilidad de la enzima inmovilizada. De estos resultados, puede suponerse la posibilidad de comercializar el biocatalizador en una formulación parcialmente deshidratada, que combine la cualidad de ocupar un volumen muy pequeño al tiempo que se evita el ataque por microorganismos debido a su baja actividad de agua (ausencia de agua libre).

### 3.2.2. Determinación de la accesibilidad de la enzima al soporte

Los resultados de la cromatografía de exclusión molecular realizada para determinar el acceso de la enzima a los geles de alginato de calcio al 2 % y 1 % se muestran en las Figuras 9 y 10.



**Figura 9.** Cromatografía de exclusión molecular para el alginato de calcio 2 %. Volumen de lecho: 20 mL, volumen de exclusión: 2.36 mL



**Figura 10.** Cromatografía de exclusión realizada para el alginato de calcio 1 %. Volumen de lecho: 15 mL, volumen de exclusión: 1,7 mL

Como puede observarse, el volumen de elución de la enzima está muy próximo al volumen de exclusión para ambos casos, lo que corresponde a una muy baja accesibilidad de la enzima al interior del gel. Este resultado se corresponde con lo señalado por Pedroza-Islas (2002), quien refiere que de alginato de calcio no son permeables a moléculas cuyo peso molecular exceda los 10 000 Da. Es decir, al inmovilizar la enzima sobre este soporte, esta quedará restringida, esencialmente, a la

superficie exterior de las perlas de alginato de calcio. Esto resulta conveniente y acorde a lo esperado, teniendo en cuenta que el sustrato de la PG es un polímero de alta masa molecular, incapaz de penetrar al interior del gel.

Para la realización de los posteriores experimentos, se decidió trabajar con una concentración de alginato de sodio del 2 % (m/v), debido a la configuración geométrica más uniforme y mayor dureza de las perlas, lo que garantiza una distribución homogénea del biocatalizador y mayor resistencia mecánica del mismo, todo lo cual contribuye a una mayor eficacia y vida útil de la enzima inmovilizada.

### 3.2.3. Activación del soporte con GA

Es necesario que la activación con GA ocurra en un ambiente ácido, para favorecer la reacción de adición nucleofílica y de este modo garantizar un mayor número de grupos formilo disponibles para formar enlaces con las moléculas de la enzima. (Spagna *et al.*, 1995).

Se escogió el método del bisulfito, ya que por su sencillez y asequibilidad es el método de rutina recomendado para determinar con exactitud los aldehídos alifáticos pequeños (Weiss, 1970).

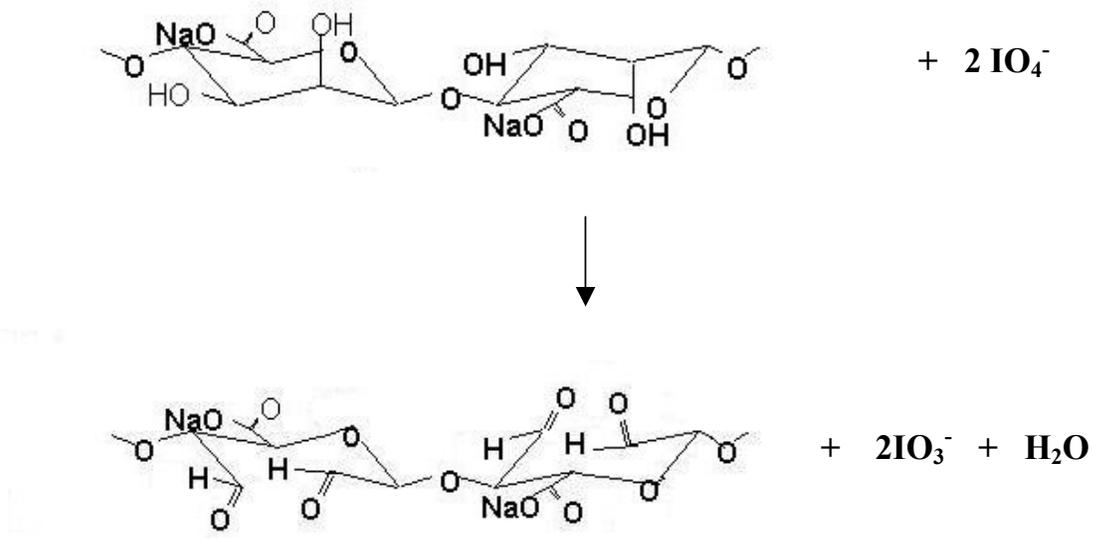
La solución de GA al 2 % (m/v) en buffer citrato 50 mM, pH 3.5, antes de la activación presentó una concentración de grupos carbonilo de 0.481 mol/L. Después de la reacción de activación, la concentración residual de estos grupos se redujo a 0.362 mol/L, de lo que puede estimarse un grado de activación del soporte de 5 moles de CHO por mol de unidad monomérica del soporte.

Para comprobar el grado real de activación alcanzado, se procedió a disgregar las perlas con EDTA, para así determinar la presencia de grupos carbonilo libres en solución. El EDTA, al actuar como secuestrante de iones  $\text{Ca}^{2+}$  desestabiliza el gel, regresando el polímero a su estado de solución verdadera. En esta experiencia pudimos observar que para una concentración de EDTA de 0.1 mol/L el gel fue solubilizado en 60 minutos. De este modo, igualmente con ayuda del método del bisulfito, se determinó la concentración de grupos CHO libres enlazados al soporte, la cual fue de 5.8 moles por mol de unidades monoméricas del polímero. Este resultado es muy similar al obtenido con anterioridad y ambos son superiores a lo esperado teóricamente donde por cada mol de unidades monoméricas deben enlazarse covalentemente, a lo sumo, 2 moles de grupos CHO. Esto puede deberse a varios factores, como pueden ser la polimerización del GA, con el consiguiente consumo de grupos CHO (Spagna *et al.*, 1995), o la adsorción inespecífica del GA sobre el alginato. Esta última puede verse favorecida por la formación de enlaces de hidrógeno múltiples, los cuales son capaces de garantizar suficiente estabilidad al agregado molecular a temperaturas próximas a la ambiente.

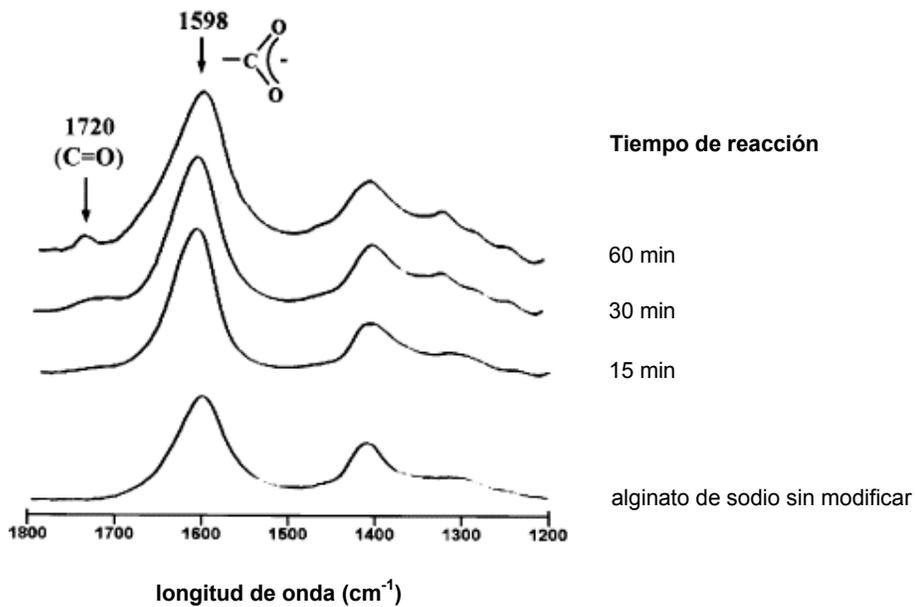
La activación de soportes con GA es una de las técnicas más ampliamente utilizadas por ser simple y barata (Spagna *et al.*, 1995).

### 3.2.4. Activación del soporte con metaperyodato de sodio

La reacción de oxidación del alginato por el metaperyodato de sodio puede ser descrita según la ecuación química representada en la Figura 11.



**Fig. 11.** Ecuación química de la reacción de oxidación-reducción del alginato de sodio con el peryodato.



**Figura 12.** Espectros IR de la mezcla de reacción alginato – peryodato para diferentes tiempos de reacción. Peryodato de sodio 22.8 mM

En el primer experimento, se siguió la cinética de la reacción por medio de espectroscopia de infrarrojos (Figura 12). Se observa que la banda de grupos carboxilos permanece inalterable para las muestras analizadas, lo que evidencia que la oxidación

de los OH vecinales no es completa (no llega hasta grupos carboxilo). Es necesario comentar que la reacción de oxidación a temperatura ambiente ocurre de forma muy lenta (Acevedo, comunicación personal), lo que se corrobora en el espectro, donde a la longitud de onda  $1720\text{ cm}^{-1}$  comienza la aparición de una ligera meseta a los 30 minutos de reacción y un pequeño pico se forma a los 60 minutos, indicando la formación de los grupos carbonilo. Un resultado similar en la oxidación del alginato por peryodato ha sido reportado por Le-Tien *et al.* (2004), quien empleó en su estudio concentraciones del agente oxidante de 100-200 mM y 24 horas de reacción a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Otro análisis cualitativo, para verificar la extensión de la oxidación en la molécula de alginato, fue el ensayo de Fehling para aldehídos, realizado a los 20 minutos de reacción. Esta prueba también fue realizada a la solución del polímero sin tratar. En este último caso, la prueba resultó negativa, en tanto en el alginato oxidado se visualizó un precipitado abundante de óxido de cobre (I). Este resultado sugiere la existencia de una relativamente amplia oxidación en la molécula de alginato (concentraciones de formilo superiores a  $2.6\text{ mM}$ ), aunque también puede ser indicador de degradación (depolymerización) de la molécula (Boudahir *et al.*, 1999).

Una vez terminada la reacción de oxidación, se llevó a cabo la formación del gel en presencia de iones de calcio. El gel obtenido presentó una estructura fibrilar y no la estructura característica en forma de perlas esféricas. Este resultado parece indicar que la oxidación con peryodato, para este grado de extensión, afecta notablemente los bloques de ácido gulurónico (GG) responsables de la gelificación en presencia de iones calcio (Grant *et al.*, 1973). Al producirse la ruptura oxidativa entre los carbonos  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_3$  del anillo pinarósico, la estructura se distiende, impidiendo que los iones calcio se acomoden según el modelo "caja de huevo" utilizado para explicar la estructura de los geles de alginato de calcio.

El ensayo se repitió usando menor cantidad de peryodato, capaz de oxidar en este caso, suponiendo un rendimiento teórico del 100 %, el 2 % de las unidades monoméricas. Sin embargo, al determinar la concentración de grupos carbonilo formados por el método del bisulfito, se obtuvo que solo se había oxidado el 0.9 % de los residuos de ácido hexurónico. Este rendimiento es menor de la mitad del teórico, lo que pudiera explicarse en consideración a que el potencial de oxidorreducción de una especie depende de su concentración, de modo que al consumirse el peryodato en la reacción, disminuye al propio tiempo su capacidad para oxidar los glicoles vecinales. Por otro lado, como se señaló anteriormente, esta reacción transcurre con extrema lentitud a temperatura ambiente (Acevedo, comunicación personal).

Teniendo en cuenta que la determinación volumétrica (método del bisulfito) tuvo lugar en el rango de duda del método (0.2 mL de valorante) se optó por emplear un método más sensible. En consideración a que el reactivo de Fehling es reducido por el grupo carbonilo de aldehídos, se decidió estimar la concentración de estos grupos formados durante la oxidación con peryodato, mediante el método de Somgyi-Nelson. La determinación arrojó una concentración de grupos carbonilo de aldehídos de  $0.151\text{ }\mu\text{mol/mL}$  (valor corregido mediante la determinación en el alginato sin oxidar). Esto corresponde a un grado de activación del soporte del 0,13 %. Este valor es mucho más confiable que aquel obtenido por el método del bisulfito.

La incorporación de grupos carbonilo reactivos al soporte durante la activación con GA 2 % es considerablemente superior a la alcanzada por la oxidación con peryodato, lo cual resulta lógico, si partimos del hecho de que durante la activación con GA los grupos carbonilo ya existen en el reactivo y lo que se trata es de enlazarlos al soporte; mientras que en la activación en presencia de peryodato, los grupos carbonilo se forman como resultado de una reacción de óxido-reducción, cuya eficiencia depende en buena medida de la concentración del agente oxidante utilizado. Los resultados sugieren que el peryodato debe utilizarse en exceso con relación a la estequiometría de la reacción, pero sin sobrepasar la cantidad necesaria para lograr la oxidación del 10 % de las unidades monoméricas. Otro aspecto a considerar es el incremento del tiempo de reacción.

En este experimento se logra la obtención del gel en forma de perlas, las que no son tan esféricas como las que se obtienen del alginato sin oxidar y después de la agitación sufren deformaciones, denotando una menor resistencia mecánica.

Por último, se trató las perlas formadas y conservadas en agua destilada y en solución de CaCl<sub>2</sub> con el agente oxidante IO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Como resultado se observó que las perlas no sufrieron deformaciones tras la reacción. La concentración de grupos formilo no se pudo determinar por el método del bisulfito por encontrarse en cantidades tan bajas que no fueron sensibles al análisis. No obstante, se realizó una prueba cualitativa a la solución residual para confirmar la presencia del ion IO<sub>3</sub><sup>-</sup> a través de la reacción con el KSCN (Burriel., 1989). Esta reacción resultó positiva, indicando que la oxidación del alginato tuvo lugar.

### 3.2.5. Inmovilización de la enzima

Previo a los ensayos de inmovilización, se evaluó la actividad catalítica de la endoPG frente al alginato de sodio, ya que las unidades monoméricas de las sales del ácido algínico, el ácido β-D- manurónico y el ácido α-L-gulurónico (Dalla, 1997) son estereoisómeros del ácido galacturónico, (unidad constitutiva del PGA), sustrato natural de la endoPG.

Una vez comprobado que la enzima endoPG en estudio, bajo las condiciones establecidas, no hidroliza al alginato, se procedió a su inmovilización en este soporte.

#### 3.2.5.1 Inmovilización de la enzima endoPG sobre las perlas activas con el reactivo GA 2 %

Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Inmovilización de la enzima en alginato de calcio activado con GA2 %.

Exp. Número	Condiciones	Y <sub>UC</sub> (%)	Y <sub>imm</sub> (%)	Y <sub>G</sub> (%)	AE <sub>imm</sub> (U/g)
1	Relación enzima/soporte 10 U/mg	73.5	26.4	19.4	195
2-A	Relación enzima/soporte 65 U/mg; CaCl <sub>2</sub> 0.02 mol/L	31.34	10.3	3.2	400
2-B	Relación enzima/soporte 65 U/mg	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>

<sup>a</sup> No determinado

En el experimento 2-B las perlas de alginato se desestabilizaron, redisolviéndose durante el transcurso de la inmovilización. Aunque este gel es estable aún en ausencia de iones calcio en exceso (por ejemplo, en agua destilada), al parecer, durante el proceso de inmovilización, tal estabilidad se ve comprometida debida a tensiones adicionales surgidas como consecuencia del enlace múltiple de una macromolécula (la enzima) a las moléculas del alginato que conforman el gel. Tales tensiones pueden tener su origen en impedimentos estéricos, debido al gran volumen que ocupan las moléculas de enzima.

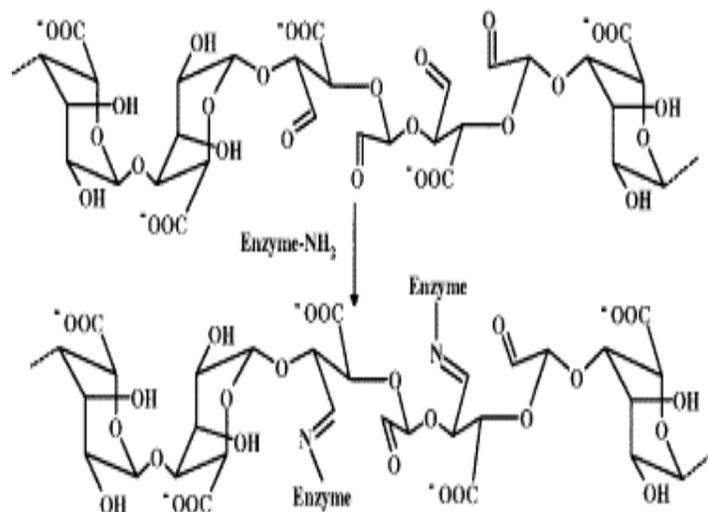
El rendimiento de unión covalente en el experimento 2-A se muestra bajo con relación al primero, lo cual no indica que el número de moléculas de enzima enlazadas sea inferior, sino que por existir una relación enzima/soporte 6.5 veces mayor (65 U/mg), la proporción de enzima sin enlazarse a la molécula de alginato resulta mayor. Esto puede explicarse, teniendo en cuenta que la endoPG es una macromolécula (42 700 Da), lo cual disminuye la probabilidad de unión al soporte, debido a impedimentos estéricos. Spagna *et al.* (1995) realizaron sus experimentos utilizando una relación enzima/soporte entre 6-10 U/mg, en varios soportes activados con GA. Entre ellos, empleó la polietileno imino celulosa 300 (PEI-cell), para la cual obtuvo un rendimiento del 25.6 %, inferior a los reportados en este trabajo bajo las mismas condiciones. Esto sugiere que debe trabajarse con valores de relación enzima/soporte superiores a 10 U/mg pero no tan elevados como 65 U/mg, y que este parámetro resulta primordial para la optimización del proceso.

Es importante destacar que los resultados de rendimiento de inmovilización obtenidos para ambos experimentos son inferiores al 50 %, lo que se corresponde con lo planteado por varios autores para las hidrolasas unidas covalentemente a soportes sólidos, las cuales muestran una actividad muy baja hacia proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (Arroyo, 1998). En el ensayo 2-A, este valor representa casi la tercera parte del obtenido en el primer experimento; esto puede explicarse teniendo en cuenta que la densidad de moléculas de enzima por unidad de superficie es mayor, lo que puede ocasionar cambios conformacionales distorsionantes, que afecten su actividad catalítica. Por otro lado, la unión al soporte puede originarse de forma tal que el paso del sustrato al centro activo quede impedido, conduciendo a derivados inactivos.

Los resultados de AE inmovilizada muestran que la segunda experiencia (2-A), a pesar de tener una relación enzima/soporte 6.5 veces mayor, supera solo en dos veces el valor obtenido en el primer ensayo. Esto evidencia que tal resultado puede lograrse partiendo de una menor cantidad de enzima para enlazar covalentemente al soporte. Los valores de actividad endoPG inmovilizadas en ambas experiencias se consideran muy buena en comparación con los obtenidos por otros autores (Spagna *et al.*, 1995).

### **3.2.5.2 Inmovilización de la enzima sobre soporte activo oxidado con metaperyodato de sodio.**

Esta inmovilización se realizó bajo condiciones de pH 7.0, con el objetivo de garantizar una mayor concentración de grupos amino no ionizados en la molécula de la enzima y, con ello, favorecer la reacción con los grupos formilo libres del soporte (ver Figura13)



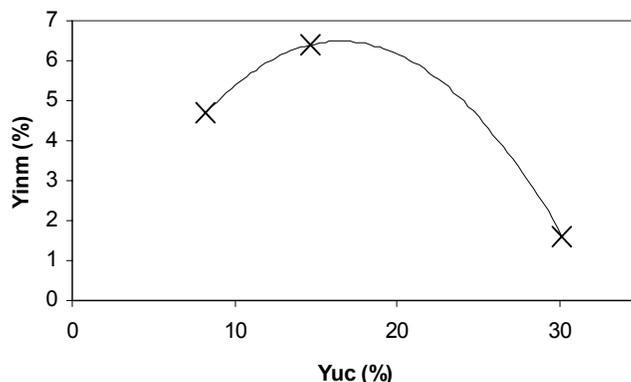
**Figura 13.** Representación esquemática de la reacción de acoplamiento de la enzima al alginato oxidado con peryodato.

Los resultados de esta inmovilización se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Resultados de la inmovilización de la endoPG en alginato de calcio oxidado con peryodato. Relación enzima/sopORTE: 75 U/mg.

Exp. Número	Oxidación del soporte	$Y_{UC}$ (%)	$Y_{imm}$ (%)	$Y_G$ (%)	$AE_{imm}$ (U/g)
1	Antes de la gelificación	8.25	4.7	0.4	184
2	Después de la formación del gel. Perlas conservadas en agua destilada	14.7	6.4	0.9	449
3	Después de la formación del gel. Perlas conservadas en $CaCl_2$ 0.02 mol/L	30.2	1.6	0.5	236

El rendimiento de unión covalente para el experimento 1 resultó inferior al resto. Esto puede deberse a que la oxidación del polímero en solución provoca que los grupos carbonilo formados (que están a muy baja concentración) queden indistintamente hacia el interior y exterior del gel una vez formado, disminuyendo así la probabilidad de unión de la enzima, ya que aquellos grupos que quedan atrapados en el interior son inaccesibles para la reacción. Sin embargo, cuando la oxidación ocurre, una vez formadas las perlas, existirá una mayor disponibilidad de los grupos CHO, los cuales se formarán preferentemente en la superficie externa del gel. El experimento 3 corrobora lo antes planteado, ya que en este, al estar presente el ion calcio, el gel adquiere mayor rigidez y, por consiguiente, presentará un tamaño de poro menor, con lo cual la probabilidad de que ocurra la oxidación hacia la porción interior del gel se hace aún más baja (menor difusión), existiendo entonces una mayor densidad de grupos carbonilo hacia el exterior, lo que justifica el marcado incremento en  $Y_{uc}$  con relación al experimento 2.



**Figura 14.** Relación entre  $Y_{imm}$  y  $Y_{UC}$  durante la inmovilización de endoPG en alginato oxidado con peryodato.

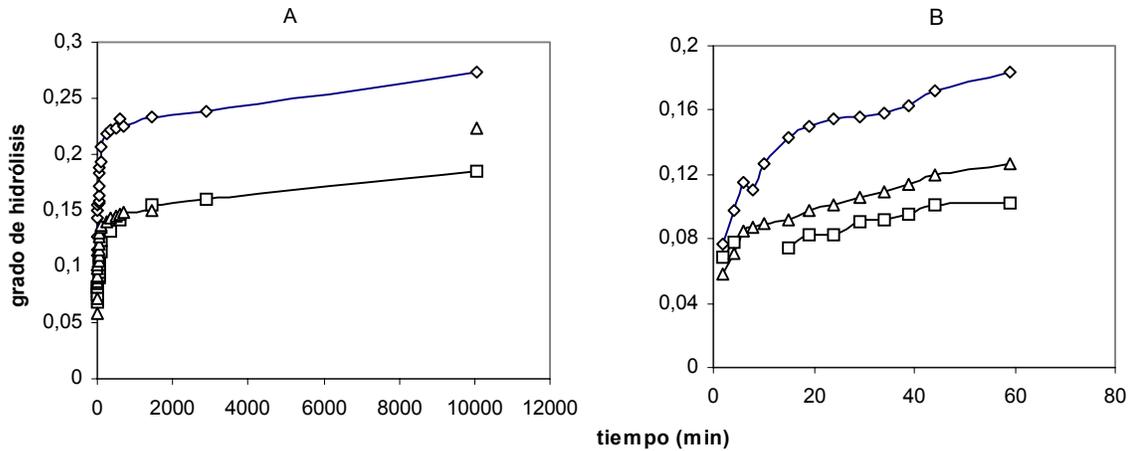
La Figura 14, aunque con muy pocos datos, muestra la relación que existe entre estos rendimientos, donde el intervalo óptimo de trabajo se observa aproximadamente entre el 10 % y el 20 % de Yuc, que proporciona un incremento en el Yimm. A partir de este momento, comienza a decrecer el número de enzimas activas enlazadas al soporte, porque al aumentar la cantidad de moléculas de endoPG unidas covalentemente por unidad de superficie, se elevan las interacciones distorsionantes, que afectan su actividad catalítica.

La actividad endoPG inmovilizada en el experimento 2 es la mayor de todas. En este caso, al tratarse de perlas conservadas en ausencia de iones calcio, su estructura no es tan rígida, permitiendo un mejor acceso del sustrato a la reacción enzimática. Al mismo tiempo, la enzima presentará una mayor movilidad, lo cual también incrementará su actividad.

Considerando, que el rendimiento global de la inmovilización ( $Y_G$ ) es un parámetro muy importante desde el punto de vista del costo del proceso a escala industrial, tendremos entonces que de las variantes estudiadas, la inmovilización covalente de la endoPG sobre alginato de calcio activado con GA, usando una relación enzima /soporte de 10 U/mg, resulta la más atractiva, ya que por cada 100 unidades de enzima, 19 quedan enlazadas y activas. Además, la actividad del biocatalizador inmovilizado, indicador de la calidad del proceso, puede considerarse como buena, en comparación con los resultados reportados por otros autores (Spagna *et al.*, 1995)

### 3.3. Obtención de hidrolizados de pectina

Entre las aplicaciones de esta enzima, se encuentran la obtención de hidrolizados y fragmentos de pectina con actividad biológica, siendo de gran utilidad en la agricultura (Cabrera, 1999) y elaboración de alimentos funcionales (Lang y Dörnenburg, 2003). También se les atribuye actividad benéfica sobre las bifidobacterias y constituyen una importante fuente de fibra dietética. En la Figura 15 se muestra la cinética de hidrólisis enzimática de tres sustratos de pectina utilizando la endoPG inmovilizada covalentemente en alginato de calcio.



**Figura 15.** Cinética de la hidrólisis enzimática de pectinas de diferente grado de esterificación. (◊), pectina de manzana; (◻), pectina clásica; (Δ), pectina cítrica.

La Figura 15-A muestra que estas pectinas presentan diferentes grado de hidrólisis para cada instante de tiempo en que son analizadas, o sea, que la actividad de la endoPG inmovilizada es diferente para cada una de ellas, siendo mayor a medida que es menor el grado de esterificación del sustrato. Da una medida, además, del corto intervalo de tiempo (comparado al tiempo total de reacción, para el cual se alcanza un estado próximo al de equilibrio), aproximadamente 360 minutos, en que transcurre con apreciable rapidez la hidrólisis de la molécula de pectina.

La velocidad de esta reacción no tiene un comportamiento lineal en el tiempo, ni siquiera para los instantes iniciales de la reacción. Una representación ampliada, Figura 15-B, nos permite visualizar lo antes planteado. Como puede verse también, la reacción de hidrólisis se dificulta significativamente a medida que se incrementa el grado de esterificación del sustrato. Esto coincide con estudios similares realizados por otros autores (Barnby *et al.*, 1990; Blanco, 1997; Serrat *et al.*, 2004c, ).

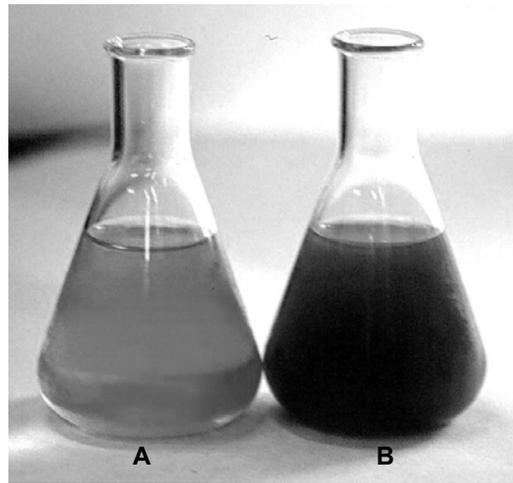
**Tabla 6:** Relación entre el grado de polimerización promedio y el tiempo de reacción de la hidrólisis enzimática de la pectina con endoPG inmovilizada en alginato de calcio

Sustrato	G.E (%)	Tiempo de reacción (min)	Nh
Pectina manzana LM	28.9	10080	3.6
		< 2 - 10	7 - 16
Pectina cítrica	63.4	10080	4.4
		< 2 - 240	7 - 16
Pectina clásica	75	10080	5.3
		< 2 - 600	7 - 16

Los resultados de la Tabla 6 confirman que la endoPG ejerce una baja actividad hidrolítica cuando los residuos de ácido galacturónico se encuentran esterificados, ya que para los casos de la pectina cítrica y la clásica (60-75 % esterificación), el grado de polimerización para el equilibrio de la reacción (7 días), presenta los valores más altos. Es notable que la pectina de manzana alcanza un grado de polimerización entre 7 – 16 (oligogalacturónidos con actividad biológica), en los primeros minutos de la reacción,

mientras para la pectina cítrica la reacción se extiende hasta las 4 horas y para la clásica es necesario que transcurran 10 horas.

La endoPG tiene, además de estas aplicaciones mencionadas, la de clarificar los concentrados de zumos de frutas y solubilizar las estructuras pécticas. Esta aplicación se logró eficazmente en los primeros minutos de la reacción al tratar las diferentes pectinas con la enzima inmovilizada, observándose la floculación del material coloidal (Figura 16). Los preparados de pectina llevan asociados sustancias de naturaleza proteica, que una vez en solución, forman nubes coloidales, a las cuales se asocia la turbidez característica de estas soluciones. Durante el tratamiento enzimático, los fragmentos de pectina originados rodean las estructuras coloidales, neutralizando las cargas electrostáticas, lo cual conduce a la floculación (Grassin y Frauquembergue, 1996).



**Figura 16.** Apariencia visual de la clarificación de pectina cítrica con la endoPG de *K. marxianus* inmovilizada. (A) muestra problema, (B) control sin tratamiento. Condiciones de reacción: PG 0.5 U/mL, temperatura 37 °C. 10 min.

# Conclusiones y Recomendaciones

## CONCLUSIONES

- El medio de cultivo YNB conteniendo glucosa 100 g/L permite obtener la enzima endoPG de la levadura pectinolítica *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, con elevadas actividad enzimática y pureza, pero con una baja productividad.
- Se logró una efectiva activación del alginato con los reactivos GA y NaIO<sub>4</sub> bajo las condiciones estudiadas, obteniéndose resultados considerablemente superiores durante la activación con GA 2 % (m/v).
- La oxidación del soporte con peryodato antes de la gelificación no es recomendable ya que afecta la estructura y resistencia mecánica del gel.
- La inmovilización covalente de la endoPG de *K. marxianus* al soporte orgánico alginato de calcio por las variantes estudiadas permite obtener un biocatalizador con elevada actividad catalítica específica y adecuados rendimientos, mediante un proceso simple y barato, resultando la mejor alternativa aquella que utiliza la activación del soporte con GA y una relación enzima/soporte de 10 U/mg, para la cual se obtiene un rendimiento global del 19.4 % y una actividad inmovilizada de 195 U/g.
- El biocatalizador inmovilizado se muestra efectivo incluso frente a pectinas de alto grado de esterificación (75 %), permitiendo obtener hidrolizados biológicamente activos (grado de polimerización 7-16) en apenas 40 minutos de reacción cuando la actividad enzimática volumétrica es de 0.5 U/mL.

## RECOMENDACIONES

- Optimizar las condiciones de trabajo para el empleo del peryodato en la activación del alginato, tales como tiempo de reacción y proporción del soporte a oxidar.
- Estudiar las condiciones de operación de un biorreactor con la endoPG inmovilizada para la obtención de hidrolizados de pectina biológicamente activos.

# ***Bibliografía***

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alebeek, GJWM; Van Scherpenzeel K, Beldman G; Schols HA; Voragen AGJ (2003) Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 372, 211–218
2. Armand S, Wagnaker M, Sánchez-Torres P, Kester H, Van Santen Y, Dijkstra B, Visser J, Benen J (2000) *Boil. Chem.* 275, 691-696
3. Arroyo, M (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39: 2; 23-29
4. Barnby FM, Morpeth FF, Pyle DL (1990) Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterization of the enzyme. **Enzyme Microb. Technol.** 12, 891-897.
5. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1983) *Yeasts: Characteristics and identification*, 1ª edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
6. Bergey DR, Orozco-Cárdenas M, de Moura DS, Ryan CA (1999) A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1756-1760.
7. Blanco P (1997) Caracterización bioquímica y genética de las poligalacturonasas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis Doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
8. Blanco P, Sieiro C, Villa TG (1999) Production of pectic enzymes in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 175,1-9
9. Boudahir KH, Asuman DS, Mooney DJ (1999) *Polymer* 40, 3575-3584
10. Burriel. F, 1989. *Química Analítica Cualitativa 13ª*. Paraninfo S.A. Madrid.
11. Cabrera JC (1999) Obtención de una mezcla de (1-4)-  $\alpha$ -D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola. *Tesis Doctoral*, Hormaza JV, Igartuburu JM (tutores), Universidad Agraria de La Habana, Cuba
12. Cetenius S. A., Oztop H. N (2000) *Enzyme Microb. Technol.* 26, 497-501
13. Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK (1995) Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1959-67.
14. Crittenden R, Playne M J (1996) *Trends Food Sci. Technol.* 7, 353-361
15. D'Urso, E. M; Fortier, G (1996) *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 482–488.
16. Dalla MS (1997) Alginatos. Lucas Marca/ Sinexi S.A. En <http://www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginato.shtml>
17. De Vries RP, Visser J (2001) *Aspergillus* encimes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 497-522
18. Dumitriu S, Chornet E (1998) in *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility* (Dumitriu S., ed.) 629-748, Marcel Dekker Inc., New York
19. Engasser J, Horvath C (1976) in *Applied Biochemistry and Bioengineering: Immobilized Principles* (Wingard L B, Katchlski-Katzir, Golstein L eds.), 127-220. Academic Press, New York
20. Fadnavis N, Sheelu G, Kumar B. M, Bhalerao M. U, Deshapande A.A (2003) *Biotechnol. Progr.* 19, 557-564
21. Fogarty W M, Kelly C T (1983) Pectic Enzymes. En: Fogarty W M (ed) *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publishers, Londres, pp. 131-182

22. Gainvors A, Nedjaoum N, Gognies S, Muzart M, Nedjma M, Belarbi A (2000) Purification and characterization of acidic endopolygalacturonase encoded by the *PGLI-1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters** 183, 131-135.
23. García A, Balbín M, Cabrera J, Castelvi A (2002) Actividad endopoligalacturonasa de un preparado de la levadura *Kluyveromyces marxianus* aislada de la pulpa del café. *Cultivos Tropicales*, Vol 23, No 1, pp. 67-72
24. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC i TOM D (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cation, the egg box model. *FEBS Lett* 32: 195-198
25. Grassin C, Fauquembergue P (1996) Applications of pectinases in beverages. En: Visser J, Voragen AGJ (eds) *Pectin and pectinases*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 453-462.
26. <http://www.aqa.org.ar/iyqparte2.htm>, Julio, 2004.
27. <http://www.lsbu.ac.uk/water/chaplin.html> , Agosto 29, 2003
28. Jianhua J, Whels A (2000) Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cereisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr Genet* 38: 264-270
29. Kolot, F. B (1981) *Process Biochem.* 5, 2-9.
30. Lang C, Dörnenburg H (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 366-375
31. Lang C, Dörnenburg H (2003) Production of polygalacturonide and their use as food additives. United State Patent Application:20030013678.
32. Lee K Y, Bouhadir K. H, Moodney D. J (2000) *Macromolecules* 33, 97-101
33. Lenhinger A (1972) *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Ediciones Omega S.A. Barcelona
34. Le-Tien C, Millette M, Lacroix M, Mateescu M. A (2004) Modified alginate matrices for he immobilization of bioactive agents. *Biotechnol. Appl. Biotechnol.* 39, 189-198
35. Liu Z, Weis R, Glierder A (2004) Enzymes from Higher Eukaryotes for Industrial Biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol* 42
36. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr Al, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin-phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193, 265-275
37. Luh BS, Phaff HJ (1951) Studies on polygalacturonase of certain yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 213-227.
38. Mateescu M. A, agostinelli E, Weltrowska G, Welltrowski M, Mondovi B (1990) *Biol. Metals* 3, 98-102
39. Mc Elvain S (1970) *La caracterización de compuestos orgánicos*. Editorial Ciencia y Técnica, Instituto del Libro, La Habana, pp. 124-126
40. Mc Ghee JE, Julian G, Detroy RW (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 19-22
41. Meakin PJ, Roberts JA (1991) Anatomical and biochemical changes associated with the induction of oilseed rape (*Brassica napus*) pod dehiscence by *Dasineura brassicae* (Winn.) *Ann. Bot.* 67, 193-197
42. Melo, J. S. and D'Souza, S. F., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1992, 32, 159-170.
43. Munjal N, Sawhney S. K (2002) *Enz. Microb. Techn.* 30, 613-619
44. Nelson NJ (1957) Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol.* 3, 85-86
45. Novo Nordisk (1992). *Librito sobre las enzimas y el medio ambiente*. Novo Nordisk A/S. Dinamarca

46. Patino B, Posada ML, González-Jaen MT, Martínez del Pozo A, Vázquez C (1997) Control of polygalacturonase síntesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Can. J. Microbiol. 43, 1084-1090.
47. Pedroza-Islas R (2002) Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Gaxiola-Cortés MG, Simoes N (eds) Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 3-6 Septiembre del 2002, Cancún, Quintana Roo, México.
48. Pérez S, Mazen K, Herve du Penhoat C (2000) The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. Plant Physiol. Biochem. 37-55.
49. Ravelomanana R, Guiraud JP, Galzy P (1986) Isolation of a pectin-utilizing yeast from cocoa beans. Syst. Appl. Microbiol. 8, 230-233
50. Rossi-Alva JC, Rocha-Leão MHM (2003) A strategic study using mutant-strain entrapment in calciumalginate for the production of *Saccharomyces cerevisiae* cells with high invertase activity. Biotechnol. Appl. Biochem. 38, 43-51
51. Sánchez J, Guiraud JP, Galzy P (1984) A study of the polygalacturonase EC-3.2.1.15. activity of several yeast strains isolated from cocoa. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 262-267.
52. Serrat M (2003) Producción, purificación y caracterización de la poligalacturonasa de una cepa de levadura aislada de residuales del beneficio húmedo del café. Tesis de Doctorado, Bermúdez RC y Villa TG (Tutores). Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
53. Serrat M, Bermúdez RC, Villa TG (2004a) Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*. Potential use of polygalacturonase in foddstuffs. Applied Biochemistry and Biotechnology 117, 49-64
54. Serrat, M; Bermúdez, RC; Villa, TG (2002) Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. Applied Biochemistry and Biotechnology 97, 193-208.
55. Serrat, M; Bermúdez, RC; Villa, TG (2004b) Producción de poligalacturonasa en levaduras: ¿Una violación del principio de economía celular? En: I Simposium Internacional de Ciencias Biológicas Charles T. Ramsden in memoriam (Memorias), Octubre 11-14 de 2004, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
56. Serrat, M; Bermúdez, RC; Villa, TG (2004c) Considerations on endopolygalacturonase activity and comparison ratio determination with emphasis on the influence of substrate esterification degree. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 1534-1538.
57. Shapiro L, Cohen S (1997) Biomaterials 18, 583-590
58. Shevchik VE, Condermine G, Hugouvieux-Cottepattat N, Robert-Baudouy J (1996) Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Mol. Microbiol. 19, 455-66.
59. Sieiro C, Poza M, Vilanova M, Villa TG (2003) Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGU1 gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry. Applied and Environmental Microbiology 69, 1861-1865
60. Šiekšte R, Bartkeviciute D, Sasnauskas K (1999) Clonig, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus*

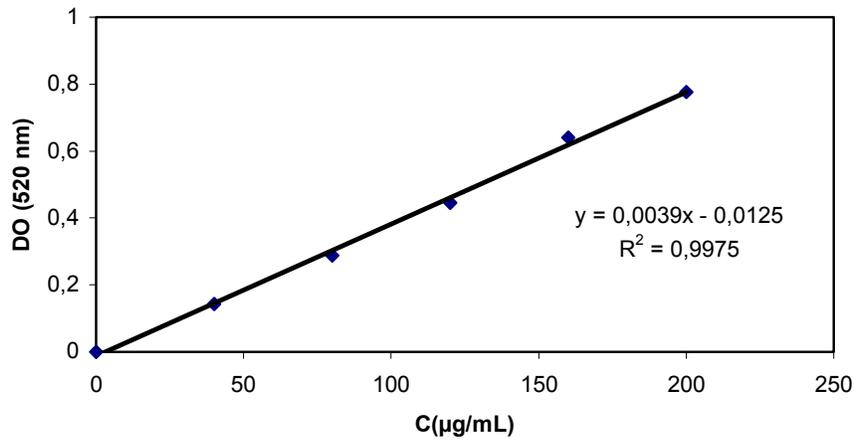
- endopolygalacturonase gene (EPG1). Institute of Biotechnology, Lithuania. Yeast 15:311-312
61. Singh SA, Rao AGA (2002) A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonase from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Appl. Biochem 35, 115-123
  62. Sitrit Y, Downie B, Bennett AB, Bradford KJ (1996) A novel exopolygalacturonase is associated with radicle protrusion in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. (abstract no. 752). Plant Physiol. 111, S-161.
  63. Somogy M (1952). Notes on sugar determination. J Biol. Chem. 159, 19-23.
  64. Spagna G, Giorgio P, Giolioli E (1995) Immobilization of pectinlyase from *A. niger* for application in food technology. Elsevier Science Inc, New York.
  65. Strauss ML, Jolly NP, Lambrechts MG, Van Rensburg P (2001) Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 91, 182-190.
  66. Taylor JE, Webb STJ, Coupe SA, Tucker GA, Roberts JA (1993) Changes in polygalacturonase activity and solubility of polyuronides during ethylene-stimulated leaf abscission in *Sambucus nigra*. J. Exp. Bot. 44, 93-98.
  67. Trevan M D, Boffey S, Goulding K H, Stanbury P (1990) Biotecnología: Principios básicos. Ed. Acribia, Zaragoza. España.
  68. Van Calsteren MR, Pau-Roblot C, Bégin A, Roy D (2002) Biochem. J. 363, 7-17
  69. Weiss F (1970). Determination of organic compounds: Methods and Procedures. Wiles – Interscience, New York.
  70. Wubben JP, Mulder W, Ten Have A, Van Kan JAL, Visser J (1999) Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1596-1602.

**Comunicación personal:**

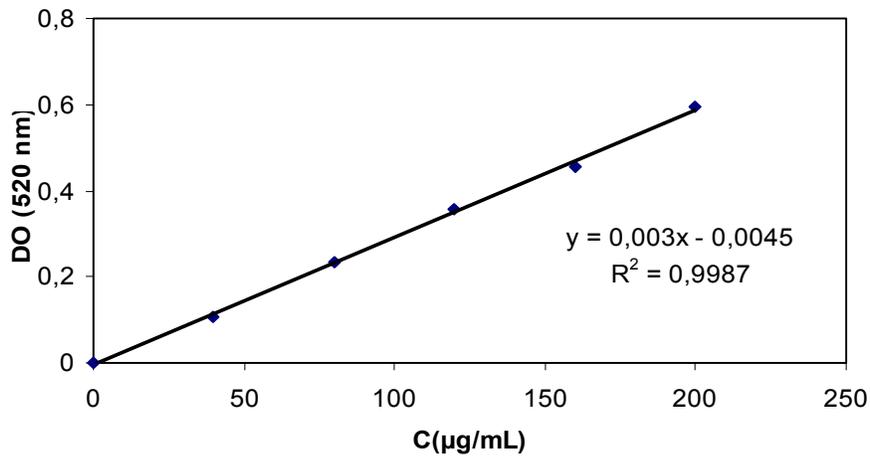
- Acevedo, J. Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Química. Ave. Lumumba s/n, Santiago de Cuba 90500. Cuba.

**Anexos**

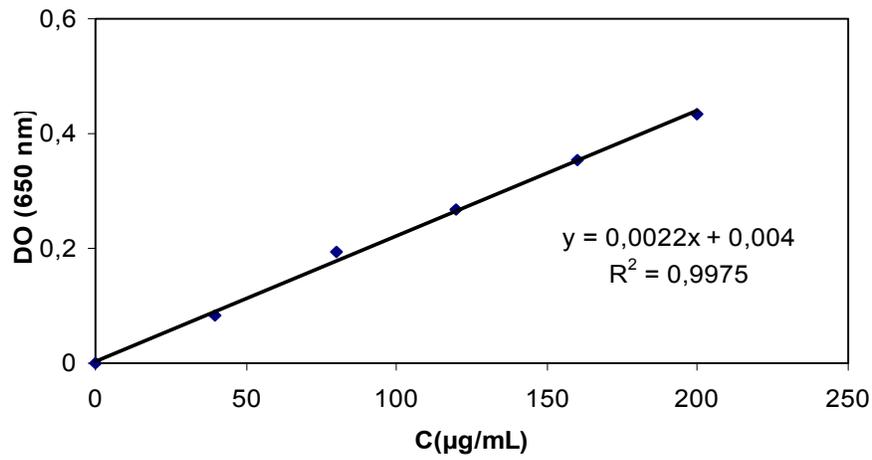
## ANEXOS



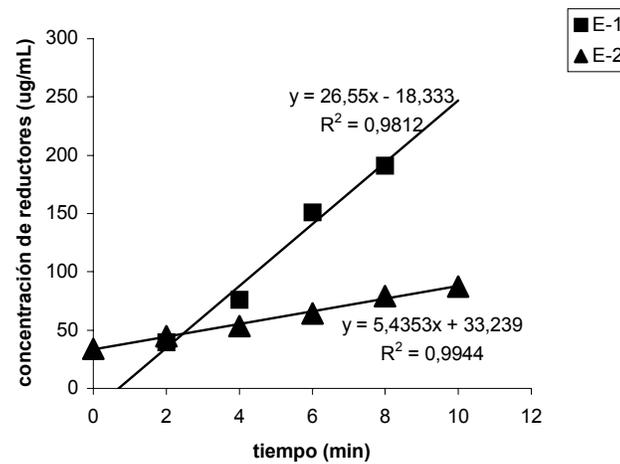
**Figura A.** Curva de calibración de glucosa para la determinación de azúcares reductores por el método de Somogyi - Nelson.



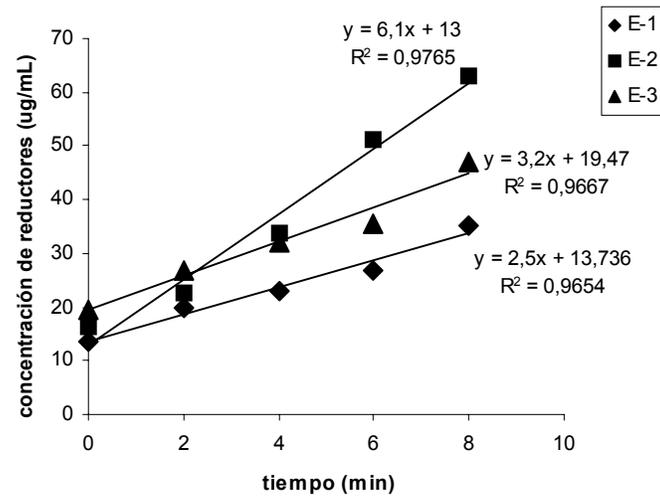
**Figura B.** Curva de calibración de ácido galacturónico para la determinación de azúcares reductores por el método de Somogyi - Nelson.



**Figura C.** Curva de calibración de BSA para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry.



**Figura D.** Determinación de actividad enzimática a la endoPG inmovilizada en alginato-GA.  
E. i: experimento i.



**Figura E.** Determinación de actividad enzimática a la endoPG inmovilizada en alginato-peryodato. E. i: experimento i.