



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

INMOVILIZACIÓN DE UNA LACTASA COMERCIAL EN CLORURO DE
POLIVINILO (PVC) POR ENLACE COVALENTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
E D G A R J A I M E V I L L A R



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Eduardo Bárzana García.

Vocal Prof. Zoila Nieto Villalobos.

Secretario Prof. Amelia María de Guadalupe Farrés González Saravia.

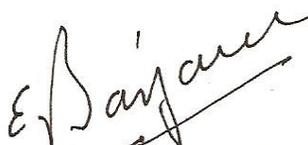
1er. Suplente Prof. Agustín Reyo Herrera.

2º. Suplente Prof. Maricarmen Quirasco Baruch.

Sitio en donde se desarrollo el tema:

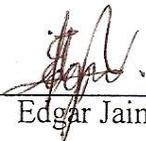
Laboratorio 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:



Dr. Eduardo Bárzana García.

Sustentante



Edgar Jaime Villar.

A MIS PADRES

Don Pascual y Doña Edith, les agradezco demasiado todo el cariño, apoyo y paciencia que me han brindado, este es un logro que nunca hubiese alcanzado sin su ayuda y por eso.... Muchas gracias.

A MI ESPOSA

A Cesilia, mi amiga, compañera, confidente, apoyo y todos los demás términos que encierra la palabra esposa, muchas gracias por tu apoyo y comprensión en estos momentos.

A MI HIJO

A Edgar, mi alegría y mi devoción. Sigue creciendo y haciendo felices a tu madre y a mi, gracias por esas sonrisas inocentes y gracias simplemente por existir.

A MIS HERMANOS

A Juan Carlos, Saúl Ali y Alberto, gracias por su apoyo y amistad que me han acompañado y acompañaran durante toda la vida.

AL DR. EDUARDO BARZANA GARCIA

Eduardo, te agradezco mucho tu apoyo desde el principio de este proyecto hasta el fin y sobre todo el haberme dado un segundo hogar en tu laboratorio E314, muchas gracias.

A ZOILA NIETO VILLALOBOS

Maestra, muchas gracias por haber dedicado su tiempo no solo a la revisión de esta tesis sino a mi enseñanza en el laboratorio de lácteos y gracias por su amistad.

AL QFB AGUSTIN REYO

Reyo, te agradezco tu ayuda, sin ella no hubiese acabado los resultados de HPLC, gracias por ser tan buen amigo.

A LA DRA. AMELIA FARRES Y MARICARMEN QUIRASCO

Les agradezco su participación y su tiempo así como su buena voluntad para con migo y este trabajo que esta llegando a su fin.

A MIS AMIGOS

Gracias por haberme apoyado en las buenas y las malas

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplo de las 6 clases diferentes de enzima.	-	-	10
Tabla 2. Comparación de diferentes métodos de inmovilización.	-	-	28
Tabla 3. Criterios para caracterizar un derivado inmovilizado.	-	-	29
Tabla 4. Contenido de lactosa en leche de diferentes especies de mamíferos.	-	-	35
Tabla 5. Origen, pH y temperatura óptimos para diferentes tipos de lactasas.	-	-	37
Tabla 6. Velocidades iniciales de formación de glucosa en función de la concentración inicial de lactosa.	-	-	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica de velocidad inicial vs. concentración inicial de sustrato.	-	-	12
Figura 2. Gráfica de Lineweaver-Burk	-	-	13
Figura 3. Gráfica de Eadie.	-	-	13
Figura 4. Gráfica de Hanes.	-	-	14
Figura 5. Obtención de Km y Vmax por el método "Direct Linear Plot"	-	-	15
Figura 6. Aminación del PVC con 1,4-diaminobutano.	-	-	41
Figura 7. Diagrama de las reacciones químicas para inmovilizar una proteína.	-	-	48
Figura 8. Espectros de infrarrojo de las muestras de PVC, PVC con tratamiento térmico y PVC aminado.	-	-	49
Figura 9. Esquema de los resultados de hidrólisis de lactosa por TLC.	-	-	50
Figura 10. Cinética de formación de glucosa con la enzima libre.	-	-	51
Figura 11. Cinética de hidrólisis de lactosa con el complejo PVC-ENZ.	-	-	53
Figura 12. Determinación de los parámetros cinéticos del complejo PVC-ENZ con el método "Direct Linear Plot"	-	-	55

RESUMEN

En este trabajo se inmovilizó una lactasa comercial mediante la derivatización del polímero cloruro de polivinilo (PVC) con 1,4-Diaminobutano para su posterior reacción con los grupos amino de las lisinas presentes en la enzima con ayuda de un ligante dialdehídico (glutaraldehído). Se inició con Albúmina Sérica Bovina como sistema modelo para probar el método y posteriormente se utilizó la enzima β -d-galactosidasa marca Lactozym[®] para así obtener un biocatalizador reutilizable capaz de hidrolizar la lactosa en solución. La activación del PVC se comprobó con espectroscopía de infrarrojo y se cuantificó por el método de ninhidrina. La actividad lactásica del PVC-Enzima se comprobó con cromatografía en capa fina mientras que la evolución de la hidrólisis de lactosa se midió por HPLC. El PVC-Enzima obtenido posee una K_M de 33 mM y una V_{MAX} de 0.39mM/min. Además el PVC-Enzima posee mayor resistencia a un tratamiento térmico que la enzima libre. El PVC-Enzima puede ser reutilizado con una actividad residual del 79% comparada con su primer uso.

INTRODUCCIÓN

La lactosa o azúcar de leche es un disacárido formado por una unidad de galactosa y una de glucosa unidas por un enlace glicosídico $\beta(1\rightarrow4)$ ¹, enlace que se puede hidrolizar en condiciones ácidas o bien con ayuda de una enzima llamada lactasa o β -D-galactosidasa^{1,2,3}. La lactosa puede causar problemas en ciertos alimentos que la contienen por su baja solubilidad, bajo poder edulcorante y problemas de intolerancia en algunas personas².

La inmovilización de enzimas es un área de estudio de las últimas décadas, con el propósito de ahorrar la cantidad de enzima a emplear haciéndola reutilizable. En los procesos donde se usan las enzimas libres es más costoso separarla para su reuso que utilizar una cantidad nueva. Es por ello que se han desarrollado varias técnicas de inmovilización física o química.

En este trabajo se utilizaron 1,4 diaminobutano y glutaraldehído, ligados covalentemente a partículas de PVC en polvo, con el fin de obtener un soporte activado donde se inmovilizó la lactasa de Lactozym[®] para su posterior uso en la hidrólisis de lactosa en solución. La actividad lactásica se comprobó en una solución de lactosa, midiendo su disminución por HPLC⁴.

OBJETIVOS

General:

Inmovilizar una lactasa en cloruro de polivinilo para su uso en la hidrólisis de lactosa en solución.

Particulares:

- Obtener un derivado aminado del PVC con 1,4-diaminobutano.
- Obtener un biocatalizador con el derivado del PVC-NH₂ y la enzima lactasa Lactozym[®].
- Utilizar el biocatalizador con actividad lactásica en la hidrólisis de lactosa en solución.
- Determinar la capacidad de reutilización del biocatalizador.

ANTECEDENTES

Enzimas.

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas; son catalizadores biológicos de una alta eficiencia y especificidad y suelen ser 10^3 a 10^7 veces más rápidas que las reacciones correspondientes no catalizadas⁵.

Algunas enzimas pueden reaccionar con un grupo de moléculas con estructuras estrechamente relacionadas mientras que otras sólo actúan sobre un compuesto molecular único. Por ejemplo, algunas lipasas reaccionan con cualquier lípido sin importar el tamaño del ácido graso contenido en este lípido mientras otras sólo reaccionan en ciertas posiciones del triacilglicerol. Otro ejemplo resulta de algunas proteasas que hidrolizan cualquier enlace peptídico mientras que otras son específicas dependiendo de los aminoácidos que formen ese enlace.

Muchas enzimas poseen estereoespecificidad, lo cual significa que actúan sobre un solo estereoisómero del sustrato. Una gran ventaja de las reacciones enzimáticas es que no generan subproductos de reacción.

Un comité de la Unión Internacional de Bioquímica publicó un esquema de clasificación que asigna un número a cada enzima, clasificándolas en seis grupos importantes de acuerdo a la clase general de reacción que efectúan:

1.- Las oxidoreductasas catalizan reacciones de oxidación-reducción. La mayor parte de estas enzimas se conocen como deshidrogenasas, pero

otras reciben el nombre de oxidasas, peroxidasas, oxigenasas o reductasas.

2.- Las transferasas catalizan reacciones de transferencia de grupos. Muchas de ellas requieren la existencia de coenzimas.

3.- Las hidrolasas catalizan reacciones de hidrólisis. Son una clase especial de transferasas donde el agua les sirve como un aceptor del grupo transferido.

4.- Las liasas catalizan las reacciones de eliminación no hidrolítica, no oxidante, o la lisis de un sustrato en reacciones que generan un enlace doble. En la dirección inversa, una liasa cataliza la adición de un sustrato a un doble enlace de otro sustrato. Cuando una liasa cataliza una reacción de adición se denomina frecuentemente cinasa.

5.- Las isomerasas catalizan reacciones de isomerización.

6.- Las ligasas catalizan la unión de dos sustratos en reacciones que necesitan el suministro de energía potencial de una molécula de nucleósido trifosfato como el ATP. Se les da el nombre de sintetasas⁵.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestra un ejemplo de cada una de las clases de enzimas que se explicaron anteriormente⁵.

Tabla 1: Ejemplo de las 6 clases principales de enzimas⁵.

CLASE PRINCIPAL	ENZIMA	DESCRIPCIÓN DE LA REACCION
1.- Oxidoreductasa.	Lactato deshidrogenasa	Oxidación del alcohol secundario, L-Lactato a piruvato (cetónico).
2.- Transferasa	Alanina transaminasa (Alanina aminotranferasa)	Transferencia de un grupo amino.
3.- Hidrolasa	Tripsina	Hidrólisis de enlaces peptídicos Lis-Y o Arg-Y.
4.- Liasa	Piruvato descarboxilasa	Descarboxilacion del piruvato.
5.- Isomerasa	Alanina racemasa	Interconversión de isómeros de L- y D-alanina.
6.- Ligasa	Glutamina sintetasa	Síntesis de L-glutamina dependiente de ATP.

Cinética enzimática.

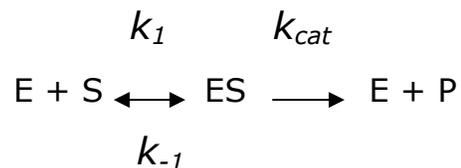
En términos generales la velocidad de reacción es el cambio en la concentración de producto respecto al tiempo y a su vez es proporcional a la concentración de sustrato:

$$V = \frac{\Delta P}{\Delta t} = kS^n$$

Donde V es la velocidad de reacción, ΔP es el incremento en la concentración de producto, Δt es el intervalo de tiempo, k es la constante de velocidad, S es la concentración de sustrato en el tiempo t y n es el orden de la reacción.

En las reacciones enzimáticas, la velocidad de reacción, a una concentración de saturación de sustrato, depende de la concentración de enzima pero no así de la concentración del sustrato, pues S se hace de orden cero.

El modelo de las reacciones enzimáticas comprende la enzima E , el sustrato S , el complejo enzima-sustrato que se forma como paso previo a la transformación y liberación del producto P , por lo que tenemos:



Que puede ser modelada mediante la ecuación de Michaelis-Menten.

$$V = \frac{V_{\text{MAX}} (S)}{K_M + (S)}$$

Su expresión grafica se presenta en la figura 1.

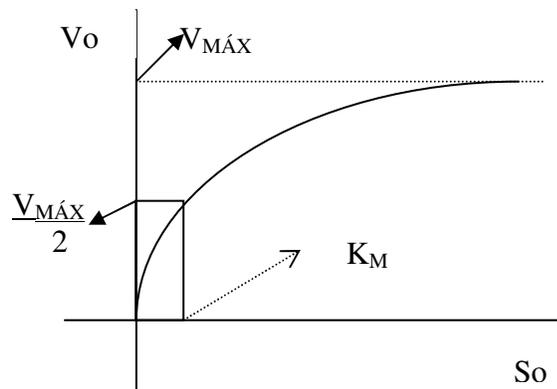


Figura 1. Gráfica de velocidad inicial (Vo) vs. concentración inicial de sustrato (So).

Para determinar los valores de Km, Kcat y Vmax, los métodos comúnmente usados son el de Lineweaver-Burk⁶, el de Eadie⁷ y el de Hanes⁸. Todos ellos consisten en linealizar la ecuación de Michaelis-Menten seguido de graficar las variables transformadas.

El método de Lineweaver-Burk⁶ consiste en graficar 1/Vo contra 1/Vmax, como se muestra en la figura 2. Esta expresión matemática se obtiene con una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten, de tal forma que:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \left[\frac{1}{S_o} \right] + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

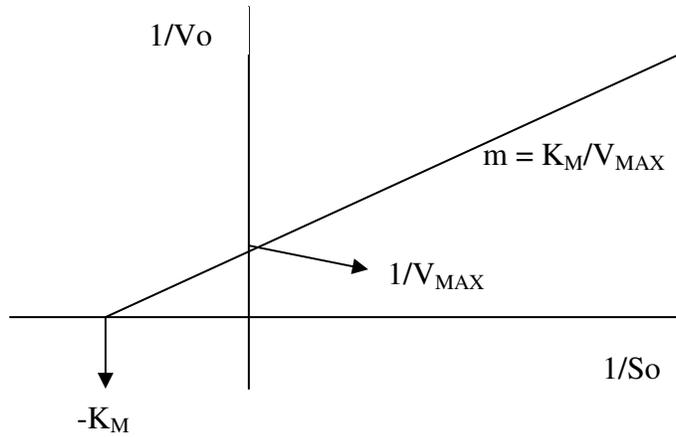


Figura 2. Gráfica de Lineweaver-Burk ($1/V_o$ vs. $1/S_o$)

Dando así una línea recta de la forma $Y = mX + b$ donde la ordenada es el inverso de la Velocidad máxima y la pendiente es K_m/V_{max} .

El método de Eadie⁷ consiste en graficar V_o contra V_o/S_o (Figura 3) y el de Hanes⁸ (Figura 4) S_o/V_o contra S_o .

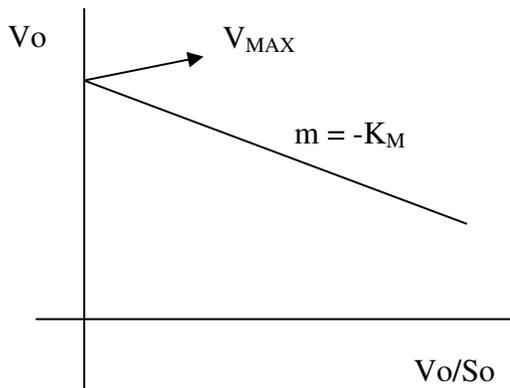


Figura 3. Gráfica de Eadie. V_o vs. V_o/S_o .

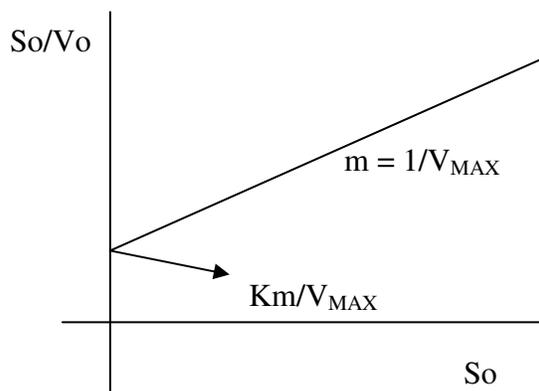


Figura 4. Gráfica de Hanes. S_o/V_o vs. S_o .

Fue el mismo Hanes⁸ en 1932 quien puso atención a los riesgos estadísticos que acompañan a cualquier transformación de la ecuación de Michaelis- Menten. Dichas observaciones no fueron tomadas en cuenta hasta que Johansen y Limry en 1961 y Wilkinson en el mismo año examinaron las propiedades estadísticas de las gráficas lineales, observando, igual que Bowd y Riggsen (1965), que los 3 métodos son estadísticamente objetables y el de los recíprocos (Lineweaver-Burk) es por mucho el peor⁹.

Existe otro método conocido en inglés como "THE DIRECT LINEAR PLOT⁹" o graficado directo de líneas que consiste en utilizar los ejes K_m y V_{max} correspondientes a los ejes X y Y respectivamente. Por cada observación (S_o, V_o) se marca un punto en $K_m = -S_o$ en el eje K_m y $V_{max} = V_o$ en el eje V_{max} . Se traza una línea con estos dos puntos y se prolonga hasta el primer cuadrante; esto se hace para cada observación de S_o y V_o . Todas estas líneas convergen en un punto cuyas coordenadas son K_m, V_{max} .

La teoría que soporta este método dice que la ecuación de Michaelis-Menten

$$V_i = \frac{V_{\text{Max}} S_i}{K_m + S_i}$$

Se puede ordenar:

$$\frac{V_{\text{max}}}{V_o} + \frac{K_m}{-S_o} = 1$$

Análogo a la ecuación de una hipérbola:

$$\frac{X}{a} + \frac{Y}{b} = 1$$

Esto es la ecuación de una línea recta en el espacio XY con interceptos "a" en el eje X y "b" en el eje Y. Análogamente en el espacio $V_{\text{max}}K_m$ cada observación (S_o, V_o) tendrá una recta en los puntos $(0, V_o)$ y $(-S_o, 0)$. Para un conjunto de observaciones S_o, V_o existe un punto de convergencia cuyas coordenadas serán K_m, V_{max} . Esto se muestra en la figura 5.

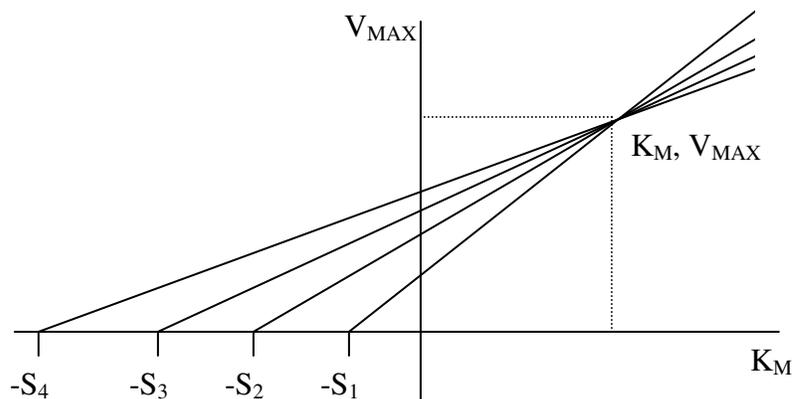


Figura 5. Obtención de K_M y V_{MAX} por el método "Direct Linear Plot", graficando una recta desde $-S_0$ a V_0 y proyectándola. El punto donde todas las observaciones convergen tiene por coordenadas K_M , V_{MAX} .

La ventaja de este método sobre el de los inversos es que no utiliza regresiones lineales que pueden incluir un punto malo, sino que utiliza la convergencia en un punto de una serie de rectas. Además, el método de los inversos es utilizado en bajas concentraciones de sustrato, condición donde los problemas de difusión se hacen más notorios en el caso de enzimas inmovilizadas. Además, los errores experimentales son frecuentemente más grandes a bajas concentraciones de sustrato y bajas velocidades de reacción. En el método de Eadie existe el problema de que la variable V_0 aparece en ambos ejes y que S_0 es un recíproco en el eje X. Estas desventajas son parcialmente minimizadas en el método de Hanes. Una ventaja adicional de este método (Direct Linear Plot) es que es fácil ver qué punto se desvía considerablemente de la tendencia de todas las demás líneas a converger en K_M , V_{MAX} . Por lo tanto esta es la mejor opción en cuanto a elegir para determinar las constantes cinéticas¹⁰.

Inmovilización enzimática

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se ubica a la enzima en una posición definida en un aglomerado insoluble que la hace recuperable, reteniendo su actividad catalítica y su estereoespecificidad.

Algunas de las ventajas de utilizar enzimas inmovilizadas son¹¹:

- El aumento de la estabilidad de la enzima.
- La recuperación del derivado para su almacenamiento o reuso.

Algunos inconvenientes son¹²:

- La velocidad de reacción es modificada por el efecto de difusión del sustrato a la enzima y del producto al medio de reacción.
- Siempre suele haber pérdida de actividad en el proceso de inmovilización.
- El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.
- El soporte puede requerir un tratamiento químico previo para hacerlo susceptible a reaccionar con la enzima.

En general los métodos de inmovilización se clasifican en dos grandes categorías¹³: retención física y unión química.

En el caso de la retención física¹³, ésta puede ser por atrapamiento en geles o fibras o inclusión en membranas. El atrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades internas de una matriz sólida porosa, normalmente polímeros como la poliacrilamida, colágeno, alginatos, carrageninas, resinas de poliuretano, o bien por monómeros polimerizables que dan origen a

matrices porosas. La inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima con el monómero, seguido de la polimerización de éste por un cambio de temperatura o la adición de un reactivo químico (copolímero) dando así geles o bien fibras que son más resistentes que los geles. En el caso de los geles la enzima se encuentra en su interior mientras que en el caso de las fibras se encuentra ocluida en las microcavidades. Este proceso requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos y tiene la ventaja de que la enzima no sufre alteraciones en su estructura, siempre y cuando la naturaleza del proceso no implique reacciones con los sitios activos de la enzima.

La inclusión en membranas se divide en dos tipos¹³: microencapsulación y reactores de membrana. En la microencapsulación, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de sustrato y producto pero no así de la enzima. Estas membranas pueden ser permanentes (generadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas micelas inversas). Las microcapsulas formadas son de forma esférica con tamaños de 1 a 100 micras de diámetro. Este método sirve para encapsular enzimas, células y biomoléculas. Por otro lado los reactores de membrana utilizan membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato e impermeables a la enzima. Usualmente la enzima se encuentra adsorbida a un soporte.

En el caso de la inmovilización por unión química¹³ podemos hablar de dos grandes grupos, la unión a soportes (iónica o covalente) y el reticulado.

La unión a soportes es uno de los métodos más empleados. Este debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones del reactor y ser fácilmente separable del medio de reacción para su posterior reuso. Claramente la reacción entre el soporte y la enzima no debe dañar el sitio activo. Aunque la forma y estructura de los soportes puede variar de muchas maneras, los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos: soportes orgánicos y soportes inorgánicos. Entre estos últimos se cuenta con soportes naturales como las arcillas, bentonita, piedra pómez, sílice, etc, o productos manufacturados como óxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc. El grupo de soportes orgánicos se divide en dos, polímeros naturales como son polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc) y proteínas fibrosas (colágeno queratina, etc.) y polímeros sintéticos como son poliolefinas (poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) y otros como poliamidas, polivinil alcohol, cloruro de polivinilo, etc.

En las uniones no covalentes, la enzima se une al soporte sin derivatizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en esta inmovilización son:

- El pH del medio controla el número y la naturaleza de las cargas presentes en la enzima y el soporte.
- La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima. Diámetro del poro: es recomendado que sea por lo menos dos veces el eje mayor de la enzima.

Las ventajas de los métodos no covalentes son:

- Fácil preparación.
- Bajo costo.
- No hay cambios de especificidad de la enzima.
- Los derivados son estables en medios con bajo contenido de agua.

Las desventajas son:

- Los derivados son poco estables mecánicamente.
- La unión al soporte es débil.

Una variante en este tipo de técnica es la utilización de resinas de intercambio iónico, que contienen grupos funcionales y contraiones móviles que son intercambiados por la enzima sin producir cambios en la matriz insoluble.

La inmovilización por enlace covalente se basa en la derivatización química del soporte para hacerlo reaccionar con alguno de los aminoácidos de las proteínas, o bien, con ayuda de agentes entrecruzantes, hacer que las proteínas reaccionen con el soporte o con ellas mismas¹⁰. De los 20 aminoácidos que conforman a las proteínas los más empleados son lisina, cisteína, tirosina, histidina, y en menor grado la metionina, triptofano, arginina, ácido aspártico y glutámico¹³. El resto de los aminoácidos debido a su carácter hidrofóbico no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y por lo tanto no están disponibles para reacciones de inmovilización.

Los métodos covalentes presentan las siguientes ventajas:

- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla.
- La cantidad de enzima inmovilizada es constante.
- Los derivados pueden usarse en cualquier reactor.
- Se tiene una estructura terciaria inmovilizada mas rígida que resulta en mayor estabilidad a cambios en la temperatura, pH y presencia de solventes orgánicos.

Las desventajas son:

- Se pueden obtener derivados inactivos por la presencia de muchos puntos de unión que deforman la estructura terciaria.
- Se puede afectar el sitio activo.
- No se aconseja en enzimas muy sensibles a pH, fuerza iónica, etc.

En el caso del entrecruzamiento o reticulado (cross-linking)¹⁴ se ocupan reactivos bifuncionales que originan uniones químicas intermoléculas en las enzimas. Como reactivos bifuncionales tenemos: dialdehidos, diiminoesteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, diaminas activadas con carbodiimida. El resultado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. El co-reticulado ayuda a evitar perdidas de la actividad enzimática por difusión mediante el entrecruzamiento de moléculas de enzima con moléculas de proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina como la albúmina bovina.

Actualmente el método más novedoso de inmovilizar por entrecruzamiento es la "cristalización por entrecruzamiento enzimático"

que consiste en la cristalización de las enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído¹⁴ (CLECs Cross Linked Enzyme Crystal). El aumento de estabilidad se basa en obtener un entramado cristalino donde las moléculas de enzima están rodeadas únicamente por más moléculas de proteína. De esta manera la enzima actúa como soporte y se estabiliza intermolecularmente con las demás enzimas; la estructura cristalina posee canales de 20 a 50 Å que permiten el paso del sustrato al centro activo de la enzima y la salida del producto o productos al medio circundante. Estos cristales soportan altas temperaturas y pH extremos además de la acción de las proteasas.

Como se mencionó anteriormente, la inmovilización tiene varios efectos en el comportamiento de la enzima. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad, en segundo la enzima es un sistema heterogéneo en el que todos los componentes que actúan en el proceso (pH, sustratos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se ubican en la interfase por lo que la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo estérico, difusional y de microentorno¹³.

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se asocia a las siguientes razones¹⁵:

- Estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Esta estabilización se obtiene principalmente en los métodos de inmovilización por enlaces covalentes, como son la reticulación y la unión a soportes. La inmovilización covalente multipuntual se puede combinar con la

adición de reactivos bifuncionales que den mayor rigidez a la estructura de la enzima.

- Protección frente a proteasas en el medio, ya que se ha visto que la unión de proteasas a soportes evita su autólisis. Para el caso de otras enzimas, la baja difusión de proteasas reduce su acción hidrolítica.
- Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región en el espacio.
- Existe una alteración del microentorno de la enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte; por ejemplo si una enzima sensible al oxígeno (como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción¹³. En otros casos el soporte tiene un efecto amortiguador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno aunque en la solución se produzcan cambios importantes en el pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de solventes orgánicos, la polaridad del soporte o su capacidad para retener agua será el regulador de la actividad enzimática cuanto mayor es la afinidad del soporte al agua o mayor su capacidad de retención de agua. Así la enzima tendrá la cantidad de agua necesaria en su microentorno para mantener su conformación activa.

También la actividad enzimática es afectada por el proceso de inmovilización, ya que en muchas ocasiones la actividad se ve disminuida incluso hasta su pérdida por razones como las siguientes:

- La unión de la enzima con el soporte se produce de forma que el sustrato literalmente no puede llegar al sitio activo de la enzima.
- Durante el proceso de inmovilización, el soporte reacciona con alguno de los aminoácidos del sitio activo de la enzima o bien con algún aminoácido esencial para mantener la actividad enzimática.
- La inmovilización da lugar a un cambio conformacional en la estructura de la proteína produciendo un derivado con forma inactiva.
- Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, entonces los cambios en la actividad enzimática, ya sea aumento o disminución, pueden deberse a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

Debido a que la enzima está inmovilizada¹⁶, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede ser impedida por resistencias internas y externas; las resistencias difusionales externas se dan porque el soporte es insoluble en el medio de reacción y el sustrato debe atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea al soporte. En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración del sustrato es menor que en toda la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Por tanto, los valores de K_m de las enzimas inmovilizadas son siempre aparentes (K_m'). Las resistencias difusionales internas se dan cuando el sustrato debe atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada. Existen varias formas de minimizar los efectos difusionales interno y externos, como por ejemplo: disminuir el tamaño

del biocatalizador, aumentar la concentración del sustrato, incrementar la velocidad de agitación, o el flujo en el reactor. Con estas medidas se logra reducir el grosor de la capa de Nernst y como consecuencia, el valor de K_m' disminuye.

Los efectos electroestáticos entre el sustrato y el soporte también interfieren en la pérdida de actividad, de tal forma que si estos tienen la misma carga eléctrica entonces la repulsión será la responsable. Mientras que si las cargas eléctricas son opuestas será entonces la atracción hacia el soporte y no así a la enzima. Cuando el sustrato y el soporte tienen cargas opuestas, el valor de K_m' aparente puede verse hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución. Hornby et. al.¹⁷ desarrollaron una expresión matemática que permite calcular la actividad de las enzimas inmovilizadas, teniendo en cuenta los factores de carácter difusional y los del tipo electroestático, quedando la ecuación de Michaelis Menten como sigue:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K'_m + [S]} \quad \text{donde} \quad K'_m = \frac{(K_m + x \cdot V_{max})}{D} \cdot \frac{RT}{RT - x \cdot z \cdot F \cdot V}$$

$K_m + (x \cdot V_{max})/D$ Es el termino de Difusión.

$RT / (RT - x \cdot z \cdot F \cdot V)$ Es el termino electroestático.

X Espesor de la capa de Nernst.

D Coeficiente de difusión.

T Temperatura °K.

z Valencia del sustrato.

F Constante de Faraday.

R Constante universal de los gases.

V Gradiente de potencial en el soporte.

Se puede disminuir el valor de K'_m variando tanto el término de difusión como el electrostático. En el primer caso, la disminución del valor de K'_m se consigue al disminuir el tamaño del soporte o al aumentar el flujo o la agitación. En el término electrostático, si "z" y "V" tienen el mismo signo, es decir si el soporte y el sustrato tienen la misma carga, el término electrostático es mayor de 1 y K'_m aumenta, si tienen cargas opuestas disminuye y si carecen de carga entonces K'_m solo depende del término de difusión¹⁷.

Por otro lado los factores estéricos también son responsables de la disminución de la actividad enzimática; en un principio cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya un cambio considerable en su actividad, siempre y cuando el sustrato sea de bajo peso molecular. Sin embargo, no es el caso para sustratos poliméricos como proteínas hidrolizadas por proteasas o bien de ácidos grasos de cadena larga ante las lipasas. Este efecto estérico se puede evitar o minimizar al inmovilizar covalentemente con un brazo espaciador largo entre el soporte y la enzima, ya que en el microespacio la enzima queda relativamente más libre con un brazo químico largo.

La actividad enzimática también depende del microentorno que la rodea ya que la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte contiene grupos con carga eléctrica. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor de pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima es activa. Por ejemplo una enzima unida a un soporte cargado negativamente (v. g. CM-sephadex) tendrá en su microentorno una concentración mayor de iones hidrógeno (H^+) que en el medio de reacción. Como resultado la enzima sería mas activa a un pH más alcalino que el normal. La enzima

sería más activa a un pH más ácido si estuviera unida a un soporte cargado positivamente (v.g. DEAE-sephadex).

Aunque, se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, es fácil de ver que no existe un método universal para inmovilizar todas las enzimas en todos los casos o usos que se le quieran dar. Por ejemplo no es práctico hacer una inmovilización no covalente en un reactor empacado, en continuo y en un medio acuoso ya que ésta con el tiempo será removida por solubilización provocando la pérdida de la enzima. Sin embargo, con toda la información disponible se pueden hacer ciertas generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así poder elegir el más adecuado a nuestras necesidades en cada aplicación específica. Esta elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción a llevarse a cabo, el tipo de reactor a utilizar, el sustrato a ser procesado así como el producto formado, la sensibilidad de la enzima a las condiciones de inmovilización, etc. A continuación se muestra la tabla 2 que resume en forma general las condiciones de inmovilización para los 5 métodos ya mencionados.

Tabla 2: Comparación de diferentes métodos de inmovilización¹³.

Método	Inclusión en membranas	Atrapamiento.	Reticulado.	Adsorción química.	Unión covalente.
Preparación.	Intermedia.	Difícil.	Intermedia.	Sencilla.	Difícil.
Fuerza de unión.	Débil.	Media.	Débil-Media.	Media.	Fuerte.
Actividad enzimática.	Media-Alta.	Baja.	Baja.	Media	Alta
Regeneración del soporte.	Posible.	Posible.	Imposible	Posible	Difícil.
Costo del proceso.	Medio-alto.	Medio.	Medio.	Bajo.	Variable.
Estabilidad.	Media.	Alta.	Baja.	Alta	Alta
Validez para cualquier enzima.	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia al ataque microbiano.	Si	No.	No.	No	No

En general, los métodos de preparación difícil y de mayor costo proporcionan biocatalizadores mas estables y duraderos; en cambio aquellos métodos mas sencillos como el atrapamiento o la adsorción, donde la unión con la enzima al soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que deben ser repuestos continuamente. Una vez elegido el método mas conveniente es necesario caracterizarlos según se requiera apegándose a los siguientes criterios (Tabla 3):

Tabla 3: Criterios para caracterizar un derivado inmovilizado¹⁸

CARACTERIZACION DE UN DERIVADO INMOVILIZADO	Descripción general.	1. Esquema de reacción. 2. Enzima a inmovilizar. 3. Tipo de soporte empleado. 4. Método de inmovilización.
	Preparación.	1. Condiciones de reacción. 2. Rendimiento en peso seco. 3. Actividad residual del sobrenadante.
	Caracterización Físico Química.	1. Configuración del biocatalizador. 2. Grado de hinchamiento. 3. Grado de compresibilidad en columna. 4. Atrición en sistemas de agitación. 5. Velocidad mínima de fluidización.
	Cinética.	1. Estabilidad de la enzima almacenada. 2. Estabilidad operacional. 3. Posibilidad de reutilización. 4. Grado de conversión. 5. Limitaciones difusionales.

Después de ver un poco de los métodos de inmovilización de enzimas es prudente ver algunas de las aplicaciones más importantes de las enzimas, que se pueden clasificar en:

- 1.- Aplicaciones analíticas: biosensores¹⁹.
- 2.- Aplicaciones medicas: Tratamientos con enzimas inmovilizadas.
- 3.- Aplicaciones industriales: Industria química, farmacéutica, de tratamiento de residuos, alimentaria, etc.

Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible en medicina, en el control de calidad de alimentos y fármacos y en el cuidado del medio ambiente. En principio se puede diseñar un biosensor para cualquier compuesto que sea capaz de interaccionar específicamente con un sistema biológico¹⁹. Normalmente el biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada, por ejemplo: enzimas, células, anticuerpos, antígenos, etc. Esta a su vez esta próxima a un transductor (el que traduce el evento biológico a un elemento eléctrico, óptico, calorimétrico, etc capaz de ser medido) posteriormente un amplificador de señal y por último un resultado el cual puede o no ser directo.

El empleo del los biosensores presenta las siguientes ventajas:

1. Los instrumentos requeridos son baratos y sencillos.
2. El análisis es muy sensible.
3. Permite el uso de muestras coloridas o turbias que no se pueden analizar por métodos colorimétricos.

Los métodos de inmovilización mas usados en el diseño de los biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos, las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible del electrodo.

Algunas aplicaciones de los biosensores son:

- Diagnóstico clínico. Los niveles séricos de lactato, ácido úrico y glucosa se pueden detectar mediante electrodos sensibles enzimáticos disponibles comercialmente. Actualmente, el desarrollo de nuevos biosensores va orientado a la detección de fármacos, células y virus patógenos.
- Determinación de urea con ureasa inmovilizada y adaptada a un electrodo se puede determinar la concentración de urea en una solución²⁰.
- Determinación de la concentración de penicilina en solución mediante el uso de la penicilinasa capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico de la estructura de la penicilina²¹.
- Control de calidad: en las industrias alimentaria y farmacéutica los biosensores pueden determinar el grado de contaminación microbiana de un producto o por ejemplo cuantificar el azúcar presente en una bebida o una solución inyectable en caso de farmacia.
- Medioambiente: los biosensores pueden medir el nivel de contaminación ambiental, así como los contaminantes y su concentración en aguas tanto de riego, como para consumo humano o industrial así como las aguas de desecho industrial y humano; se pueden medir pesticidas, residuos tóxicos, herbicidas e incluso microorganismos.

En el caso de las aplicaciones médicas, existen muchas enfermedades causadas por alteración o carencia de una determinada enzima. También hay enzimas con actividad antitumoral cicatrizante y con otras aplicaciones terapéuticas. El tratamiento con estas enzimas inmovilizadas permitiría una acción más prolongada ya que serían más resistentes a la acción de las proteasas. Por ejemplo la L-asparaginasa se utiliza en el tratamiento de leucemias y cánceres diseminados que requieren asparagina para desarrollarse. En la actualidad se ha desarrollado un hemodializador de fibra hueca que contiene asparaginasa inmovilizada. La tripsina¹³ o la colagenasa se utilizan para eliminar los tejidos muertos de heridas, quemaduras, úlceras, etc.; para acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e injertos de piel y también para inhibir el crecimiento de algunos agentes contaminantes. Este tipo de enzimas se puede inmovilizar en celulosas o fibras que formarán parte del tejido de los apósitos y vendas.

La industria farmacéutica trabaja con moléculas lábiles, y en muchos casos con moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa seria a la síntesis química en puntos clave del proceso, donde no conviene trabajar a temperaturas altas o se requiere una elevada especificidad de sustrato. Las enzimas son unos reactivos quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de alta pureza. Ésta es una ventaja fundamental cuando las normas así lo establecen ya sea para la producción de fármacos, hormonas o antibióticos.

En la industria alimentaría se ocupan muchas enzimas ya sea en el proceso, preparación y conservación de los alimentos. Normalmente estas enzimas solubles añadidas son inactivadas por calentamiento una

vez que el tratamiento ha concluido; aunque en ocasiones se permite que continúen su actividad para que los alimentos desarrollen el aroma y la textura deseados, pero en ningún caso la enzima se reutiliza. La inmovilización permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente en operaciones continuas o por lote. Sin embargo existen limitaciones a su empleo relacionado con los requisitos económicos y sanitarios inherentes al procesado de los alimentos. Algunos ejemplos de sus aplicaciones se muestran a continuación¹³.

- Hidrólisis de proteínas: las enzimas proteolíticas se emplean en la modificación del contenido proteico de los alimentos. De esta forma se han conseguido hidrolizados de proteína de trigo mediante el uso de pepsina y otras proteasas coimmobilizadas en quitosan. Otras proteasas inmovilizadas han sido empleadas en la disminución del contenido de lactoglobulina en la leche en el caso de la industria quesera y en la solubilización de concentrados proteicos de pescado.
- En la hidrólisis de hidratos de carbono: como en el caso de la presencia de lactosa en la leche y en algunos derivados lácteos que es perjudicial para aquellas personas que carecen de lactasa intestinal²². El proceso de degradación del almidón procedente de diversas fuentes vegetales como el maíz, se realiza mediante la utilización de amilasa, glucoamilasa y glucoisomerasa inmovilizadas, obteniéndose un jarabe enriquecido en fructosa que sirve como edulcorante en algunas bebidas²³. Para la obtención de extractos o zumos de frutas y verduras se emplea la pectinasa que ayuda a hidrolizar la pectina, la cual es un componente estructural de las mismas, obteniendo un producto menos viscoso

y más concentrado. Esta enzima se emplea inmovilizada en diferentes soportes (poliésteres, poliacrilamidas, alúmina, etc.)

- En la mejora de las características organolépticas de algunos alimentos¹³: el empleo de células de *Arthobacter globilis* atrapadas en poliacrilamida permite eliminar el sabor amargo de los jugos cítricos. Por otra parte las células de *Leuconostoc oenos* inmovilizadas en alginato se han empleado en la desacidificación de vinos. Endo- β -glucosidasas inmovilizadas en esferas acrílicas permiten incrementar el aroma de vinos y zumos. Finalmente ciertas lipasas y proteasas encapsuladas se están aplicando en la maduración de quesos.
- En la obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios²⁴: en la obtención industrial del ácido L-málico interviene la fumarasa de *Brevibacterium flavum* atrapada en k-carragenato. Este aditivo es importante en la elaboración de zumos de frutas, refrescos, mermeladas y dulces. También, las enzimas inmovilizadas permiten la obtención industrial de edulcorantes alimentarios como el aspartame, fructooligosacáridos, diversos péptidos, etc.

Lactosa en la leche.

La lactosa, disacárido formado por glucosa y galactosa, es prácticamente el único carbohidrato presente en la leche y se encuentra en una concentración de 4.7 a 5.2% en el caso de la leche de vaca¹. En la siguiente tabla (tabla 4) se muestran los contenidos de lactosa de algunas especies²⁵.

Tabla 4: Contenido de lactosa en la leche de diferentes especies de mamíferos²⁵.

Especie productora	Concentración (%)
Humana	6.5
Equidos	
Yegua	5.9
Burra	6.2
Rumiantes	
Vaca	4.7
Cabra	4.7
Oveja	4.5
Búfala	4.7
Reno	2.5
Súidos	
Cerda	5.4
Carnívoros y roedores	
Gata	5.0
Perra	3.0
Coneja	1.8
Cetáceos	
Marsopa	1.3
Ballena	0.8

La síntesis de lactosa en la glándula mamaria se lleva a cabo cuando una molécula de glucosa se transforma en galactosa, la cual se une con otra molécula de glucosa formando así la lactosa.

Aproximadamente el 50 % de la glucosa que penetra la glándula mamaria se utiliza en la formación de lactosa, mientras que el resto se utiliza en la formación de energía. La enzima que cataliza la última etapa de la formación de lactosa es la lactosa sintetasa, que está formada por dos subunidades, una de las cuales es la α -lactoalbúmina, que es una proteína normal en la leche. La formación de lactosa tiene lugar aparentemente en el aparato de Golgi; la α -lactoalbúmina se sintetiza en los ribosomas y se mueve a través del retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi, donde está presente la segunda subunidad (galactosiltransferasa). Se considera que la lactosa es liberada de la célula junto con las partículas de proteínas a través de las vacuolas²⁶.

La lactosa contenida en la leche es el principal componente responsable de la presión osmótica de la leche, aunque los iones cloro, sodio y potasio también juegan un papel importante. El agua pasa al lumen del alveolo por ósmosis hasta que la presión osmótica de la leche es similar a la del plasma²⁶.

Lactasa.

Algunos organismos productores de lactasa son: todos los mamíferos (intestinal, principalmente las células con borde de cepillo del duodeno), hongos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*), bacterias (*E. coli*, *Streptococcus thermophilus*) y levaduras (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*).

En general las lactasas se dividen en lactasas ácidas (de hongos) y lactasas neutras (de levaduras y bacterias), que tienen diferentes condiciones óptimas de reacción, como se muestra en la tabla 5¹.

Tabla 5: Origen, pH y temperatura optimos para diferentes lactasas¹.

Origen	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
<i>Aspergillus niger</i>	3.0-4.0	55-60
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.0	50-55
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6.5-7.3	35
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6.6	37
<i>Candida kefir</i>	6.2	45-47
<i>Escherichia coli</i>	7.0	37
<i>Streptococcus thermophilus</i>	7.1	55

La lactasa (β -D-galactosidasa E. C. 3.2.1.23) es la enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa a glucosa y galactosa. La lactosa pese a sus propiedades nutrimentales también acarrea problemas a los productos que la contienen, debido a su poca solubilidad, poco poder edulcorante, formación de cristales muy duros de lactosa y sobretodo los problemas de intolerancia². Industrialmente, la lactosa también presenta problemas; en este caso, en la elaboración de productos lácteos como arequipe, manjar blanco y leche condensada, pues tiende a formar arenosidades y cristales²⁷. Los mamíferos producen la lactasa en el intestino delgado, principalmente en el yeyuno, donde la lactosa se hidroliza resultando la absorción de glucosa y galactosa. Si las células de esta parte del intestino no producen la lactasa se presentan los problemas de intolerancia a la lactosa. Existen dos tipos de deficiencia de lactasa, la primaria y la secundaria. La deficiencia secundaria se da cuando la incapacidad de producir lactasa se debe a causas no hereditarias. Esto es alguna patología temporal, como diarrea y desnutrición. La deficiencia primaria se debe a que la

actividad lactásica se va perdiendo con la madurez dependiendo de la raza debido a causas de evolución y herencia.

La intolerancia a la lactosa se presenta cuando la lactosa no se hidroliza en el yeyuno y llega al colon donde su fermentación bacteriana produce grandes cantidades de CO₂, H₂, CH₄, otros gases, ácidos orgánicos irritantes, cristalización de lactosa por altas concentraciones y por ende extracción de agua del cuerpo (diarrea), ello ocasiona problemas digestivos dolorosos que pueden incluso (en casos extremos) provocar la muerte por deshidratación^{22, 28}.

La actividad lactásica es alta al nacer, declina a valores bajos en la infancia y permanece así durante la madurez. Si la actividad lactásica residual no es suficiente, entonces se presentan los problemas de intolerancia por deficiencia primaria como se mencionaba²⁹. La mayor parte de los europeos, y sus descendientes norteamericanos retienen su actividad de lactasa en la edad adulta. La incidencia de intolerantes a la lactosa en europeos del norte y occidente es del 15%, sin embargo en negros, indios americanos, orientales y mediterráneos es del 70 al 100%²⁹.

Debido principalmente a los problemas de salud ya mencionados, y a la existencia de dicho sector intolerante a la lactosa que puede ser explotado económicamente, el desarrollo de técnicas para deslactosar leche y sus derivados fueron estudiadas e industrializadas. Hay dos formas de deslactosar con β -galactosidasas. El uso de la enzima soluble en procesos por lote y el uso de enzima inmovilizada que se usa en procesos continuos³⁰. Debido a que el pH de la leche y el suero dulce es prácticamente neutro, las lactasas utilizadas normalmente son de levadura.

El proceso de la hidrólisis de la enzima libre consiste en agregar lactasa de levadura a la leche previamente pasteurizada. La leche se deja incubar con la enzima de 4 a 6°C durante aproximadamente 8 horas o bien a 35°C de 2 a 3 horas pero con mayor cantidad de enzima. Después de la incubación la leche puede o no ser pasteurizada para detener la reacción de la enzima antes de envasar²². Es importante no tener actividad proteolítica debido a que el tiempo de incubación es el suficiente para coagular la leche¹.

La empresa Tetra-Pack desarrolló un proceso en que la enzima es agregada en el momento de envasar, previamente filtrada para evitar contaminación, permitiendo así un tiempo de residencia mayor, tiempos de hidrólisis más largos y el uso de menos enzima, ya que la hidrólisis se realiza en el envase y se dejan en una especie de cuarentena antes de salir al mercado. Se estima que la hidrólisis se completa en un periodo de 7 a 10 días a temperatura ambiente y debe estar libre de actividad proteolítica²².

En cuanto al uso de la enzima inmovilizada solo hay un proceso aplicado en el mundo y se realiza en Italia, pese a los innumerables trabajos de inmovilización. Esto se debe principalmente a la contaminación microbiana del reactor y a la susceptibilidad de la lactasa a ser inmovilizada. Este proceso desarrollado por Pastore y col²³. Consiste en un reactor de columna empacado con fibras de triacetato de celulosa con β -galactosidasa de levadura inmovilizada por entrampamiento. Este sistema trabaja por lotes, con leche descremada estéril, a una temperatura de 7°C hasta lograr una hidrólisis del 70% de la lactosa. Después de cada operación se lava con una sal cuaternaria de amonio²³.

La hidrólisis de la lactosa lleva a varios beneficios y usos, además de evitar el problema de intolerancia a la lactosa. La mezcla de glucosa más galactosa se puede usar como un sustituto de jarabe de maíz, en bebidas fermentadas, y productos de confitería²⁷. Además, incrementa el poder edulcorante, debido a que la glucosa y la galactosa son más dulces que la lactosa, se evita la formación de cristales de lactosa en productos concentrados como son la cajeta o dulce de leche, y helados, el uso de leches deslactosadas ahorraría el gasto en azúcares para las leches evaporadas y concentradas. También permitiría producir bebidas y productos fermentados de manera más rápida, ya que la glucosa y la galactosa se asimilan más rápido que la lactosa por levaduras. Algunas otras ventajas son el favorecimiento de las reacciones de Maillard y caramelización en productos como la leche condensada, azucarada, evaporada, la leche quemada y el pan que mejoran las propiedades organolépticas.

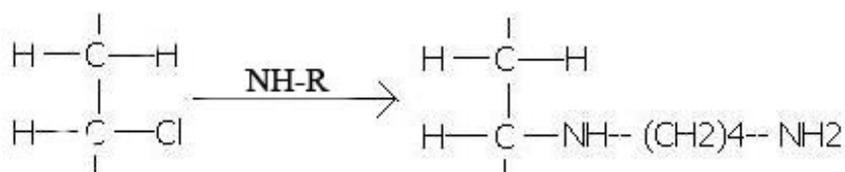
La importancia de este trabajo radica en la reutilización de la lactasa inmovilizada para la hidrólisis de lactosa en solución, utilizando como soporte PVC el cual está siendo utilizado hoy día como material de empaque en alimentos. Por ello se pueden realizar más estudios para sus aplicaciones prácticas en la industria alimenticia para la obtención de productos con alto valor agregado, como puede ser el suero de leche.

METODOLOGÍA:

Activación del polímero PVC (Cloruro de polivinilo) con alquildiaminas.

En un matraz balón de 100 mL se colocaron 300 mg de PVC en polvo, 2.4 g de 1,4-diaminobutano, 1.0 mL de trietilamina, 8 a 10 mL de metanol que se sometieron a reflujo por 3.5 horas. El producto obtenido fue lavado exhaustivamente con agua, metanol, HCl concentrado, metanol y agua, de acuerdo a la metodología de Ma. et al.³¹ con el fin de aminorar el PVC al desplazar un átomo de cloro con un NH-R como se muestra en la figura 6:

Figura 6: Aminación del PVC con 1,4-diaminobutano según Ma et al³¹



Para corroborar la aminación las muestras se analizaron por infrarrojo en la USAI (Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación) de la Facultad de Química de la UNAM, como control se analizaron muestras sin aminorar y con tratamiento térmico (PVC + metanol sometidos durante 3.5 horas a reflujo). El pico de absorción característico de los grupos $-\text{NH}_2$ en espectroscopia infrarroja ocurre alrededor de 3430cm^{-1} con el método de pastilla de bromuro de potasio.

Una vez analizado el polímero y comprobada la existencia de grupos amino se montó una técnica para la cuantificación de grupos amino con el reactivo de ninhidrina³² de la siguiente manera: en 2 mL

de buffer de fosfatos pH 7.2 se agregaron 20 mg de PVC aminado y 0.25 mL del reactivo de Ninhidrina. Se dejó ebulir por 20 minutos y se midió absorbancia a 570 nm comparándose con un blanco de PVC sin aminorar y cuantificando con equivalentes de glicina a partir de una curva patrón de glicina previamente elaborada. Como se mencionó en los antecedentes es importante cuidar el pH, tiempo y temperatura de reacción ya que el color puede variar en función de estos factores.

Inmovilización de la proteína BSA (Albúmina Sérica Bovina)

Con el fin de probar si el PVC-NH₂ era capaz de reaccionar con glutaraldehído³³ y éste a su vez con una proteína estándar para lograr su inmovilización por el método covalente, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de prueba. Para ello se mezclaron 50 mg de PVC-NH₂, 3.6 mL buffer de fosfatos pH 7.2, 0.2 mL de glutaraldehído, 5 mL de solución de BSA (1 mg/mL) y se dejaron en agitación constante toda la noche a 6 °C.

Se empleó el método de Lowry modificado³⁴ para determinar proteína, comparándose la concentración de proteína en la solución después de la inmovilización con un blanco de PVC sin aminorar. La diferencia de las concentraciones en la solución se calculó como proteína inmovilizada covalentemente.

Inmovilización de lactasa comercial marca LACTOZYM®

Una vez verificada la inmovilización de BSA se inmovilizó la enzima comercial lactasa marca LACTOZYM® (cortesía de Novozymes-México). Para obtener más información de las alternativas de

inmovilización covalente se comparó cualitativamente la inmovilización en uno y dos pasos, con y sin sitio activo protegido. Así la inmovilización en un paso se realizó como sigue: En un matraz erlenmeyer de 100 mL se agregaron 100 mg de PVC aminado, 0.1 mL de glutaraldehído 2.5% m/v, 0.5 mL de LACTOZYM[®] y buffer de fosfatos pH 7.2 (20 mM MgCl₂) hasta un volumen final de 10 mL. Se colocó a 6 °C de temperatura con una agitación de 90 rpm y se dejó durante toda la noche. En el caso de la enzima inmovilizada con el sitio activo protegido se agregó lactosa previamente a la inmovilización. La inmovilización en dos pasos se efectuó de la siguiente manera: En un matraz erlenmeyer de 150 mL se agregaron 400 mg de PVC aminado, 1 mL de glutaraldehído 2.5 % m/v y 24 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 con una agitación de 100 rpm a 25 °C durante dos horas y se lavó el polímero con buffer. Se tomó una muestra de 100 mg de PVC activado y se le agregó 0.5 mL de enzima y 9.5 mL de buffer pH 7.2 a 6°C de temperatura con una agitación de 90 rpm y se dejó durante toda la noche. En el caso de la enzima inmovilizada con el sitio activo protegido se agregó lactosa al 1% en el buffer.

A fin de comprobar que el polímero derivatizado tenía enzima activa, se incubó con una solución de lactosa observando en una cromatoplaaca la glucosa y la galactosa obtenidas. De esta manera se colocaron 100 mg del complejo PVC-Lactasa en 10 mL de buffer pH 7.2 y 100 mM de lactosa a 37 °C durante dos horas. Se tomó muestra y se aplicó en una cromatoplaaca eluyendo con CH₂Cl₂:metanol: Ac. Acético 10% 75:23:2.

Hidrólisis de lactosa con la enzima libre y el complejo PVC-Lactasa.

Para tener una representación gráfica del comportamiento cinético de la enzima libre así como conocer su estabilidad térmica se preparó una dilución 1:100 de la enzima libre con 25 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM (20 mM $MgCl_2$) y se incubó a 50°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se enfrió el matraz con agua corriente hasta temperatura ambiente y se llevó por último a una temperatura de 37 °C junto con otro matraz con las mismas características y contenido pero sin recibir un tratamiento térmico previo. Cuando los dos matraces alcanzaron los 37 °C se les agregaron 25 mL de una solución de lactosa 60 mM en buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM (20 mM $MgCl_2$) tomándose este como tiempo cero y monitoreando la cinética de la reacción durante tres horas.

Una vez obtenida la cinética de la enzima libre fue necesario tener un comparativo con el nuevo biocatalizador inmovilizado. De esta forma, en un matraz erlenmeyer con rosca se agregaron 20 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM (20 mM de $MgCl_2$), 30mM de lactosa y se incubó a 37 °C y 100 rpm. Una vez alcanzada esta temperatura se agregaron 300 mg de PVC tomándose una alícuota cada 5 minutos durante la primera media hora y a los 45, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos. La reacción fue detenida mediante calentamiento por ebullición 5 minutos. Se graficó la formación de glucosa obtenida en función del tiempo.

Finalmente, una vez demostrado que la enzima estaba inmovilizada y activa, se demostró que el nuevo biocatalizador es reutilizable al igual que capaz de soportar un tratamiento térmico. Para

este fin se reutilizó el PVC del experimento anterior después de un extenso lavado en buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM (20 mM MgCl₂) incubándose en las mismas condiciones de trabajo (20 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM (20 mM de MgCl₂), 30 mM de lactosa, temperatura de 37 °C y una agitación de 100 rpm). De igual forma, en otro matraz se utilizó PVC nuevo con un tratamiento térmico de 50 °C durante 10 minutos tomándose alícuotas a los 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos.

Obtención de los parámetros cinéticos.

Debido a que el comportamiento de la reacción de hidrólisis de lactosa es prácticamente lineal en las primeras dos horas, se seleccionaron 4 concentraciones diferentes de lactosa inicial (20, 30, 40 y 50 mM) y se llevó la reacción a 37 °C con 100mg de PVC-lactasa durante 90 minutos. Transcurrido ese tiempo se calculó la cantidad de glucosa formada por minuto. Con el método grafico "Direct Linear Plot"⁹ se obtuvieron los parámetros cinéticos Km y Vmax del complejo PVC-lactasa.

Actividades hidrolíticas de la enzima libre e inmovilizada.

Para conocer las actividades hidrolíticas de la enzima libre así como del biocatalizador de PVC, se colocaron 100 µL del concentrado Lactozym[®] en 20 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM (20 mM MgCl₂) y 5% de lactosa incubándose durante 15 minutos a 37 °C y 100 rpm. Por otra parte se colocaron 100mg de PVC-lactasa con 10 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM (20 mM MgCl₂) y 5% de lactosa incubándose 30 minutos a 37 °C 100 rpm. La razón por la cual los tiempos son

distintos es que en el caso del PVC-Lactasa puede haber problemas de difusión. Sin embargo para ambos casos se tomó un tiempo en el cual la reacción todavía es de pseudo-primer orden.

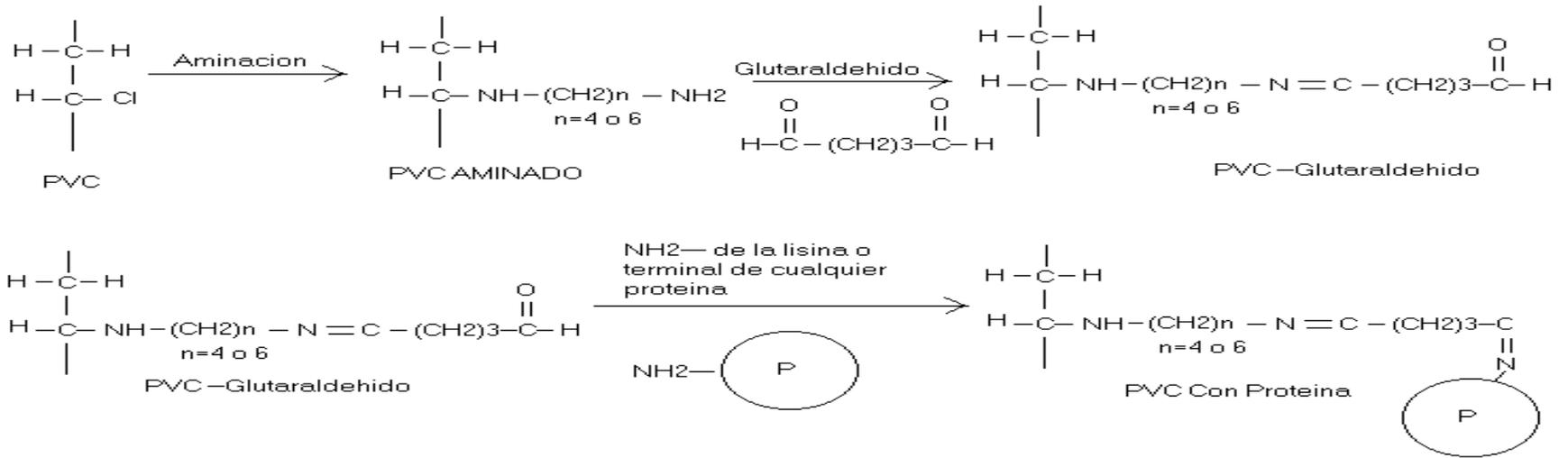
RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 7 se muestran las reacciones de derivatización del polímero hasta la inmovilización de la enzima con el fin de esquematizar los pasos seguidos químicamente para formar el nuevo biocatalizador. Las reacciones se pueden separar en dos reacciones: primero la activación del polímero al aminorarlo con 1,4-Diaminobutano ($n=4$) y después la inmovilización de la proteína P con ayuda del glutaraldehído

Para la reacción de aminación de la primera etapa los espectros de infrarrojo se muestran en la figura 8. Claramente alrededor de 3430cm^{-1} se incrementa la absorción del PVC NH_2 debido a la presencia de grupos $-\text{NH}_2$, lo que pone de manifiesto la activación del PVC con grupos $-\text{NH}_2$ del 1,4-diaminobutano según Ma. *et al*¹⁵.

La cantidad de grupos amino en el PVC- NH_2 medida por el método de ninhidrina fue de 0.160 microgramos de glicina por miligramo de polímero. Para la reacción de la segunda etapa se obtuvieron 9.82 mg de ASB inmovilizada por gramo de PVC- NH_2 .

Figura 7: Diagrama de las reacciones químicas del PVC para inmovilizar una proteína.



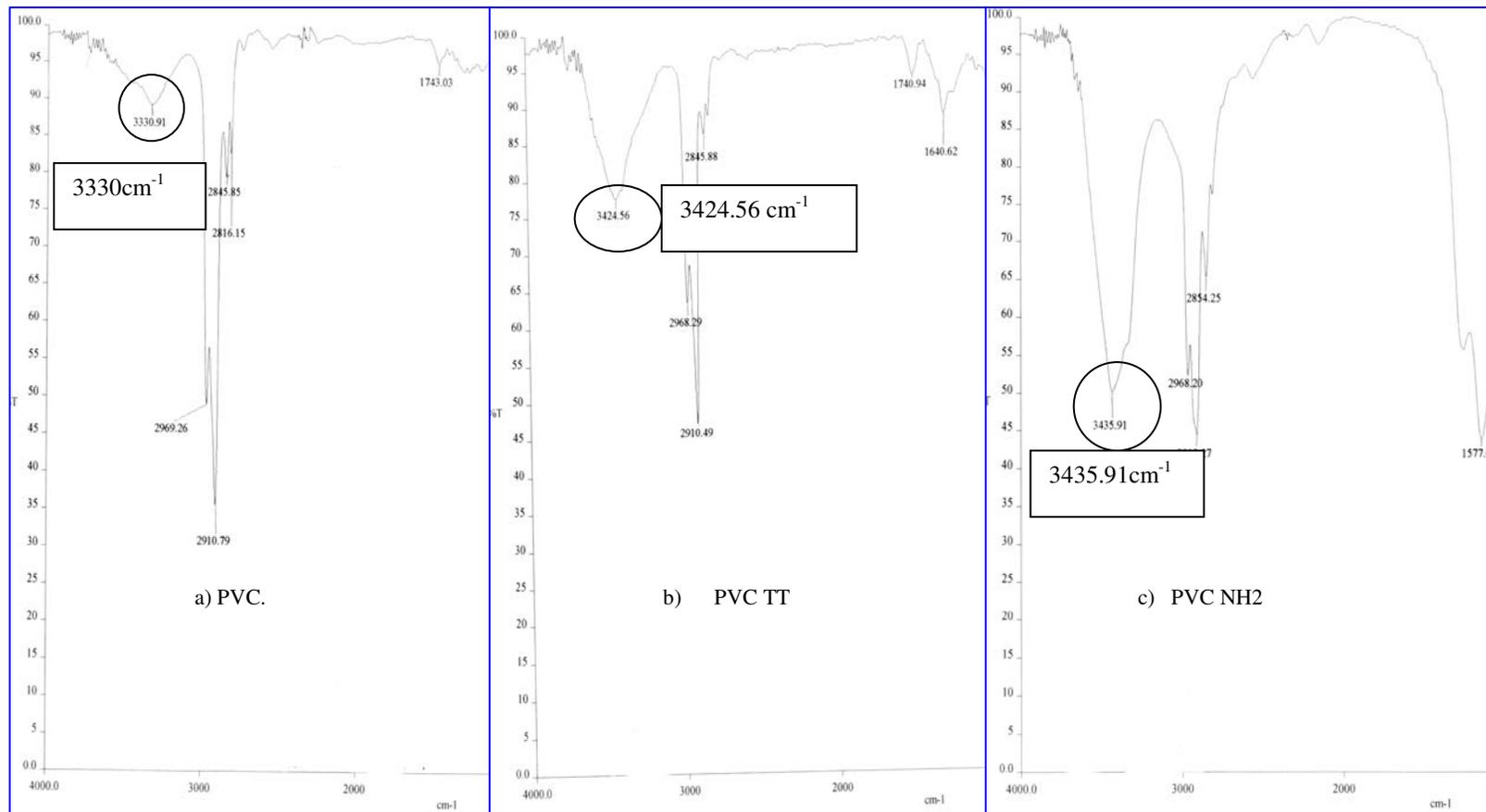


Figura 8: Espectros de infrarrojo de a) PVC, b) PVC con tratamiento térmico y c) PVC aminado. El incremento del pico de absorción a 3430cm⁻¹ refleja la obtención del PVC NH2.

Formación de glucosa en función del tiempo con la enzima libre.

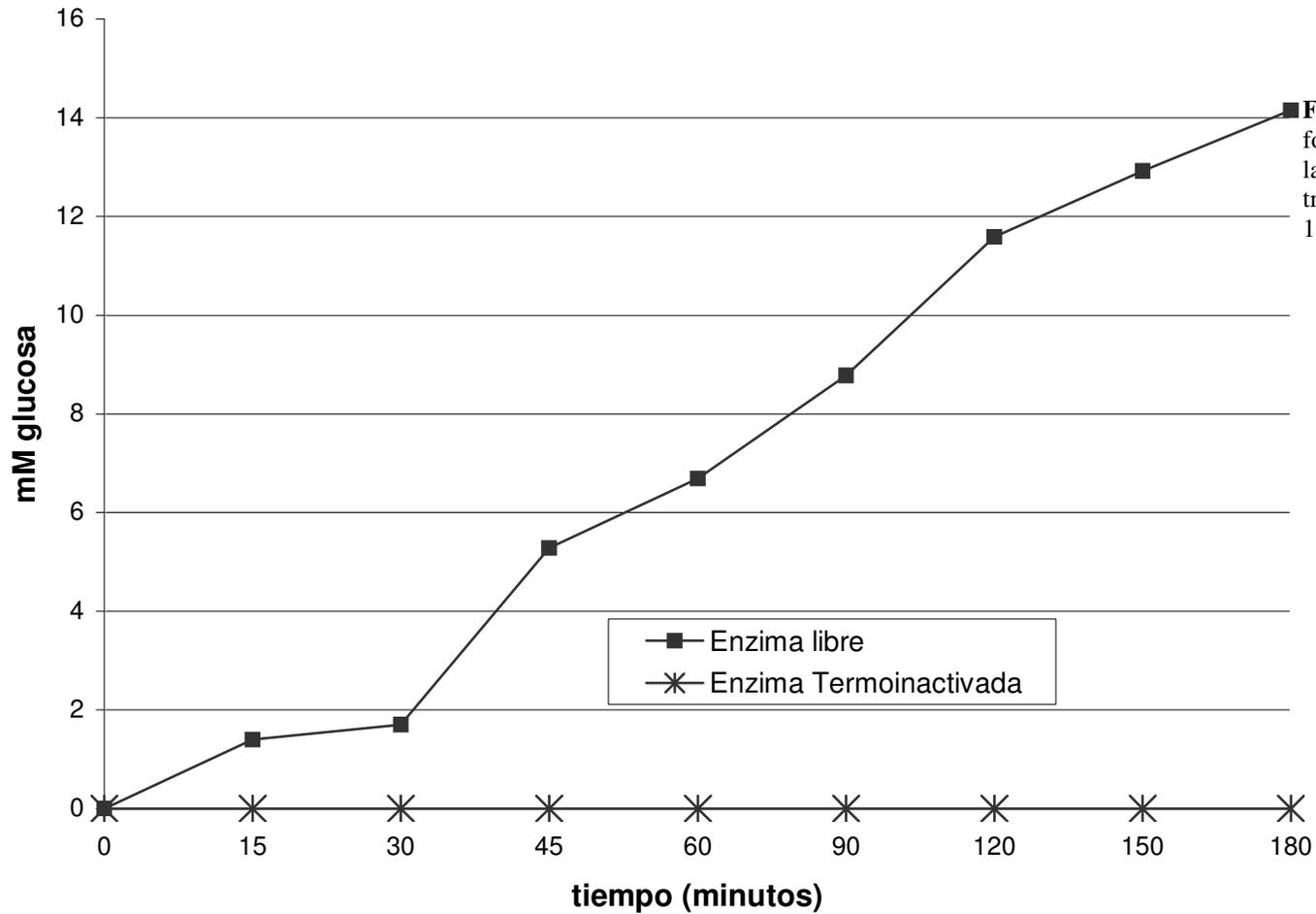


Figura 10: Cinética de formación de glucosa con la enzima libre con y sin tratamiento térmico (50°C 10 min).

Evaluación del biocatalizador PVC-ENZIMA

Se incubaron 300 mg de PVC-ENZ a 37°C con 30 mM de lactosa, seguido de un lavado y posterior reutilización. Un segundo lote de 300 mg de PVC tratado térmicamente a 50 °C durante 10 minutos fue sujeto a la misma condición. Las cinéticas de reacción de estos soportes se muestran en la figura 11. Podemos observar que la enzima conserva un 61 % de su actividad relativa, lo cual demuestra que incluso en el caso de enzimas muy sensibles térmicamente, la inmovilización les otorga una buena termoestabilidad. Por otro lado en el caso de la reutilización observamos una pérdida del 20 % de su actividad inicial, lo cual demuestra que el polímero es reutilizable con actividad lactásica, si bien disminuida. En general observamos que a las 3 horas de reacción el PVC-E de primer uso alcanza el 80% de la hidrólisis de la lactosa, mientras que el reutilizado y termo inactivado 63 y 49% respectivamente.

Cinetica de hidrólisis de lactosa con PVC-ENZ

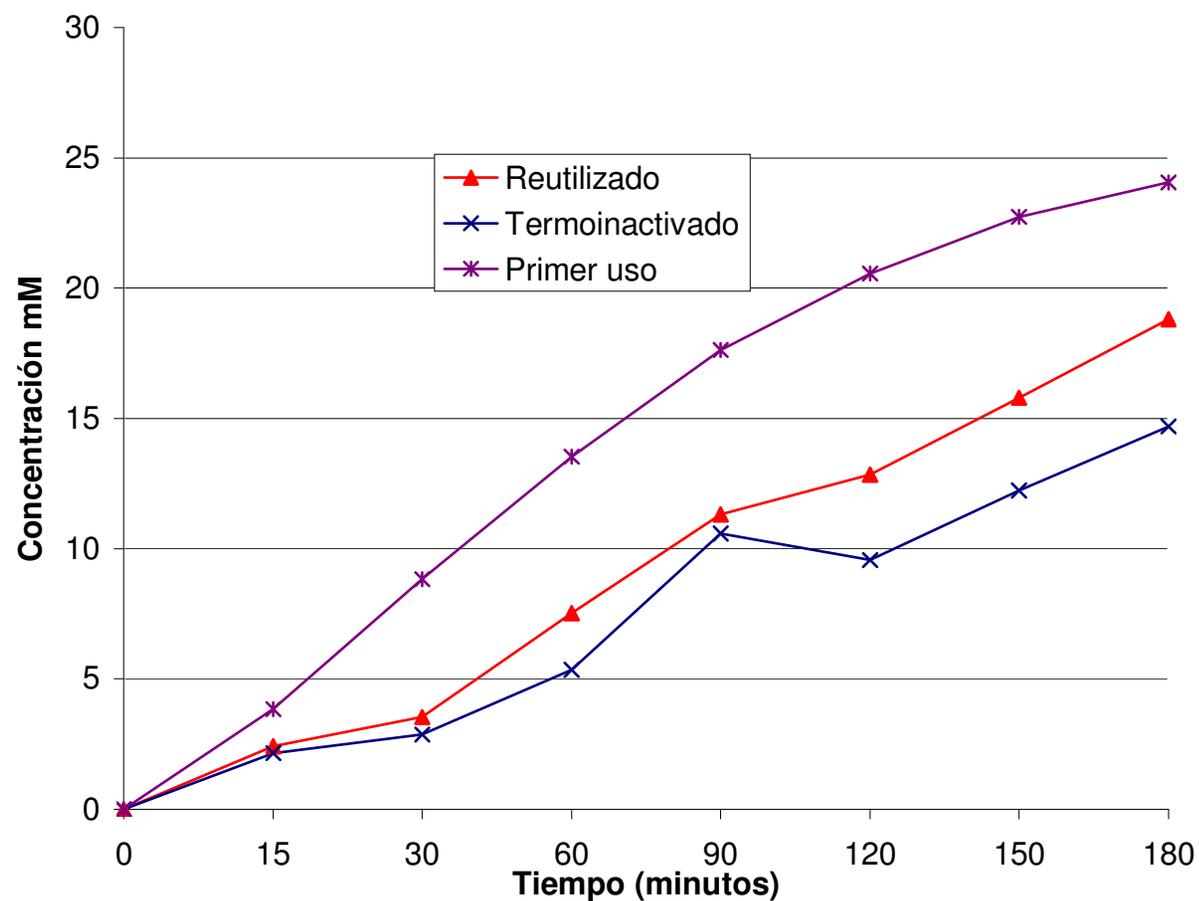


Figura 11. $S_0 = 30$ mM de lactosa; 300 mg PVC, 37 °C pH 7.2 50 mM fosfatos 10 mM cloruro de magnesio.

Parámetros cinéticos:

Como se mencionó en la metodología, se incubaron 300 mg de PVC-E con diferentes cantidades iniciales de lactosa (20, 30, 40 y 50 mM) durante 90 minutos a 37 °C determinándose la velocidad inicial de formación de glucosa, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 6: Velocidades iniciales de formación de glucosa en función de la concentración inicial de lactosa.

Condiciones: t=90 min, 300mg, PVC T=37°C	
Lactosa inicial mM	Vo mM/min
20	0.104
30	0.196
40	0.221
50	0.243

Con estos datos se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} con el método de "Direct Linear Plot⁹", obteniéndose valores de $K_m = 33$ mM y una $V_{max} = 0.39$ mM/min según el modelo de Michaelis Menten. Cabe mencionar que la figura 12 presentada es una adaptación en computadora de los datos. También puede observarse que para una concentración inicial de lactosa de 20mM no existe una convergencia con los demás puntos. Es posible que las cargas del PVC-E (negativas por el cloro) produzcan una partición de la lactosa que disminuye su concentración efectiva ante el catalizador.

El biocatalizador así preparado presenta una actividad de 37 μmol Glucosa/min g PVC (3770 μmol /min g proteína) mientras que la enzima libre muestra 21700 μmol /min g proteína. Por lo tanto tenemos un recobro del 17.37 % de la actividad teórica por gramo de proteína.

DIRECT LINEAR PLOT

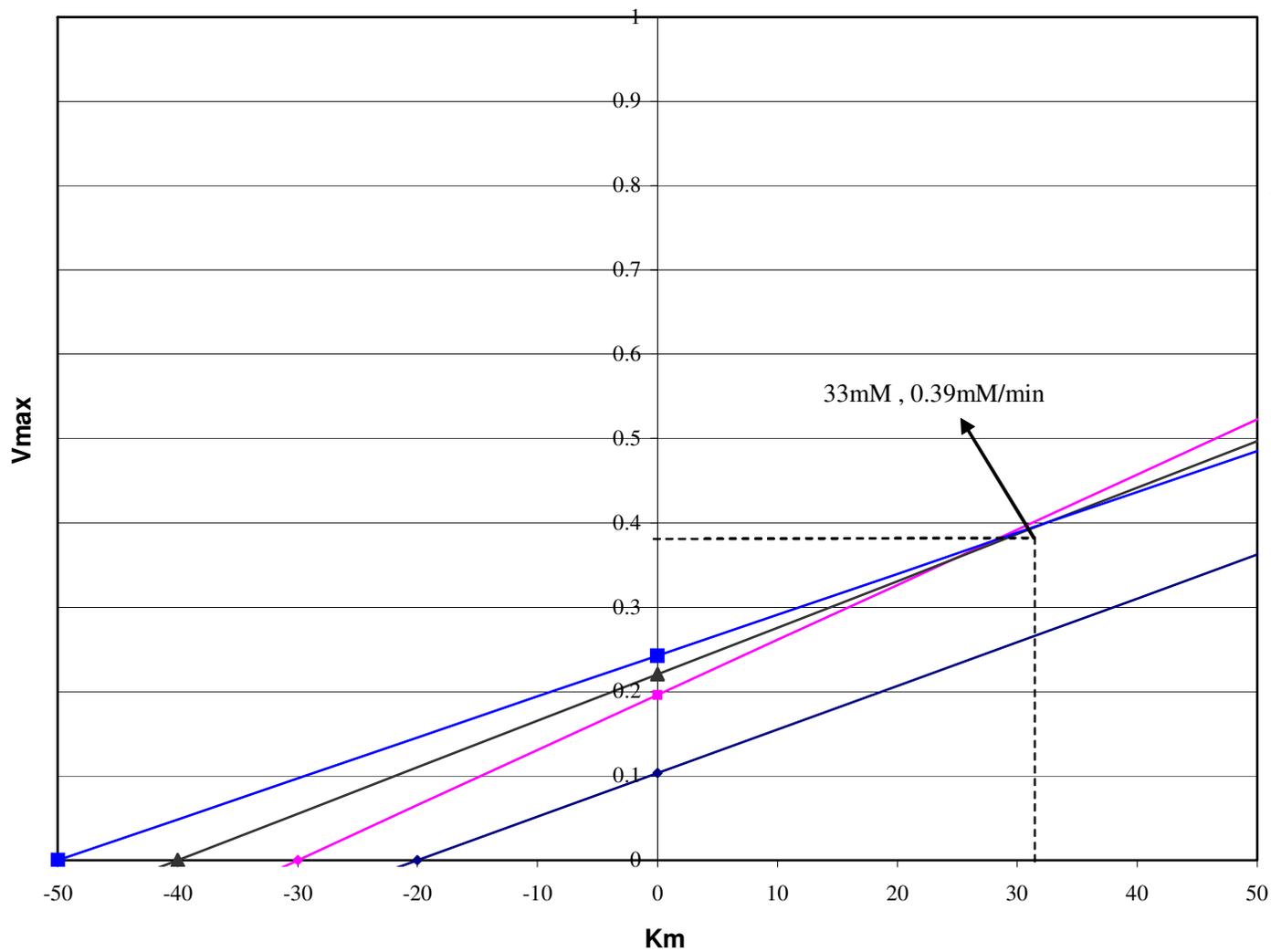


Figura 12: Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} con el método de "Direct Linear Plot", obteniéndose valores de 33 mM y 0.39 mM/min respectivamente.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un PVC aminado con alquildiaminas³¹, comprobándose por el incremento en los picos de absorción del PVC en el área de los grupos amino a 3430cm^{-1} y cuantificándose con ayuda de la ninhidrina³². Este polímero activado sirvió como soporte para la inmovilización de dos proteínas, una de ellas albúmina sérica bovina y la otra una lactasa comercial de la marca Lactozym[®]. Este nuevo biocatalizador presentó una actividad enzimática de $37\ \mu\text{mol Glucosa}/\text{min g PVC}$ ($3770\ \mu\text{mol}/\text{min g proteína}$) con un recobro del 17.37 % de la actividad teórica, además de una $K_m = 33\ \text{mM}$ y una $V_{\text{max}} = 0.39\ \text{mM}/\text{min}$ según el modelo de Michaelis Menten determinados con el método de "Direct Linear Plot"⁹. Este biocatalizador es reutilizable y capaz de soportar un tratamiento térmico de $50\ ^\circ\text{C}$ por 10 minutos perdiendo solo 40% de su actividad inicial a diferencia de la enzima libre que pierde toda su actividad en esas condiciones.

Este nuevo biocatalizador puede ser usado en la hidrólisis de lactosa en suero de leche para obtener un jarabe con fines de uso edulcorante. También este jarabe puede aplicarse en panadería en la superficie del pan antes de ser horneado para así favorecer reacciones de Maillard y dar mejor color en la superficie del pan. Por otro lado este biocatalizador puede utilizarse en leche con el fin de producir leche deslactosada para consumo de la gente con la patología conocida como intolerancia a la lactosa. Esta leche puede usarse, además, para producción de cajeta y helados sin tener el riesgo de presentar una sensación arenosa por la cristalización de lactosa. Puede acoplarse a una membrana de PVC para fabricar un biosensor de lactosa con el fin de monitorear la lactosa en una línea de proceso de deslactosado y si se acopla a los aparatos y computadoras necesarios pueden obtenerse

gráficas de control de la concentración de lactosa durante todo el proceso de deslactosado. También puede utilizarse en reacciones de alcoholólisis y síntesis de biosurfactantes en medios no convencionales por la estabilidad de la enzima al ser soportada en PVC.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) García-Garibay. M, Usos de beta-galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. Rev. Invest. Clin. 48:51-61, 1996
- 2) <http://www.unmsm.edu.pe/biologia/investigacion/c6dir202.htm>
- 3) M. Ladero, Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* . Enzyme and Microbial Technology 27:583-592, 2000
- 4) Willis, W. V. En Laboratory experiments in liquid chromatography. CRC, Estados Unidos, sección 3.3 pág.3-15 a la 3-24, 1991.
- 5) Horton, H. Robert. Moran, Laurence A. Ochs, Raymond S. Rawn J. David. Scrimgeour, K. Gary. Bioquímica. Prentice Hall. México, cap. 5, 1995.
- 6) Lineweaver, H. Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56:658-666. 1934.
- 7) Eadie, G. S. The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. J. Biol. Chem. 146: 85-93. 1942.
- 8) Hanes, C. S. CLXVII. STUDIES ON PLANT AMYLASES. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. Biochem J. 26: 1406-1421. 1932.
- 9) Eisenthal, Robert. Cornish-Bowden, Athel. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. Biochem J. 139:715-720, 1974.
- 10) Peter, J. Prenosil, J. E. Bourne, J. R. Comparison of various methods to determinate kinetic constants for beta-galactosidase in soluble and immobilized states. J. Chem. Tech. Biotechnol. 31: 705-709, 1981.
- 11) Hartmeier, W. Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. Trends Biotechnol. 3: 149-153, 1985.
- 12) Martinek, K. Mozhaev, V. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. Adv. Enzymol. 57: 179-249, 1987.

- 13) Arrollo, M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars. Pharmaceutica* 39(2): 23-39, 1998.
- 14) Wong, S. Wong, L. Chemical cross-linking for the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874, 1992.
- 15) Klibanov, A. immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* 219: 722-727, 1983.
- 16) Goldstein, L. Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. *Methods Enzymol.* 44: 397-443, 1976.
- 17) Hornby, W. E. lilley, M. D. Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water insoluble derivates of cellulose. *Biochem J.* 107:669-674, 1968.
- 18) Working Party on Immobilized Biocatalysts. Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* 5: 304-307, 1983.
- 19) Griffiths, D. Hall, G. Biosensors: what real progress is being made? *Trends Biotechnol.* 11: 122-130, 1993.
- 20) Walcerz. Izabela, Koncki. Robert. Enzyme biosensors for urea determination based on an ionophore free ph membrane electrode. *Analytica Chimica Acta* 315:289-296, 1995.
- 21) Koncki. Robert, Leszczynska. Ewa. Penicillin enzyme biosensors based on ph membrane electrodes. *Analytica Chimica Acta* 321:27-34, 1996.
- 22) García-Garibay. M, Quintero. R, López-Munguía, A. En *Biotecnología Alimentaría*. LIMUSA 1ª edición, México,1993. pág. 153-224
- 23) Pastore, M. Reduction of lactose of milk by entrapped β -galactosidase. II. conditions for an industrial continuous process. *Journal of Dairy Science* 57(3): 269-272, 1974
- 24) Katchalski-Katzir, E. Immobilized enzymes: learning from past success and failures. *Trends Biotechnol.* 11: 471-478, 1993.
- 25) Alais, Charles. *Ciencia de la leche*. CECSA. 1ª edición. México 2001

- 26) Mendoza Martínez, Germán David. Ricalde Velasco, Raul. Procesos de producción de leche. UAM. Unidad Xochimilco. México 1994
- 27) <http://www.caracol.com.co/ciencia.asp?t=22> 11:04 7-15-2002
- 28) Voet, D. Bioquímica.. Ed. Omega. Barcelona, España, pág. 274, 1992.
- 29) Ganong, W. F. Fisiología Medica. Manual moderno. 16a edición en español, México, D.F., pág. 524-525, 1998.
- 30) Szczodrak, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Molecular Catalysis 10: 631-637, 2000.
- 31) Ma, S. C. Chaniotakis, N. A. Meyerhoff, M. E. Response properties of ion-selective polymeric membrane electrodes prepared with an aminated and carboxilated poly(vinylchloride). Anal. Chem. 60: 2293-2299, 1988.
- 32) Abdellatef, Hisham E. Khalil, Hawa M. Colorimetric determination of gabapentin in pharmaceutical formulation. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 31:209-214, 2003.
- 33) Quinn, Z.Q. Xiao Dong Chen. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. Journal of food engineering 48: 69-74, 2001
- 34) Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et. al. which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83:346, 1977.