

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

28



**INMOVILIZACION DE GLUCOSA ISOMERASA Y SU
UTILIZACION EN LA CONVERSION CONTINUA DE
D-GLUCOSA A D- FRUCTOSA.**



**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA**

AMERICA GILBON ACEVEDO

1 9 7 8



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CLAS TESIS 1978
AÑO M. C. 1978 1978
• REGHA _____
• REC _____



A mis padres a quienes
les debo todo.

Con cariño a mis abuelitos
tías, hermanos, cuñados y
sobrinos.

Con gran afecto y respeto al
Dr. Carlos Huitrón V. a quien
agradezco profundamente su -
guía, apoyo y confianza que -
siempre me ha brindado.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE:	M. en C. Natalia Salcedo O.
VOCAL:	Dr. Alfredo Echegaray A.
SECRETARIO:	Dr. Carlos Huitrón V.
1er. SUPLENTE:	I.Q. Emilio Barragán
2do. SUPLENTE:	Q.B.P. Jorge Soto Soria

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

SUSTENTANTE:

AMERICA GILBON ACEVEDO

ASESOR DEL TEMA:

CARLOS HUITRON VARGAS

C O N T E N I D O

GENERALIDADES

Naturaleza y Propiedades de enzimas.

Importancia y caracterfstica de las enzimas inmovilizadas.

Importancia práctica de la enzima Glucosa Isomerasa.

MATERIALES Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

BIBLIOGRAFIA

G E N E R A L I D A D E S

sar de la gran diversidad de composición, estructura y función de las enzimas, comparten características semejantes por lo que se pueden estudiar por métodos similares; tal es el caso de los principios cinéticos que ellas obedecen.

La región activa de las enzimas no se encuentran distribuida por toda la molécula, sino que se encuentra localizada en áreas pequeñas específicas de la enzima. Este sitio activo, que posee dimensiones limitadas, contiene grupos funcionales específicos que pueden unirse al sustrato y llevar a cabo el evento catalítico. Los grupos funcionales esenciales en las enzimas se encuentran separados unos de otros en las cadenas polipeptídicas, pero éstas al enrollarse, permiten reunirse y formar el sitio activo. A pesar de las dimensiones limitadas de éste, la actividad enzimática depende en forma general de una conformación tridimensional de la molécula (Dickerson, 1969).

Cuando la enzima se une al sustrato, sufre cambios en su conformación tridimensional provocando la orientación de grupos catalíticos y las uniones necesarias para llevar a cabo la reacción. Este cambio en la conformación también tiene una función, la de facilitar la liberación del producto de la reacción del sitio activo y así retornar a su estado inicial (Monod, 1965; Shaw, 1970; Koshland, 1973; Leinhardt, 1973).

Las enzimas generalmente funcionan en sistemas multienzimáticos, los cuales presentan una secuencia y control muy

precisos. En algunos casos el primer paso de la actividad de la vía es catalizado por una enzima alostérica o regulatoria, la actividad de esta enzima puede estimularse o inhibirse por la unión de un producto de la secuencia, en un sitio diferente al sitio activo. Las enzimas regulatorias poseen por lo general subunidades que pueden interaccionar una con otra. Algunas enzimas existen en forma múltiples, y se cree que esto es importante para la regulación de la actividad enzimática y en la diferenciación y desarrollo de las células, ésta posee mecanismos muy precisos para regular la síntesis de las proteínas que requiere en su metabolismo. Ciertas enzimas en células bacterianas cambian su concentración como respuesta a cambios en la disponibilidad de nutrientes en el medio. Se han reconocido dos tipos de respuesta llamados inducción y represión enzimática. En el caso de una enzima inducible, aumenta su síntesis dentro de la célula cuando su sustrato se encuentra presente en el medio de cultivo. En el segundo caso, si se acumula el producto final de una vía metabólica, se detiene la síntesis de las enzimas requeridas para elaborar dicho metabolito (Jacob and Monod, 1961: Monod et al., 1963; Ptshne, 1967).

En los últimos años, los descubrimientos sobre estructura y función de las enzimas han sido muy importantes para entender el papel que juegan estos catalizadores en los sistemas biológicos, y han abierto nuevas áreas a la investiga

ción en enzimología básica y aplicada.

Las enzimas no sólo son importantes desde un punto de vista biológico, sino también desde un punto de vista práctico. Debido a que son muy específicas y a que actúan en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, ofrecen ventajas para utilizarse en la producción de compuestos -- importantes para el hombre.

Aún sin tener un conocimiento detallado de las enzimas, la actividad enzimática ha sido utilizada en forma práctica por el hombre durante muchos siglos (Messing, 1975), para la fabricación de pan, bebidas fermentadas, quesos, pieles curtidas, etc. En todos estos procesos se han utilizado células y extractos que contenían a las enzimas, pero que --- apenas desde hace 50 años se ha intensificado su estudio -- (Lilly and Dunnill, 1969).

Las enzimas pueden ser aisladas a partir de una gran diversidad de fuentes, pero para aislar alguna enzima en -- particular deberá seleccionarse la fuente apropiada donde -- predomine ésta. Pueden obtenerse a partir de plantas, animales o microorganismos. El aislarlas de animales tiene el problema de que si se da una dieta especial para incrementar los niveles de dicha enzima, el costo de producción también se incrementa además del tiempo que tarda en producirse es -- muy largo. Además existe otro problema, el que la enzima só lo es un subproducto ya que el producto principal generalmen -- te es carne. En el caso de que se quiera obtener una enzima

purificados. En general, la actividad específica que presentan es muy baja y no se pueden recuperar fácilmente al final de la reacción (Pye, 1974), lo que no permite tener un control adecuado del proceso. En la Tabla A, pueden verse algunos ejemplos de enzimas utilizadas en la industria. La mayoría son enzimas hidrolíticas y extracelulares que provienen de diversas fuentes animales, vegetales y de microorganismos, y son utilizadas en forma soluble por lo que no pueden ser recuperadas. Estas enzimas constituyen menos del 1% de las enzimas descritas, por lo que la potencialidad de utilización de las enzimas en la industria es muy grande; pero la mayoría de éstas son enzimas que requieren la presencia de cofactores o son enzimas intracelulares y por lo tanto los procesos de producción, obtención y purificación son largos y costosos, lo que hace prohibitivo su uso a gran escala. Además las enzimas son muy inestables a cambios de pH y de temperatura y sólo pueden ser utilizadas una vez en un proceso, ya que como se utilizan en forma soluble es muy difícil recuperarlas en forma activa; por lo que para ampliar su uso en la industria deberán disminuirse los costos de producción, de obtención y de utilización así como incrementar su estabilidad. Una posibilidad de hacer económicamente factible la utilización de enzimas a gran escala ha sido por la inmovilización a una fase sólida de estos catalizadores biológicos, de tal forma que se tienen en forma in-

TABLA A

Enzimas utilizadas Industrialmente

Enzimas	Actividad	Usos.
-Amilasa	Hidroliza enlaces α (1-4) de almidón	Disminución de la viscosidad de fibras textiles; licuar almidón; producción de glucosa. ✓
Glucoamilasa	Remueve unidades de glucosa sucesivas de los extremos no reductores -- del almidón	Producción de glucosa; sa carificación de maltas de destilería y cervecería; para la elaboración de me dios de fermentación. ✓
Invertasa	Hidroliza enlaces β -D-Fructofuranosil de la sacarosa y de otros azúcares -- (Sacarosa \Rightarrow D-Glucosa + D-Fructosa)	Producción de dulces con centro suave. ✓
Enzimas pécticas	Se involucran muchas enzimas en esta actividad una de ellas hidroliza enla ces α -1-4 D-galacturonidos en poliga lacturonidos y otra de las actividades desmetila a la pectina dando como pro ductos metanol y ácido péctico.	Clarificación de jugos de frutas y vinos. ✓
Celulasas	Hidroliza enlaces β -1-4 glucosídicos de celulosa	Auxiliares de la digestión; reducción de la viscosidad de gomas vegetales.

Enzima	Actividad	Usos
Proteasas microbianas	Degrada proteínas, polipéptidos, y péptidos.	Aditivos para detergentes; manufactura de <u>par</u> o; suavizante de carne; auxiliar de la digestión
Bromelina (de la piña)	Hidroliza péptidos, amidas y ésteres.	Auxiliar de la digestión; en preparaciones <u>anti</u> inflamatorias; suavizante de carnes.
Pepsina (de fuente animal)	Hidroliza péptidos y tiene actividad sobre uniones cercanas a residuos -- aromáticos ó residuos dicarboxílicos de L-aminoácidos.	Auxiliar digestivo; alargar cuajo.
Papaina (de la planta de la papaya)	Hidroliza péptidos, amidas y ésteres, particularmente se involucra el enlace de aminoácidos básicos, leucina o glicina.	Suavizante de carne, clarificación de cerveza. ✓
Tripsina:	Hidroliza péptidos, amidas y ésteres en donde se involucra el grupo <u>carbo</u> xilo de L-arginina o L-lisina.	Auxiliar digestivo; suavizante de pieles.
Reninas: (animales y microbianas)	Hidrolizan péptidos; actúan sobre la <u>caseína</u> .	Para la fabricación de <u>quesos</u> . ✓

Enzima	Actividad	Usos
Lipasa	Hidrolizan grasas y ésteres de ácidos grasos.	Auxiliar digestivo; alterar sabores modificando las grasas de la leche.
Pancreatina	Su acción involucra muchas enzimas incluyendo amilasa, lipasas y <u>prancreato</u> peptidas E, la cual hidroliza <u>peptidos</u> , particularmente enlaces con aminoácidos neutrales.	Auxiliar digestivo.
Glucosa Oxidas?	Oxida glucosa a ácido glucónico en presencia de oxígeno.	Para remover el oxígeno de productos alimenticios; desazucarar huevos; análisis clínicos. ✓
Catalasa.	Cataliza la descomposición de $4H_2O_2 \rightarrow 4H_2O + 2O_2$	Para remover el peróxido - remanente utilizado para esterilización, especialmente en leche; usado con la glucosa oxidasa. ✓
Glucosa Isomerasa	Convierte aldosas en cetosas.	Producción de jarabes con alto contenido de <u>D-Fructosa</u> . ✓

soluble y pueden ser reutilizados.

La inmovilización se refiere a la modificación de una enzima así como restringir su gran movilidad y mantenerla en una región del espacio relativamente definida. Las técnicas para inmovilización de enzimas tuvieron sus inicios en la búsqueda de derivados protéicos insolubles en agua, principalmente para el estudio de inmunoproteínas. Durante el período entre 1940 y 1950, se alcanzó un éxito considerable en la unión de antígenos y anticuerpos a materiales insolubles en agua; y en base a esto, se extendió su uso hasta llegar a ser utilizado para unir enzimas a matrices sólidas.

Muchos de los primeros esfuerzos se iniciaron con la adsorción de enzimas a soportes sólidos, sin embargo, este intento no tuvo el éxito deseado debido principalmente a desorción de la enzima y en muchos otros a su desnaturalización. Micheel and Ewers (1949) fueron los primeros que tuvieron éxito al fijar covalentemente una enzima a un soporte sólido. Posteriormente siguieron apareciendo otros reportes de enzimas inmovilizadas por enlace covalente, aunque en forma dispersa, pero el mayor interés por este campo pareció provenir de los laboratorios de E. Katchalski - en Israel, G. Manecke en Alemania, Crook y otros en Inglaterra y posteriormente grupos en E.U.A., Suecia y Japón.

El desarrollo de métodos que conducen a una inmovilización duradera de enzima con una adecuada retención de su actividad catalítica, ha sido el primer factor para hacer

posible la especialidad de Ingeniería de enzimas. Con la enzima inmovilizada, lo que se tiene que recuperar es el soporte sólido, para obtener la enzima y reutilizarla, y así superar una de las desventajas desde el punto de vista económico para su utilización a gran escala. Además - las formas inmovilizadas de muchas enzimas parecen ser -- más estables a condiciones ambientales que las enzimas en solución. Este no siempre es el caso, pero una forma apropiada de inmovilización puede darle a una enzima intracelular que sea inestable, la suficiente estabilidad para que se utilizada en reactores bioquímicos.

En este trabajo no se pretende hacer una revisión exhaustiva acerca de las enzimas inmovilizadas, sino únicamente hacer una descripción de los métodos de inmovilización y analizar la importancia que tienen en la preparación de derivados insolubles. En la literatura existe -- una serie de revisiones sobre este tema realizadas por -- distintos autores como Manecke (1962), Silman and Katchalski (1966), Weliky and Weetall (1965), Mosbach (1971), -- Goldstein (1969), Zaborski (1973).

Existen una gran variedad de métodos de inmovilización de enzimas, pero en general pueden clasificarse en dos grandes grupos: Físicos y Químicos.

Los métodos físicos consisten en localizar a la enzima en cualquier forma, no depende de la formación de ningún enlace covalente sino que depende de ciertas fuerzas

físicas como las electrostáticas, formación de enlaces -- iónicos, interacción proteína-proteína, etc. Estos métodos físicos de inmovilización generalmente son reversibles y comprenden la adsorción de la enzima a un soporte insoluble en agua; el atrapamiento de la enzima en una matriz de un gel insoluble en agua; el atrapamiento de la enzima en microcápsulas semipermeables.

En los métodos químicos hay la formación de cuando menos un enlace covalente entre residuos de la enzima y un polímero que posea un grupo funcional, o entre dos o más moléculas de enzima, estos métodos son irreversibles por lo que no se puede recuperar la enzima ni reutilizar el soporte. Estos métodos incluyen el enlace covalente entre un soporte que contenga grupos funcionales y la enzima; la incorporación de la enzima dentro de una cadena de un polímero en formación; el entrecruzamiento intermolecular de la enzima por medio de un reactivo bifuncional de bajo peso molecular.

El método por adsorción para inmovilizar enzimas es uno de los más simples; para realizarlo únicamente hay que poner en contacto una solución acuosa de la enzima con el soporte y lavar el exceso de enzima que no haya sido adsorbida. Para un proceso de este tipo, se han utilizado resinas de intercambio iónico como son DEAE-Celulosa, DEAE-Sephadex, CM-Celulosa, así como derivados de otro tipo de radical como la fenoxi acetil celulosa, algodón, vidrio - - -

(Butler, 1975). Existen otros adsorbentes tanto orgánicos como inorgánicos como son celulosa, colágena, colodión, cerámica, zirconio, titanio, tierra de diatomeas (Baum and Lynn, 1975; Weetall, 1975). La adsorción de una enzima sobre un soporte insoluble en agua depende del pH del medio de inmovilización, la naturaleza del disolvente, de la fuerza iónica, de la concentración de proteína y de adsorbente así como de la temperatura. Es sumamente importante controlar bien todas estas variables para sí lograr una adsorción óptima y una retención máxima de la actividad.

Existen una gran cantidad de ejemplos reportados en la literatura de enzimas adsorbidas tanto en soportes orgánicos como inorgánicos como por ejemplo la catalasa unida a DEAE-Celulosa y CM-Celulosa, lactato deshidrogenasa en papel, (Kostner and Kreen, 1974); amilo glucosidasa en DEAE-Celulosa y DEAE-Sepharosa, (Solomon and Levin, 1974); amino acilasa en DEAE-Sephadex (Tosa et al, 1967), gluco amilasa en Halogenacetil celulosa (Maeda and Suzuki, 1972); lipoamida deshidrogenasa en matrices de N alquil Sepharosa (Visser and Strating, 1975), etc. Así también han sido inmovilizadas enzimas a soporte inorgánicos como la Glucosa Isomerasa, ureasa y papaína en titanio, proteasa alcalina en sílice (Messing, 1975); amilo glucosidasa en silicatos y alúmina (Solomon and Levin, 1975).

El método de atrapamiento consiste en ocluir a la en-

zima dentro del espacio intersticial de polímeros entrecru
zados insolubles en agua (Zaborski, 1973). Las enzimas --
pueden ocluirse dentro de geles de matrices entrecruzadas
llevándose a cabo la reacción de polimerización, permitien
do la formación de un gel en una solución acuosa que con-
tiene a la enzima. La inmovilización a una matriz involu-
cra métodos químicos de enlace covalente y entrecruzamien-
to así como métodos físicos de adsorción y atrapamiento y
sus diversas combinaciones. Los acarreadores más emplea--
dos con la celulosa o sus derivados o polímeros sintéti--
cos como nylon, colodión, poliacrilamida, etc. (Linko, 1976;
Weetall, 1975). Las moléculas de enzima se encuentran ff
sicamente atrapadas dentro de la estructura del polímero y
no pueden atravesar el gel, pero el sustrato si es de un -
peso molecular apropiado sí puede hacerlo llevándose a ca-
bo la reacción en forma contínua. Con este método de inmo
vilización no se pueden predecir cambios en las propieda--
des intrínsecas de la enzima, los efectos en el microambien
te creados por la naturaleza del acarreador como por ejem-
plo su carga, o los cambios producidos por la reacción en-
zimática misma, también pueden esperarse; para poder enten
der el efecto sobre la enzima hay que considerar un factor
muy importante como es la carga del soporte. La actividad
de la enzima inmovilizada depende en forma importante del
método de preparación. La actividad relativa de estos con
jugados generalmente es baja pero puede ir hasta 50 - 60 %

en el mejor de los casos, ya que durante el proceso de polimerización se puede perder actividad. Una desventaja -- importante de este método es que la enzima puede filtrarse de la malla y por lo tanto perder actividad el derivado in soluble.

5 MICROENCAPSULACION

Las enzimas también pueden ser inmovilizadas dentro de microcápsulas; la enzima se encuentra rodeada por una membrana semipermeable que puede ser permanente o no permanente. Las membranas permanentes se forman por la polimerización interfacial y por la formación de coacervados de polímeros preformados. Las membranas no permanentes se -- forman por la combinación de surfactantes apropiados, aditivos e hidrocarburos.

Las moléculas de enzima por ser mayores que el diámetro de poro de la membrana no pueden difundir a través de ella, pero el sustrato y el producto si son de bajo peso molecular sí pueden hacerlo, por lo que puede tenerse una reacción continua; así para tener resultados óptimos deberá tenerse una membrana tan permeable como sea posible para que permita la libre difusión del sustrato y del producto pero no de la enzima. Existen dos métodos generales para la formación de microcápsulas para inmovilizar enzimas, basados en la formación de coacervados y otro en la polimerización interfacial (Chang, 1964; Chang et al., 1966; -- Chang et al., 1967; Chang, 1967).

La formación de coacervados es el fenómeno de separación de fases en soluciones de polímeros, dependiendo la --

formación de la microcápsula de la baja solubilidad del po límero en la interfase de la microgota, se trata de un fenómeno físico; en cambio en el método de polimerización in terfacial está basado en un proceso químico, ya que está involucrada la síntesis de un copolímero insoluble en agua en la interfase de una microgota. Uno de los reactantes es parcialmente soluble en ambas fases, la acuosa y la orgánica y el otro de los reactivos es soluble solamente en la fase orgánica; el coeficiente de partición del reactante soluble en agua entre la fase acuosa y la orgánica determina las propiedades de la membrana producida. En la técnica de polimerización interfacial, la solución acuosa con tiene ambos componentes a la enzima y el polímero. En el proceso dependiente de la formación de un coacervado, el disolvente adicional contiene al polímero que forma la mem brana semipermeable. A la emulsión que se forma se agrega posteriormente el disolvente adicional que contiene al polímero que forma la membrana semipermeable; en la polimeri zación interfacial, el disolvente adicional contiene a la segunda especie monomérica del copolímero. La membrana se mipermeable se forma al rededor de la microgota y la micro cápsula que contiene a la enzima se lava y se transfiere a un sistema acuoso que contenga un surfactante soluble en agua, como el Tween 20. Para la formación de microcápsulas producidas por la formación de coacervados se han hecho a partir de colodión, poliestireno, benzalkonium-hepa-

rina-colodi6n, etilcelulosa y acetato butirato de celulosa. La formaci6n de microc6psulas por el m6todo de polimerizaci6n interfacial se ha restringido principalmente al uso de nylon, aunque tambi6n se han utilizado distintas aminas y di6cidos halogenados para preparar el cop6l6mero de la amida, todos los estudios reportados sobre la microencapsulaci6n de enzimas han utilizado 1,6 diamino hexano (Hexametilen diamina) como la diamina soluble en agua y 1,10 cloruro de decanoil (cloruro de sebacoil) con el 6cido dihalogenado soluble en la fase org6nica.

El m6todo de enlace covalente a un pol6mero ha sido el m6todo m6s estudiado para la inmovilizaci6n de enzimas. Sin embargo, la gran complejidad de las prote6nas no han permitido establecer reglas generales para predecir el efecto que tendr6 sobre una prote6na en particular que sea inmovilizada en esta forma. A pesar de 6sto, hay que tomar en cuenta dos factores muy importantes para elegir este m6todo de inmovilizaci6n: el tipo de grupos funcionales de la prote6na que formar6n el enlace covalente con el soporte y as6 seleccionar la reacci6n qu6mica apropiada; tambi6n es importante tomar en cuenta las caracter6sticas f6sicas y qu6micas del soporte sobre el cual habr6 de llevarse a cabo la reacci6n qu6mica. Se deber6 procurar que los grupos funcionales de la prote6na que se vean involucrados en la formaci6n del enlace covalente al soporte no sean esenciales para la actividad enzim6tica; adem6s las condi-

ciones de reacción deberán ser suaves así como realizarlas en medio acuoso de preferencia. Para poder seleccionar una reacción de acoplamiento apropiada, así como el polímero que se empleará para la inmovilización, deberá conocerse la composición de aminoácidos, los aminoácidos que forman el sitio activo y la estructura tridimensional de la enzima. Los grupos funcionales de la proteína que se emplearán de preferencia son:

- a) grupos amino: el ϵ amino de la lisina y el α -NH₂ del N terminal de la cadena polipeptídica.
- b) grupos carboxilo: el β y γ carboxilos del ácido aspártico y del ac. glutámico respectivamente y los α -carboxilos terminales.
- c) anillos fenólicos de la tirosina.
- d) grupos sulfhidrilo de la cisteína
- e) grupos oxidrilo de la serina, treonina y tirosina
- f) grupos imidazol de la histidina
- g) grupos indol del triptófano

En la práctica, los grupos más comúnmente usados son los amino, carboxilos o los anillos aromáticos de la tirosina y la histidina.

Las reacciones más comunes que se emplean son:

- 1) Reacciones de acilación: En éstos intervienen los grupos amino de la proteína y grupos acilantes del polímero como son el cloruro de azida o anhídridos de ácido.

El mecanismo en las reacciones de acilación es a través del ataque de un nucleófilo, en el caso de proteínas son los grupos $-NH_2$, $-OH$ o $-SH$, a un grupo carbonilo activado como el acil azida o anhídrido de ácido. Estas reacciones se llevan a cabo a pH entre 7.5 - 8.5 y a $4^\circ C$.

- 2) Reacciones de arilación y alquilación: Es éstas probablemente intervienen los grupos amino de la proteína y sustituyentes en los polímeros derivados del anillo aromáticos que tienen halógenos como sustituyentes y otros adicionales.
- 3) Método de Bromuro de Cianógeno. Este es el método más empleado para la preparación en el laboratorio de enzimas inmovilizadas así como para preparar adsorbentes insolubles para cromatografía de afinidad. El polisacárido se hace reaccionar con el Bromuro de cianógeno a pH entre 10 y 11.5. Los compuestos que contienen grupos amino libres pueden unirse covalentemente al polímero activado a valores de pH ligeramente alcalinos.
- 4) Reacciones de carbamilación y tiocarbamilación: Muchos polímeros contienen como grupos funcionales isocianatos isotiocianatos los que han sido utilizados como reactivos para la carbamilación o la tiocarbamilación para acoplar proteínas al soporte.

- 5) Reacciones de amidinación: Recientemente se han empleado polímeros que contienen grupos imido éster para la inmovilización de proteínas. Estos reactivos pueden ser preparados tratando nitrilos de polímeros con alcoholes y HCl. Los amido ésteres son rápidamente atacados por nucleófilos y reaccionan selectivamente con los grupos α y ϵ aminos de las proteínas a pH entre 8.5 y 9.5 para formar amidinas las cuales son bases más fuertes que las aminas de donde provienen.
- 6) Reacción con grupos aldehído del polímero: Se han descrito varios polímeros que contienen como grupo funcional un aldehído. Los grupos aldehído reaccionan con los grupos amino de la proteína para formar una base de Schiff; los grupos sulfhidrilo e imidazol pueden sufrir reacciones similares. Las reacciones secundarias pueden tener efectos dañinos sobre la actividad de la enzima.
- 7) Reacciones con glutaraldehído: Este reactivo bifuncional puede reaccionar con polímeros que contengan grupos amino primarios para obtener matrices que contengan a la función aldehído. Las proteínas se unen en forma irreversible al polímero tratado con glutaraldehído por medio de una reacción similar a la que ocurre en el entrecruzamiento con un reactivo bifuncional.
- 8) Reacción de diazoación: Este tipo de reacciones puede

efectuarse entre la proteína y un polímero que contenga grupos funcionales arildiazonium. El ion arildiazonio que es electrofílico ataca principalmente anillos aromáticos activados, como fenoles de tirosina o imidazol de histidina, para formar el correspondiente derivado - azo.

- 9) Reacciones de intercambio tiol - disulfuro. Los derivados poliméricos de disulfuros pueden ser usados para las reacciones reversibles de acoplamiento a los grupos sulfhidrilo de la proteína a través de la reacción de intercambio tiol-disulfuro.
- 10) Reacciones de condensación de cuatro componentes: En este tipo de reacciones se condensan cuatro componentes: carboxilato, amina, aldehído e isocianato para formar una amida N-sustituida.

La insolubilización de enzimas únicamente por entrecruzamiento intermolecular formando agregados que precipitan han tenido aplicaciones muy limitadas debido a que es difícil controlar la reacción que de como resultado productos bien caracterizados en tamaño del agregado y propiedades mecánicas. Se han descrito en la literatura una gran variedad de reactivos bifuncionales para entrecruzar proteínas pero de ellos solamente dos son los más empleados para inmovilizar enzimas: el ácido bis diazo bencidina-2,2'-disulfónico que se usó para inmovilizar proteínas dentro de membranas de co-

lodi6n (Goldman et al., 1965, 1968, 1971); y el glutaraldehído el cual se ha empleado ampliamente como reactivo para entrecruzamiento para la fijaci6n de cristales y de preparaciones histoquímicas (Sabatini et al., 1963; Quioco and Richards 1964, 1966; Bishop et al., 1966; Hopwood, 1972; - Josephs et al., 1973), para entrecruzar enzimas adsorbidas sobre soportes sólidos (Haynes and Walsh, 1969; Walsh et al., 1970; Broun et al., 1969, 1973; Liu et al., 1975), para entrecruzar enzimas con una proteína inerte en presencia o en ausencia de un soporte sólido (Broun et al., 1969, 1973; Solomon and Levin, 1974; Stanley et al., 1975) y para el entrecruzamiento de enzimas atrapadas en microcápsulas (Chang, 1971) así como para modificaciones químicas de materiales como AE-Celulosa, nylon parcialmente hidrólizado y otros soportes poliméricos que contienen grupos amino primarios.

TABLA B

Enzima	Método de Inmovilización	Actividad Retenida	Referencia
Alcohol deshidrogenasa	Inclusión en gel de poliacrilamida	5 %	Wieland et al., 1966
Lactato deshidrogenasa	Adsorción en membranas de nitrocelulosa	1 %	Tang et al., 1968
	Inclusión en gel de poliacrilamida	1 %	Wieleand et al., 1966
Glucosa Oxidasa	Inclusión dentro de una resina silástica	50 %	Pennington et al., 1968
	Acoplamiento Ni-N:O-aminopropil-trietoxi-silano	76 %	Weetall and Hersh, 1970
	Adsorción a membranas de celofán y entrecruzada con glutaraldehído	12 %	Broun et al., 1969
Catalasa	Adsorción sobre sílice impregnado con ácido láurico o cefalina	300 %	Gol'dfel'd et al., 1967
	Adsorción sobre DEAE-Celulosa	70 %	Mitz, 1956
	Inclusión dentro de microcápsulas de colodión	25 %	Chang and Poznansky, 1968.
	Entrecruzamiento con glutaraldehído	10 %	Schejter and Bar-Eli, 1970

Enzima	Método de Inmovilización	Actividad Retenida	Referencia
Colinesterasa	Inclusión en resina silástica	42 %	Pennington et al., 1968
	Acoplamiento con N-etil 5 feniliso- xazolium-3'-sulfonato a CM-Celulosa	48 %	Patel et al., 1969
	Reacción con derivados de iminocar- bonato cíclico a Sepharosa	41 %	Axen et al., 1969
Fosfatasa: alcalina y ácido	Adsorción a sílice	100 %	Vorob'eva and Poltorak, 1966
	Adsorción a Carbón recubierto con cefalina	80 %	Vorob'eva and Poltorak, 1966
Diastasa y α -amilasa	Adsorción en arcilla activada	100 %	Usami et al., 1968
Amilo glucosidasa	Inclusión en gel de poliacrilamida	2 %	Bernfeld and Wan, 1963
	Reacción con la azida de CM-Celulosa	2.4 %	Fukushi, 1968
	Adsorción a DEAE-Celulosa	55 %	Bachler et al., - 1970
β -Galactosidasa	Adsorción a DEAE-Celulosa	25 %	Sharp et al., 1969
Invertasa	Adsorción a DEAE-Celulosa	50 %	Suzuki et al., 1966
Pepsina	Adsorción a DEAE-Celulosa	27 %	Mitz, 1959
Renina	Reacción con derivados de agarosa de imino carbonato cíclico	0.23%	Green and Crutchfield, 1969
Tripsina	Adsorción en sílice seguido de entre- cruzamiento con glutaraldehído	80 %	Haynes and Walsh, 1969
	Inclusión en gel de Poliacrilamida	11 %	Wieland et al 1966

Enzima	Método de Inmovilización	Actividad Retenida	Referencia
Quimotripsina	Reacción con poli(p-diazo-DL-fenil-alanina-L-leucina)	5.9 %	Bar-Eli and Katchalski, 1963
	Reacción con la azida de poliacrilamida entrecruzada	35 %	Inman and Dintzis, 1969
	Acoplamiento a poli(anhidrido del -- ácido etilen-maleico) con hexameten diamina	70 %	Levin and Katchalski, 1968
	Reacción con poli(p-diazo-DL-fenil-alanina)	2.6 %	Bar-Eli and Katchalski, 1963
	Acoplamiento a AE-Celulosa con glutaraldehído	58 %	Habeeb, 1967
	Inclusión en resina silástica	57 %	Brown et al., -- 1968
	Inclusión en gel de Poliacrilamida	4.5 %	Bernfeld and Wan, 1963
	Reacción con diazobencil celulosa	61 %	Surinov and - - Manoilov, 1968
	Entrecruzamiento con hexameten diisocianato	30 %	Ozawa, 1967
	Papaína	Inclusión en gel de poliacrilamida	6 %
Acoplamiento con tiofosgeno a una amino resina		25 %	Manecke and Guenzel, 1967
Reacción con un derivado de diazo-arilsilil de vidrio		85 %	Weetall, 1969
Reacción con p-diazobencil celulosa		15 %	Goldstein et al., 1970

Enzima	Método de Inmovilización	Actividad Retenida	Referencia
	Entrecruzamiento con glutaraldehído	41 %	Jansen and Olson, 1969.
Bromelina	Reacción con azida de CM-Celulosa	52 %	Wharton et al., 1968
Ureasa	Adsorción en estearato de Bario	5 %	Langmuir and Schaefer, 1938
	Reacción con poli(p-diazo-DL-fenilalanina-L-leucina	78 %	Riesel and Katchalski, 1964
Penicilina amidasa	Reacción con derivados de cloro-sym-triazinil de DEAE-Celulosa	25 %	Self et al., 1969
Aminoacilasas	Adsorción a DEAE-Celulosa	80 %	Mitz and Schlueter, 1959
	Reacción con derivados de dicloro-sym-triazinil de celulosa	30 %	Lilly et al., 1970
Enolasa	Inclusión en gel de poliacrilamida	100 %	Bernfeld and Bieber, 1969

En la Tabla B, se presentan algunos ejemplos de enzimas inmovilizadas por distintos métodos. En ella se puede ver que la recuperación de actividad de una enzima después de inmovilizar depende fundamentalmente de las características de la enzima y del método de inmovilización, ya que hay varias enzimas inmovilizadas por el mismo método, en las cuales la actividad retenida es muy variable; también se puede ver en algunos casos, que una misma enzima inmovilizada por distintos métodos, la recuperación de actividad es muy diferente entre sí. Por lo que puede observarse no existe un método, ni un soporte ideal de inmovilización para todas las enzimas, sino que se tiene que determinar experimentalmente el mejor método, el mejor soporte y el reactivo más adecuado para cada enzima que se quiera inmovilizar.

Se han inmovilizado un gran número de enzimas por diversos métodos, pero no todas son factibles de ser utilizadas en procesos a gran escala, puesto que deben demostrar que tienen mayores ventajas sobre la enzima soluble a la cual van a sustituir en un proceso. Las principales ventajas potenciales que tienen las enzimas inmovilizadas son:

- a) Reducción del costo de la enzima, si ésta puede ser reutilizada.
- b) Mejoramiento del producto resultante, debido a -- que no hay contaminaciones de éste con la enzima y así tener un control más preciso del proceso.

- c) Desarrollo de procesos contínuos, lo que daría como consecuencia, una reducción en los costos de - operación.

La importancia de cada una de estas ventajas potenciales, dependerá de los costos relativos de materia prima, - enzima, energía y mano de obra del proceso original. Existen algunos ejemplos de enzimas inmovilizadas que ya se emplean a gran escala como es el caso de la amino acilasa inmovilizada a DEAE-Sephadex y se utiliza para la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos (Chibata, 1972). El -- reactor usado es de lecho empacado, hay pérdida de actividad de casi el 30% en tres semanas, pero la columna se --- reactiva agregando más enzima. El costo de operación total con la enzima inmovilizada fue de casi el 60% con respecto al proceso en lote, usando enzima soluble. El resultado principal fue la reducción de cinco veces el costo - de la enzima y de tres veces el costo de mano de obra.

Algunas otras compañías operan con reactores con enzima inmovilizada a gran escala, aunque su uso está limitado todavía, puede verse que la utilización de las enzimas inmovilizadas tienen gran futuro en la industria.

Un factor determinante para una utilización eficiente de las enzimas inmovilizadas es el uso de reactores adecuados. Para poder tener el mejor reactor para una enzima inmovilizada, se deben tomar en cuenta los siguientes factores:

- a) La configuración del reactor.
- b) Los efectos de transferencia de masa adyacentes y dentro de la fase del acarreador.
- c) La partición electrostática del sustrato entre el fluido del reactor y la fase del acarreador.
- d) La distribución de tiempos de residencia dentro del reactor.

En la actualidad existen algunos tipos de reactores -- que se utilizan de acuerdo al tipo de reacción y al tipo de enzima inmovilizada que se tiene. Estos reactores pueden - ser empleados en procesos industriales con enzimas solubles o inmovilizadas. De acuerdo a la forma de alimentación con sustrato y a la forma de salida de producto, el reactor enzimático puede ser clasificado en dos grandes grupos:

- a) Reactores en lote.
- b) Reactores de flujo contínuo.

El reactor en lote es simple, requiere de poco equipo - y es muy apropiado para estudios en pequeñas escalas. El -- uso de enzimas solubles está restringido especialmente a --- reactor en lote en tanque agitado. En estos casos, la enzi- ma libre se agrega al reactor junto con el sustrato y la re- acción se realiza. Generalmente no se hace ningún intento - de recuperación de la enzima del producto, ya que esto aumen- taría mucho los costos del proceso. Cuando se utiliza este tipo de reactor con enzima inmovilizada, el derivado insoluble deberá ser separado del producto por un paso subsecuente.

La recuperación puede hacerse con filtración o por centrifugación.

Existen diversos tipos de reactores contínuos:

- i) Reactor de lecho empacado.
- ii) Reactor de lecho fluidizado.
- iii) Reactor en tanque agitado de flujo contínuo.

En el reactor de lecho empacado, hay un movimiento contínuo del sustrato a través del lecho de enzima inmovilizada en la dirección seleccionada. Si el perfil de la velocidad del fluído está perfectamente plano sobre la sección transversal, se dice que es un reactor tipo pistón, es decir, los elementos de fluído se mueven a través del reactor en forma de pistón.

En un reactor de lecho fluidizado, el sustrato se pasa a través de la columna en flujo ascendente a una velocidad lo suficientemente alta para mantener a las partículas en suspensión.

En los reactores de tanque agitado de flujo contínuo, su contenido se encuentra perfectamente bien mezclado, en consecuencia, todos los elementos del reactor tienen esencialmente la misma composición que la de los que están saliendo, y así la velocidad de reacción se puede determinar por la composición del flujo de salida del reactor. La construcción abierta de este reactor permite un rápido reemplazamiento de enzima inmovilizada. También facilita un control fácil de temperatura y de pH.

Importancia práctica de la enzima

Glucosa Isomerasa.

Desde el establecimiento de la utilización de la aminoacilasa inmovilizada en la producción comercial de aminoácidos, se han incrementado los estudios para utilizar comercialmente otros sistemas enzimáticos. Dentro de las enzimas de mayor potencial económico a corto plazo, se encuentra la Glucosa Isomerasa. Esta enzima cataliza la conversión de D-Glucosa a D-Fructosa y en realidad es una xilosa isomerasa cuyo nombre correcto es (D-xilosa cetol isomerasa E.C. 5.3.1.5). El interés comercial de esta enzima radica en que a través de su actividad se produce fructosa que es un azúcar de 1.7 veces mayor poder edulcorante que la sacarosa (Mermeslstein, 1975) y de 2.4 veces la glucosa.

Debido a que la reacción alcanza el equilibrio aproximadamente al 50% de conversión, para obtener fructosa pura, se requiere llevar a cabo procesos de separación. Sin embargo, es posible obtener jarabes con un contenido del 42% sin necesidad de separar los azúcares ya que estos jarabes fructosados tienen propiedades similares al azúcar invertido (Wardrip, 1971).

Se han reportado un gran número de microorganismos que producen esta actividad, entre los que se encuentra Pseudomonas hydrophila (Marshall and Kooi, 1957), Aerobacter cloacae (Sato and Tsumura, 1964; Tsumura and Sato, 1961), --

Bacillus megatherium (Takasaki, 1964), Aerobacter aerogenes (Natake, 1964), Lactobacillus brevis (Yamanaka, 1963; 1968) Escherichia intermedia (Natake, 1966), Streptomyces phaeochromogenes (Tsumura and Sato, 1965; Tsumura et al., 1967; - - Strandberg and Smiley, 1971), Brevibacterium pentoaminoacidinum (Ichimura, 1965), Streptomyces albus (Takasaki, 1966, Bacillus coagulans (Yoshimura et al., 1966; Danno, 1970); - - Streptomyces griseolus (Giovenco et al., 1973), Paracolobacterium aerogenoides (Takasaki and Tanabe, 1961), etc.

Marshall y Kooi en 1957, fueron los primeros que reportaron esta actividad de isomerasa en células crecidas en D-xilosa de Pseudomonas hydrophila, pero requerían la presencia de arsenato. Posteriormente se descubrieron otros microorganismos que tenían esta misma propiedad de convertir glucosa en fructosa, pero estas enzimas también requerían la presencia de arsenato para poder llevar a cabo la reacción (Natake and Yoshimura, 1963; 1964). En 1966, Natake purificó la enzima que convertía Glucosa en Fructosa hasta homogeneidad y vio que la enzima podía isomerizar Glucosa 6-fosfato en ausencia de arsenato por lo que probablemente se tratara de la enzima fosfo glucosa isomerasa (E.C.5.3.1.9) Yamanaka (1963) encontró la misma actividad en Lactobacillus brevis crecido en D-Xilosa, pero esta enzima no requería de la presencia de arsenato por lo que se concluyó que se trataba de enzimas diferentes. Esta enzima encontrada en este microorganismo, fue purificada parcialmente, observándose que la --

relación de actividad entre glucosa y xilosa permanecía constante a través de la purificación (Yamanaka, 1963), lo cual sugirió que la glucosa isomerasa y la xilosa isomerasa eran la misma enzima. Así, no se ha encontrado una verdadera glucosa isomerasa, sino que se trata de una xilosa isomerasa -- con actividad hacia glucosa; aunque hay algunas isomerasas -- como la producida por Pasteurella pestis A-1122 que no tiene actividad hacia glucosa (Slein, 1962).

Las especies de Streptomyces, probablemente han sido -- las más estudiadas como fuente de Glucosa Isomerasa que cualquier otro género. Sato y Tsumura (1967) fueron los primeros en descubrir en Streptomyces phaeochromogenes cepa SK, -- la actividad de glucosa isomerasa. Al purificar la enzima, observaron que para isomerizar glucosa y xilosa sólo se requería la presencia de magnesio y cobalto para la actividad completa y que la presencia de magnesio protegía a la enzima de la inactivación, así como la glucosa la protegía de la -- desnaturalización por calor. Takasaki (1966), buscó microorganismos que además de producir la enzima fueran capaces de asimilar xilanos, así encontró la cepa de Streptomyces albus (Takasaki, et al., 1969). Observándose que era esencial la presencia de xilanos o xilosa para la producción de glucosa isomerasa y que esta producción se veía aumentada por la presencia de cobalto en el medio de fermentación; para el sistema in vitro, la enzima también requirió la presencia de magnesio y cobalto para la actividad. Yoshimura (1966), seleccionó

de entre 300 microorganismos que crecían en xilosa como fuente de carbono a una cepa de Bacillus coagulans HN-68, que producía glucosa isomerasa en medios que contenían xilosa y además la producción se aumentó cuando se proporcionó manganeso en el medio de cultivo. Las propiedades de esta enzima, así como sus condiciones de reacción la hicieron atractiva para su utilización a nivel industrial. Esta enzima requiere la presencia de cobalto para isomerizar glucosa y ribosa, pero manganeso para xilosa (Danno, 1970). También se vio que metales como Co^{++} , Mn^{++} y Ni^{++} protegían a la enzima de inactivación al calor.

Para producir la enzima a gran escala, una vez que se tiene el microorganismo productor de la enzima, seleccionado, se requiere de la optimización de las condiciones de fermentación para obtener los máximos rendimientos de actividad producida. Existen varios componentes del medio que estimulan la producción de glucosa isomerasa, esencialmente, el sustrato inductor que es la xilosa (Yamanaka, 1963; Takasaki et al., 1969), como este es un azúcar caro, se ha buscado reemplazarlo por xilanos o con sustratos que los contengan. Para aumentar la producción de enzima se han obtenido una gran cantidad de cepas mutantes que son hiperproductoras, que son resistentes a re presión catabólica o que son constitutivas, (Sánchez and Quinto, 1975).

La Glucosa Isomerasa por tratarse de una enzima in--

tracelular es una enzima cara, ya que los procesos de obtención elevan mucho los costos del producto. Generalmente se ha utilizado a la célula completa para convertir -- glucosa a fructosa (Yoshimura, et al., 1966; Tsumura et al., 1967; Takasaki, 1969). Las células de Streptomyces albus se lisan a temperaturas menores de 50°C liberándose la enzima (Takasaki et al., 1969), pero el calentamiento a más de 60°C durante 10 minutos, fija a la enzima a la célula. Es relativamente fácil inmovilizar Glucosa Isomerasa dentro de la célula de Streptomyces, ya que ésto puede hacerse solamente incubando a las células en solución acuosa con sales inorgánicas. Se ha desarrollado otro proceso de inmovilización de la enzima a la célula para ser utilizada en proceso continuo.

Para su utilización, las células también han sido inmovilizadas por atrapamiento o microencapsulación tanto -- por métodos físicos como químicos (Kolorik et al., 1974; Vieth et al., 1973).

Un factor de gran importancia es la estabilidad de la actividad enzimática bajo las condiciones de reacción. Comúnmente se han hecho intentos de estabilizar enzimas -- por inmovilización, en este caso particular a la Glucosa Isomerasa, fijando la enzima a la célula, pero hay que to-

mar en cuenta una serie de factores para poder evaluar la estabilidad de estas preparaciones debido a que es posible que se presenten resistencias difusionales o efectos en el microambiente que podrían causar un aumento aparente en la estabilidad de la enzima inmovilizada sobre la estabilidad de la enzima soluble cuando este efecto puede ser solo aparente.

Desde hace aproximadamente 10 años, se empezó a utilizar la actividad de Glucosa Isomerasa para producir jarabes fructosados a partir de hidrolizados de almidón y a un costo menor que el del azúcar invertido.

En 1975, se produjeron en los Estados Unidos entre 1 400 - 1 800 millones de libras de jarabes fructosados. Estos jarabes contienen aproximadamente el 71% de sólidos, son cristalinos e incoloros, pueden manejarse con instrumental similar al empleado para azúcar invertido o jarabes de glucosa, y deben almacenarse aproximadamente entre 30°C y 35°C para prevenir su cristalización (Robinson, 1975). El jarabe normal contiene aproximadamente un 42% de fructosa y es tan dulce como un jarabe de sacarosa y no contiene sabores ni olores que enmascaren otro tipo de sabor u olor, por lo que se utiliza en muchos productos alimenticios; otra ventaja que tienen es su alta presión osmótica que lo previene de contaminación microbiana. A continuación se muestra un análisis de un jarabe comercial producido por Clinton Corn Processing Co, (Hamilton et al., 1974).

Sólidos	71	%
Humedad	29	%
Cenizas	0.03	%
Dextrosa	50	%
Fructosa	42	%
Otros sacáridos	8	%

Para la producción de estos jarabes, se ha utilizado en general a la Glucosa Isomerasa dentro de la célula y en células inmovilizadas para la producción en lote y continúa a escala industrial, como por ejemplo la utilizada por Novo Industri A/S (Zittan et al., 1975). Esta forma de utilización tiene muchas desventajas, por ejemplo, por presentar actividad específica baja, se requieren de grandes volúmenes para obtener la productividad deseada, en consecuencia, los reactores deben ser de gran capacidad y ésto incrementa mucho los costos de operación y producción; además se presentan problemas serios de difusión del sustrato y del producto a través de la membrana, también el producto final puede ser contaminado con productos de degradación de la célula, lo que puede alterar el olor, color, sabor, etc., de éste.

El inmovilizar a la enzima libre en un soporte sólido, posee mayores ventajas que el retenerla únicamente dentro de la célula, puesto que se puede inmovilizar a la enzima libre de otros contaminantes celulares obte---

niéndose preparaciones con Actividad Específica elevada, reduciéndose los volúmenes de enzima empleados para un proceso, y así reducir los costos de éste. Como se obtiene un mayor grado de pureza del producto final y se puede recuperar la enzima para su reutilización, el potencial de uso a gran escala es muy amplio.

La Glucosa Isomerasa se ha inmovilizado por distintos métodos y a diferentes soportes como por ejemplo la enzima de Streptomyces phaeochromogenes se ha inmoviliza do por enlace covalente a esferas de vidrio poroso - - - (Strandberg and Smiley, 1972), a esferas de vidrio recubiertas con Zirconio (Havewala and Pitcher, 1974; Lee et al., 1976), por atrapamiento en polímeros de acrilamida (Kasumi et al., 1974), y por adsorción a DEAE-Sephadex - (Tsumura and Ishikawa, 1967) y a DEAE-Celulosa (Schnyder, 1974). La enzima de Streptomyces griseolus ha sido inmovilizada por atrapamiento en fibras de triacetato de celulosa (Giovenco et al., 1973) y la de Bacillus coagu-- lans por adsorción a DEAE-Celulosa (Huitrón and Limón -- Lason, 1978).

Se ha reportado que las preparaciones obtenidas por unión covalente y atrapamiento presentan una menor retención de actividad que las obtenidas por adsorción. Por otro lado, es importante mencionar que la inmovilización por adsorción presenta las siguientes ventajas: es simple y rápida, las condiciones de inmovilización son suaves,

es económica, se puede reutilizar el soporte, se puede purificar la enzima al inmovilizar, y como el sustrato y el producto de la Glucosa Isomerasa son moléculas neutras, - se pueden utilizar altas concentraciones de sustrato durante la operación continua.

Cuando se inmovilizó la Glucosa Isomerasa de Bacillus coagulans a diferentes soportes de intercambio iónico, se observó que mayor retención de actividad en DEAE-Celulosa que en DEAE-Sephadex y AE-Celulosa. La retención de actividad encontrada fue de 93-100% en relación a la inicial y se obtuvieron preparaciones con una actividad específica de 1700 unidades/1 gramo de soporte en base seca (Huitrón and Limón-Lason 1978). Cuando se utilizó la Glucosa Isomerasa inmovilizada, en forma continua, se observó una disminución de la actividad durante el tiempo de operación. Se pensó que esta pérdida de actividad se debía principalmente a desorción, ya que al final de la reacción se recuperó muy poca proteína y porque la desorción de la actividad aumentó, al aumentar la concentración de Mg^{++} durante la operación continua (Huitrón and Limón-Lason, 1978). El presente trabajo tiene como objetivo el inmovilizar a la Glucosa Isomerasa de Bacillus coagulans e intentar mejorar su estabilidad operacional por entrecruzamiento de la enzima después de su inmovilización a DEAE-Celulosa.

M A T E R I A L E S Y

M E T O D O S

M A T E R I A L E S Y M E T O D O SREACTIVOS:

Como fuente de enzima, se utilizó una preparación - cruda de Glucosa Isomerasa de Bacillus coagulans proporcionada por Novo Industri A/S de Dinamarca. La DEAE-Celulosa (DE-52) de Whatman Biochemicals Ltd., Inglaterra. La Dextrosa (anhidra), el tartrato de sodio y potasio, el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, el $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el NaCl , - - Na_2CO_3 y la Glicina de J.T. Baker, S.A. de C.V., México. La Albúmina Sérica Bovina se obtuvo de Sigma Chemical - Company, E.U.A. El Acido Maléico, el cloruro de cisteína, la solución de glutaraldehído al 25%, el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, el $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, la D-Fructosa, el Etanol, el Reactivo de Folin Ciocalteu, el H_2SO_4 , el HClO_4 y el NaOH de E. Merck, Alemania, El Carbazol de Hopkin and Williams, Ltd., Inglaterra.

METODOS:

Sistema de Ensayo para la Determinación de
Actividad de Glucosa Isomerasa.

La actividad enzimática, durante el proceso de purificación, se determinó en el siguiente sistema:

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | Solución de <u>D</u> -glucosa 0.55 M conteniendo $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 M y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 M en buffer de maleatos 0.2 M, pH 6.8 | 20.0 ml |
| b) | Solución de enzima | 0.5 ml |
| c) | Agua | 19.5 ml |

La solución que contenía el sustrato, los metales y el agua, se preincubó en un baño maría a 69°C durante 5 minutos para así obtener una temperatura en el sistema de reacción de 65°C. Desde el inicio de la preincubación se mantuvo una agitación de 1000 rpm con un agitador de varilla "Caframo" Mod. R. 2 R1-64 Wiartron, Canadá.

La reacción se inició adicionando la enzima al sustrato, y a los 0, 3, 6, y 9 minutos de incubación se tomaron muestras de 2 ml los cuales fueron adicionados a 10 ml de HC_{10}_4 0.1 M con el objeto de detener la reacción. La fructosa producida durante el proceso fue determinada en alícuotas de distinto volumen.

Para el ensayo de la actividad soluble e inmovilizada en reactor en lote, se utilizaron los siguientes sistemas:

	Soluble	Inmovilizada
a) Solución de glucosa* 0.55 M en agua ajustado al pH de la solución a 6.8	20.0 ml	20.0 ml
b) Enzima	0.5 ml	6.0 ml
c) Solución de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 M	0.4 ml	0.4 ml
d) Solución de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 M	2.0 ml	2.0 ml
e) Agua ajustada a pH 6.8	17.3 ml	11.8 ml

* Donde se utilizó una concentración mayor de glucosa, se especifica en la figura.

La enzima junto con sus metales y el agua, así como la solución de glucosa fueron preincubados durante 5 minutos a $69^\circ C$ para obtener una temperatura en los sistemas de $65^\circ C$; la solución que contenía la enzima se mantuvo en agitación con un agitador de varilla. La reacción se inició adicionando el sustrato a la enzima y a los 0, 3, 6 y 9 minutos, se tomaron muestra de 2 ml que se agregaron a tubos de ensaye que contenían 10 ml de $HClO_4$ 0.1 M, y de aquí se tomaron las alícuotas para la determinación de fructosa. Se tuvo la seguridad de que en el rango de tiempo utilizado se mantuviera una relación lineal entre el tiempo de reacción y la actividad enzimática.

Determinación de D-Fructosa

La D-fructosa producida durante la reacción se determinó usando una modificación del método de cisteína-carbazol-sulfúrico reportado por Dishe-Borenfreund (1951). A una muestra de 0.5 ml, se le añadió 0.1 ml de solución de cisteína al 2.5% en agua, se preincubó a 30°C durante dos minutos y se agregaron 3 ml de solución de H₂SO₄ al 80%, el cual se mezcló previamente con una solución de carbazol al 0.4% en etanol, con una relación ácido-carbazol de 100:1. Se incubó a 30°C durante 30 minutos, y al término de este tiempo se leyó la densidad óptica a 560 nm en un colorímetro "Spectronic 20", Baush and Lomb. Fue necesario hacer la lectura a los 30 minutos exactamente, ya que a medida que transcurre el tiempo sigue aumentando la intensidad del color.

Para determinar la fructosa de los problemas se utilizó una curva estándar donde se grafica densidad óptica contra la concentración de fructosa. En la Figura 1, se puede ver que la densidad óptica guarda una relación lineal con concentraciones de D-fructosa hasta de 0.5 μ moles.

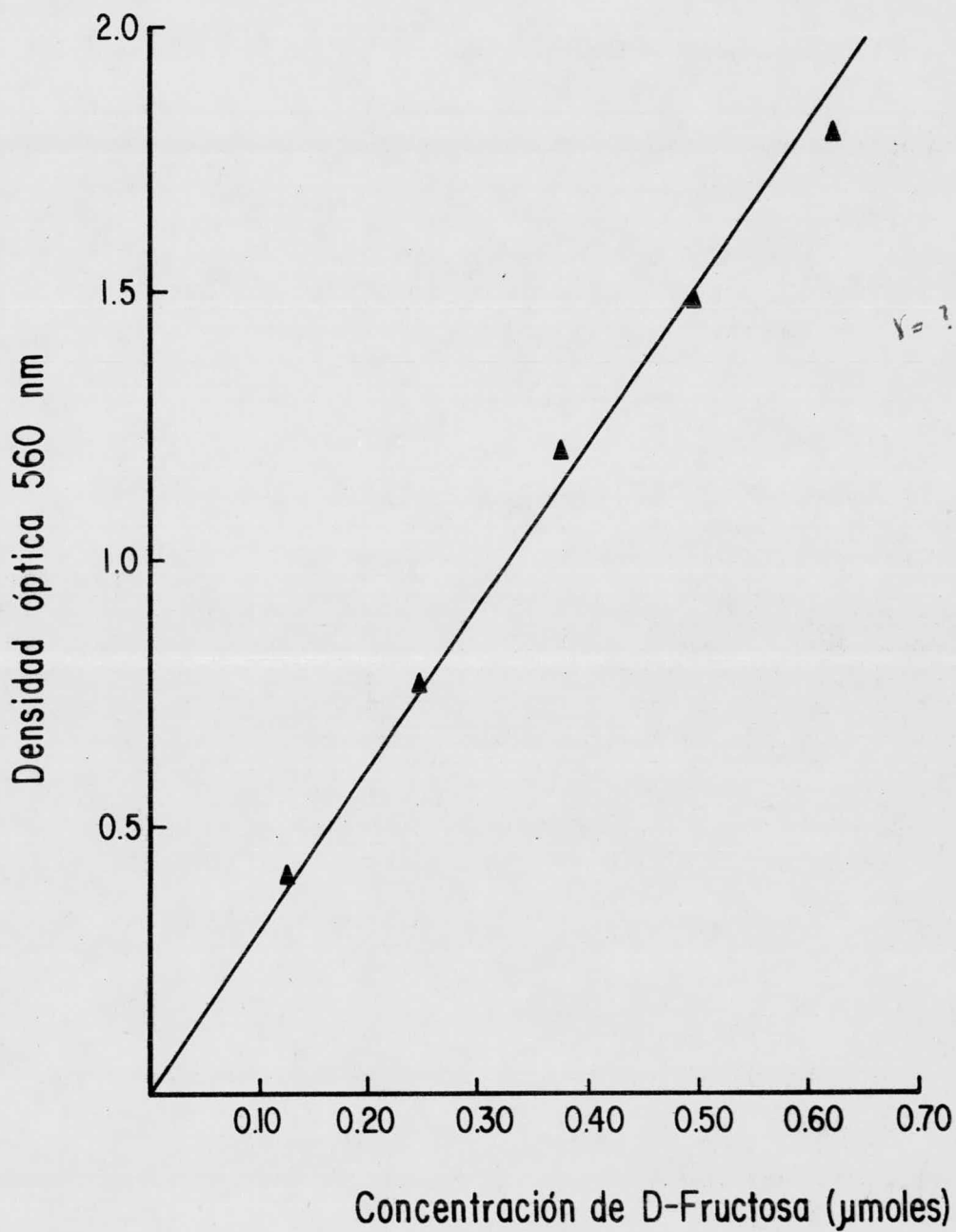


Figura 1. Curva Estandard de D-Fructosa. Para la determinación de D-fructosa se siguió la modificación del método de Dische-Borenfreund - descrito en Materiales y Métodos.

Determinación de Proteína

La proteína de las distintas fracciones de la purificación, de la proteína inmovilizada y de la soluble se determinó por el método de Lowry et al. (1951). Una muestra de 1 ml se hizo reaccionar con 5 ml de una solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH que contenía $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua y Tartrato de sodio y potasio al 2% en agua en una relación de solución de Na_2CO_3 - Cu y Tartrato de 50:1. Después de 10 minutos se agregó 0.5 ml de reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1:1 en agua; después de 30 minutos de reacción se leyó densidad óptica a 590 nm en un colorímetro Spectronic 20. La concentración de proteína de los problemas fue calculada utilizando la curva estándar de albúmina sérica bovina que se muestra en la Figura 2.

Obtención de la Actividad de Glucosa Isomerasa

Para la obtención de la glucosa isomerasa se siguió el método de Huitrón y Col., (1978). Es decir se preparó una suspensión al 4% de enzima cruda en una solución amortiguadora de maleato 0.05M a pH 6.8 que además contenía Mg^{++} 0.01M (P_1); se centrifugó a 12 000 rpm en una centrifuga "Sorvall" Modelo R.C. 2-B, durante 30 minutos a 4°C, (Temperatura a la cual se llevaron a cabo todos los demás pasos de la purificación). El precipitado obtenido se de-

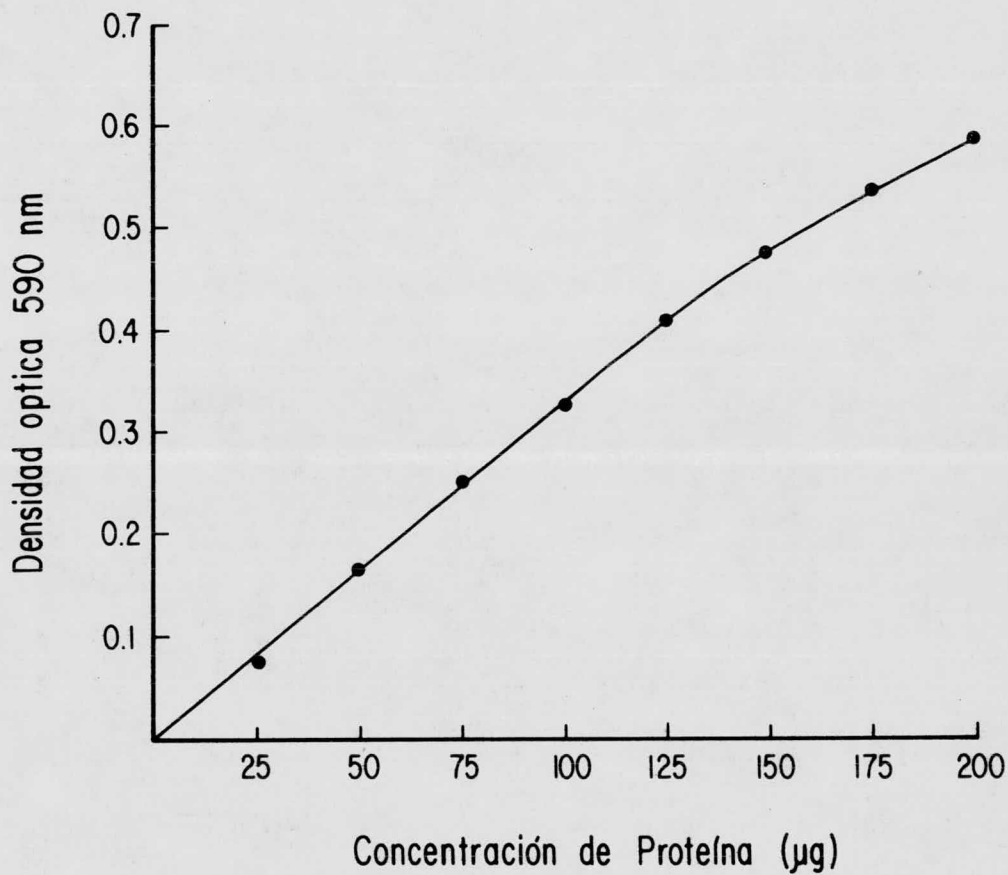


Figura 2. Curva Estandard de Protefna. Se siguió el método de Lowry et al., descrito en Materiales y Métodos, utilizando como referencia -- una solución de albúmina sérica bovina.

sechó y al sobrenadante (S_1) se le adicionó $MnCl_2$ 1M, pH 7, hasta llevarlo a una concentración final de 0.05 M; - después de 1.5 hs. se eliminó el precipitado centrifugando a 12 000 rpm durante 10 minutos y en el sobrenadante (S_2) se precipitó la proteína llevando hasta 70% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$. Al término de 2 hs., se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 12 000 rpm y el precipitado obtenido (P_3) fue resuspendido en agua a pH 6.8 .

A las fracciones de la purificación (P_1 , S_1 y P_3), se les determinó actividad y concentración de proteína y se calculó la actividad específica y el rendimiento obtenido.

Inmovilización de la Actividad de Glucosa Isomerasa.

Se llevó a cabo siguiendo una modificación del método reportado anteriormente (Huitrón and Limón-Lason, - - 1978). En un vaso de precipitados colocado sobre hielo, se agregaron 10 ml de una suspensión que contenía 200 mg (peso seco) de DEAE-Celulosa (DE-52) y se agitó lentamente con un agitador magnético "Corning" modelo PC-353, a esta suspensión se le adicionaron 7.5 ml más de agua y - posteriormente se fue adicionando lentamente 2.5 ml de - la solución de enzima (P_3) la cual contenía 37 mg de proteína por mililitro, se mantuvo el sistema de inmoviliza

ción en agitación continua durante 15 minutos más. Al --
Término de este tiempo, se filtró el complejo insoluble -
DEAE-Celulosa-Glucosa Isomerasa en un filtro Millipore ti
po XX100 2500 con membrana de 1.2 μ de diámetro de poro,
y se pasaron después 200 ml de agua destilada fría con lo
cual se lavó el exceso de proteína no adsorbida. Poste--
riormente al derivado insoluble se le agregó agua hasta ob
tener una suspensión al 1% del derivado en base al peso -
inicial del soporte. Se determinó la actividad de Gluco
sa Isomerasa así como la proteína inmovilizadas y en las
fracciones de filtración y de lavado en la forma descrita
anteriormente. Para los casos en los que se utilizaron -
más de 200 mg de soporte, se mantuvo la proporción entre
el peso del soporte, concentración de proteína agregada y
volumen de inmovilización.

Determinación de la Proteína y Actividad de la
Glucosa Isomerasa después de desorción.

Tres mililitros de la suspensión de Enzima inmovili
zada, se colocaron dentro de un filtro Millipore con mem
brana de 1.2 μ de diámetro de poro. Se le pasaron 15 ml
de NaCl 1M, los cuales fueron colectados en tres fraccio
nes de 5 ml cada una. En cada una de estas fracciones -
se determinó la concentración de proteína por el método
de Lowry ya descrito. También se determinó la actividad

en la forma descrita anteriormente. Se tuvo la seguridad de que a la concentración de NaCl utilizada no se observa ninguna interferencia sobre la determinación de la actividad enzimática ni sobre la determinación de proteína.

Entrecruzamiento de la Glucosa Isomerasa Inmovilizada

A partir de una solución de glutaraldehído al 25%, se prepararon soluciones de glutaraldehído a concentraciones entre 0.15 y 0.75% las cuales fueron utilizadas para el proceso de entrecruzamiento. A 200 mg del complejo insoluble resuspendidos en 10 ml de agua, se le fueron añadiendo lentamente 20 ml de la solución de glutaraldehído a la concentración que se quiera probar, manteniendo la agitación lenta en forma continua y a temperatura ambiente. Al término de una hora de reacción se eliminó el exceso de glutaraldehído por medio de filtración en filtro Millipore y se lavó con 100 ml de agua destilada. El derivado obtenido se resuspendió en agua destilada hasta una concentración del 2% en base al peso seco del soporte.

Neutralización de grupos aldehído libres.

Con el objeto de neutralizar el exceso de grupos aldehído libres susceptibles de reaccionar entre sí, se pro

baron soluciones de glicina a concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3M. A una suspensión de 200 mg de derivado en 5 ml de agua, se le agregó lentamente 30 ml de la solución de glicina en frío, manteniendo al sistema en agitación continua durante 15 minutos, al término de la reacción se se paró el derivado insoluble del medio de reacción por medio de filtración, después se lavó con agua destilada fría -- con un volumen aproximadamente de 10 veces mayor al del sistema, y se resuspendió en agua a la que previamente se le ajustó el pH a 6.8 .

Proceso Continuo de Conversión de D-Glucosa a D-Fructosa

Para el proceso continuo de conversión se utilizaron columnas de cromatografía de Pharmacia Fine Chemicals tipo K 16/20 con chaqueta, por donde se recirculó agua utilizando un recirculador de agua "Haake" modelo E-52 para mantener la temperatura a 65°C en las columnas.

En las columnas del tipo K 16/20 (1.6 cm X 20 cm) se agregaron 200, 500 y 1000 mg del derivado insoluble en base al peso seco del soporte.

A través de las columnas se hizo pasar una solución de D-glucosa 1.0M que contenía Mg^{++} 0.005M y Co^{++} 0.001M siendo el pH de esta solución de 6.8, esta fue introducida por la parte superior de la columna impulsada por una

bomba peristáltica de Pharmacia modelo P-3, con un flujo de salida de 10 ml/h. Las columnas estaban conectadas a un colector de fracciones LKB Ultro Rac en el que se recolectaron fracciones de 0.85 ml y 1.8 en tubos de ensaye que contenían 5.0 ml de HC10_4 0.1M. La D-fructosa -- producida en el tiempo fue determinada en las fracciones haciendo diluciones y utilizando el método descrito anteriormente.

R E S U L T A D O S

R E S U L T A D O S

Obtención de la Actividad de Glucosa Isomerasa

Se partió de una preparación cruda de Bacillus coagulans la cual fue resuspendida en buffer maleatos pH -- 6.8, se centrifugó y el sobrenadante obtenido fue sometido a precipitación adicionando $MnCl_2$ 1M hasta obtener -- una concentración final de Mn^{++} de 0.05M. Del sobrenadante obtenido se precipitó la proteína con $(NH_4)_2SO_4$ al 70% de saturación y este precipitado se resuspendió en agua a pH 6.8. En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos; la suspensión de extracto crudo tuvo una actividad específica de 3.5 U/mg de proteína y el precipitado de sulfato de amonio de 15.8 U/mg de proteína, obteniéndose un factor de purificación de aproximadamente 5 veces y un rendimiento del 52%.

Inmovilización de la Actividad de Glucosa Isomerasa

Para el proceso de inmovilización se empleó la preparación obtenida después de precipitar con sulfato de amonio ya que se había visto anteriormente, que la enzima después de cromatografía en DEAE-Sephadex resultaba ser más inestable que la obtenida después de precipitar

TABLA I

OBTENCION DE GLUCOSA ISOMERASA

Fracción	Volumen final (ml)	Proteína total (mg)	Actividad (unidades)*	Actividad específica (unidades /mg P)	Rendimiento (%)
Extracto crudo (P ₁)	61.2	759.5	2655	3.5	100
Sobrenadante (S ₁)	52.5	346.5	2798	8.0	105
Después de MnCl ₂ (S ₂)	50	109.8	1611	14.6	60
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (P ₃)	50	88	1393	15.83	52

* 1 Unidad = 1 μ mol de D-fructosa x min⁻¹

con sulfato de amonio.

Como se reportó anteriormente (Huitrón and Limón-Lason, 1978), el soporte de intercambio iónico que retuvo mayor actividad de Glucosa Isomerasa fue la DEAE-Celulosa (DE-23) pero por limitaciones administrativas no se pudo disponer para este estudio de una DEAE-Celulosa del mismo tipo y en su lugar se empleó una DEAE-Celulosa (DE-52). Debido a que se busca aumentar la estabilidad operacional del derivado DEAE-Celulosa-glucosa isomerasa, se pensó en el entrecruzamiento de la enzima con reactivos bifuncionales después de su inmovilización. Para que haya entrecruzamiento intermolecular de la enzima es indispensable, que el soporte esté saturado con moléculas de proteína. Por lo que se determinó el rango de saturación del soporte de acuerdo a los resultados obtenidos por Huitrón y Limón-Lason (1978). Así también fue necesario checar la preparación y caracterización de la enzima inmovilizada a DEAE-Celulosa (DE-52).

Como se puede ver en la Tabla II, bajo condiciones de saturación del soporte, hay un aumento de la actividad inmovilizada con respecto a la soluble, ya que el derivado insoluble presentó una actividad de 2726 unidades/g de soporte lo que corresponde a un incremento en la actividad del 55%. La actividad específica se vió que aumentó de 10.0 unidades/mg de proteína a 20.7 unidades/mg de proteína lo que corresponde a un aumento del 100%; con el

TABLA II

OBTENCION DE GLUCOSA ISOMERASA INMOVILIZADA

Soporte	Actividad ^a (unidades /g de sop.)		Actividad Retenida (%)	Protefna (mg/g de sop.)		Actividad específica ^a (unidades /mg Protefna)	
	Agregada	Retenida		Agregada	Retenida ^b	Agregada	Retenida ^b
DEAE-Celulosa (DE-52)	1756	2726	155	175	132	10	20.65

^a 1 unidad = 1 μmol de D-fructosa X min^{-1}

^b Se determinó después de desorber la protefna del soporte con NaCl 1.0M

objeto de determinar si esta "activación" de la enzima - inmovilizada se conservaba después de la desorción, la - enzima fue desorbida del soporte en NaCl 1.0M. En la Tabla III se observa que la actividad, después de haber si - do desorbida la enzima, fue de 2270 unidades/g de soporte, esto indica que aunque la actividad disminuyó con -- respectoa a la inmovilizada, cuando se comparó con la so - luble, el aumento en la actividad correspondió a un 29% más, siendo la actividad específica un 72% mayor que la Actividad Específica de la enzima soluble.

Determinación del Km aparente

Con el propósito de determinar el Km aparente de la enzima inmovilizada, se determinó la actividad a diferen - tes concentraciones de sustrato: 0.55, 1.1, 1.6, 2.2 y - 2.7 M, a tiempos en los que se tuviera velocidad inicial de la reacción. Para calcular el Km aparente de la enzi - ma inmovilizada se empleó el método de dobles recíprocas de Lineweaver-Burk. Utilizando una concentración de Mg^{++} de 0.005 M los valores de Km aparente fueron de 1.9×10^{-1} M para la enzima inmovilizada y de 1.7×10^{-1} M para la - enzima soluble.

TABLA III

EFFECTO DE LA INMOVILIZACION Y DESORCION SOBRE LA ACTIVIDAD DE
GLUCOSA ISOMERASA

Enzima	Actividad ^a (unidades /g de sop.)	Actividad Retenida (%)	Protefna (mg/g de sop.)	Actividad Especifica ^a (unidades /mg de P.)
Soluble	1756	100	175	10
Inmovilizada	1756	155	132	20.65
Desorbida ^b	2270	129	132	17.2

^a 1 unidad= 1 μmol de D-fructosa X min^{-1}

^b Se determinó después de desorber la protefna del soporte con NaCl 1.0M

Efecto del pH

A la glucosa isomerasa inmovilizada se le determinó el pH óptimo, encontrándose un valor de 6.8 (Fig. 3), el cual difiere del valor de 7.2 obtenido para la enzima soluble.

Estabilidad a la temperatura.

La preparación de enzima inmovilizada se preincubó durante varias horas a 40°, 60° y 70°C en presencia de 0.01 M de Mg^{++} y pH 6.8, y a diferentes tiempos la actividad residual se determinó a 65°C. Como se puede ver en la Figura 4 la curva de pérdida de actividad sigue cinética de primer orden. A 40°C la actividad se mantiene al 100% hasta 24 horas de preincubación; a 60°C, la actividad disminuyó un 5% en el mismo tiempo, además a esta temperatura la pérdida de actividad fue igual para la enzima inmovilizada que para la soluble, en cambio a 70°C, a las 24 horas se pierde un 25% de la actividad inicial. En base a estos resultados se calcularon las vidas medias a las tres temperaturas, siendo éstas: a 40°C de 528 horas, a 60°C de 192 horas y a 70°C 55 horas.

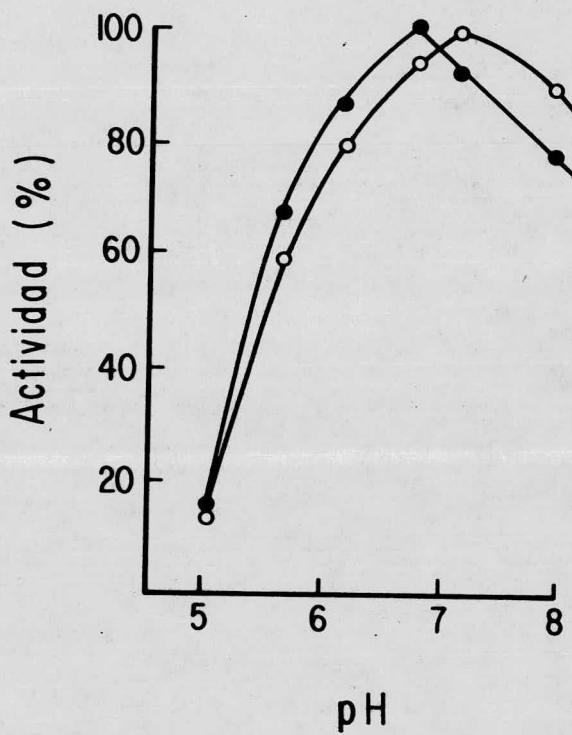


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad de la Glucosa Isomerasa soluble e inmovilizada. La determinación de actividad se llevó a cabo de acuerdo al ensayo descrito en Materiales y Métodos, variando únicamente el pH.

Enzima soluble (○); Enzima inmovilizada -- (●).

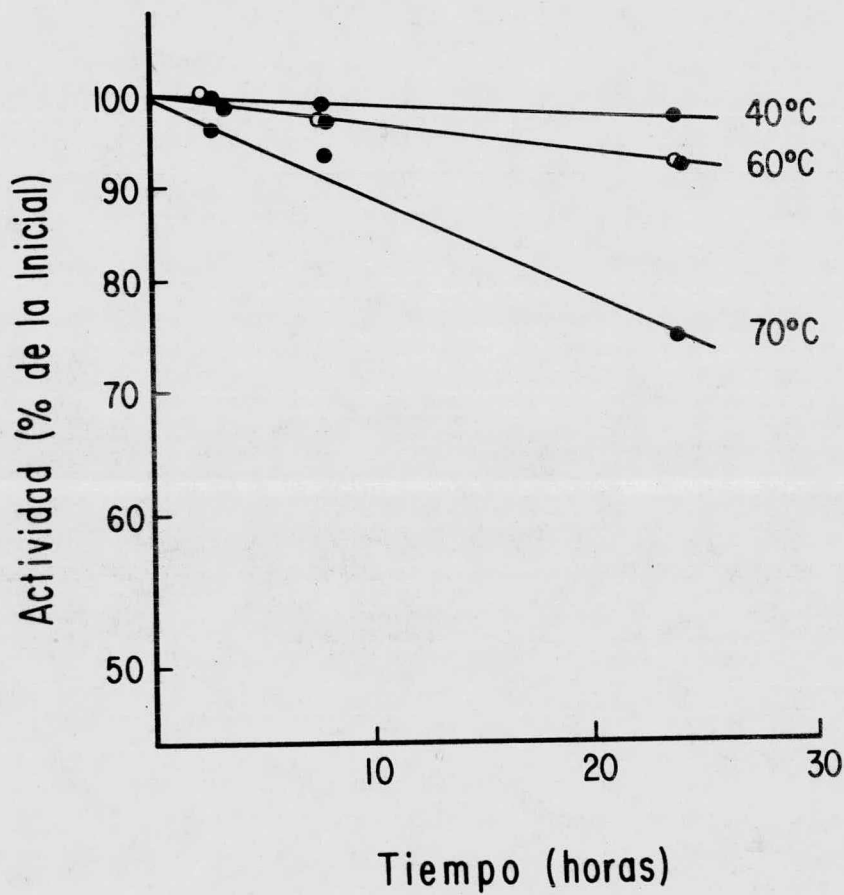


Figura 4. Estabilidad de la Glucosa Isomerasa a la --
Temperatura en presencia de Mg^{++} 0.01M. A
diferentes tiempos se obtuvieron muestras -
en las que se determinó actividad de acuer-
do a lo descrito en Materiales y Métodos.
Enzima soluble (○); Enzima inmovilizada --
(●).

Producción continua de D-Fructosa

Del complejo insoluble DEAE-Celulosa-Glucosa Isomerasa se tomaron 200 mg en base al peso seco del soporte, y fueron colocados dentro de una columna de 1.6 X 20 cm a 65°C, pasándole el sustrato por la parte superior y -- manteniendo una velocidad de flujo de salida de 10 ml/hora. El efluente fue colectado en tubos de ensaye que -- contenían 5 ml de HClO_4 0.1 M, ésto fue con el objeto de inactivar la enzima que se estuviera desorbiendo del soporte y que pudiera alterar los resultados de las conversiones reales. De estas fracciones se hicieron las diluciones apropiadas para la determinación de la D-fructosa producida durante el proceso.

Como se muestra en la Figura 5, a medida que transcurrió el tiempo de operación, la actividad fue disminuyendo con respecto a la inicial, encontrándose que a las 20 horas de reacción sólo se contaba con el 50% de la actividad, al término de la reacción sólo se recuperó el 13% de la proteína inmovilizada original, lo cual indicó que la pérdida de actividad era debida principalmente a desorción inespecífica de la proteína.

Como se mencionó anteriormente una posibilidad de mejorar la estabilidad operacional de las columnas, sería -

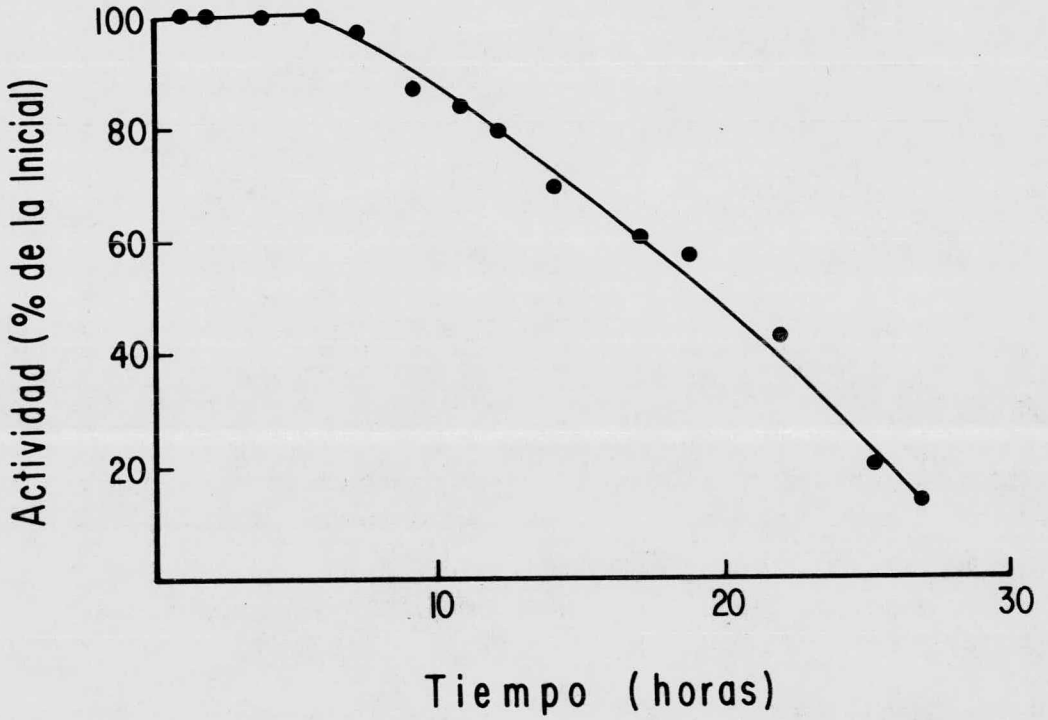


Figura 5. Conversión continua de D-Glucosa a D-Fructosa
200 mg de Glucosa Isomerasa-DEAE-Celulosa fue
ron colocados en una columna mantenida a una
temperatura de 65°C, y se les pasó una solu---
ción de Glucosa 1.0M a pH 6.8, conteniendo --
Mg⁺⁺ 0.005M y Co⁺⁺ 0.001M, a una velocidad de
flujo de 10ml/hora. La conversión inicial --
fue del 41%.

entrecruzando la enzima con un reactivo bifuncional después de la inmovilización. El reactivo bifuncional más empleado para el entrecruzamiento de proteína ha sido el glutaraldehído. Este compuesto reacciona con los ϵ amino de la lisina, dando como resultado la formación de un enlace imino (Monsan et al., 1976).

Los derivados enzimáticos insolubles en agua, preparados por adsorción de la enzima a soportes de intercambio iónico y seguido por entrecruzamiento de las moléculas de proteína con un reactivo bifuncional, tendrían la ventaja de que las moléculas formarían una monocapa en la superficie de las partículas del soporte que daría como resultado una mayor estabilidad operacional de las columnas. Sin embargo, para usar un reactivo de este tipo es requisito indispensable el que no inactive a la enzima inmovilizada; también es importante considerar que para obtener una monocapa estable es necesario que el soporte se encuentre saturado con moléculas de proteína antes del entrecruzamiento. Por ser el glutaraldehído un reactivo simple de fácil manejo y muy utilizado en el entrecruzamiento de proteínas, se decidió emplearlo para el entrecruzamiento de la Glucosa Isomerasa después de su inmovilización a DEAE-Celulosa.

Una vez que se contaba con las condiciones de saturación del soporte requeridas, se investigó (el efecto del glutaraldehído sobre la retención de la proteína al sopor

te y sobre la actividad inmovilizada.

Se probaron diferentes concentraciones de glutaraldehído; inicialmente fueron de 0.006%, 0.033% y 0.16%. En la Figura 6, se puede ver que con la menor concentración de glutaraldehído se pierde el 65% de la actividad inicial y además, al tratar este complejo con NaCl 1M, se desorbe aproximadamente el 99% de la proteína inmovilizada. A medida que va aumentando la concentración de glutaraldehído, la pérdida de actividad es menor, al mismo tiempo la desorción de la proteína disminuyó cuando se trató el derivado con NaCl 1.0M.

Cuando se utilizó una concentración de glutaraldehído de 0.166%, la actividad con respecto a la enzima inmovilizada fue de un 78%, pero comparando con la enzima soluble la actividad siguió siendo mayor en un 24% y se retuvo el 22.8% de la proteína aún después de desorber con NaCl 1.0M (Tabla IV). Al aumentar la concentración de glutaraldehído al 0.25% se encontro que el porcentaje de desorción de la proteína fue solo del 10%, y la actividad, aunque también disminuyó como cuando se empleó Glutaraldehído al 0.166%, siguió siendo mayor que la actividad de la enzima soluble. En base a estos resultados se decidió emplear esta concentración de glutaraldehído para el entrecruzamiento de la enzima inmovilizada que sería utilizada en el proceso contínuo.

En la Figura 7 se muestra una gráfica de actividad

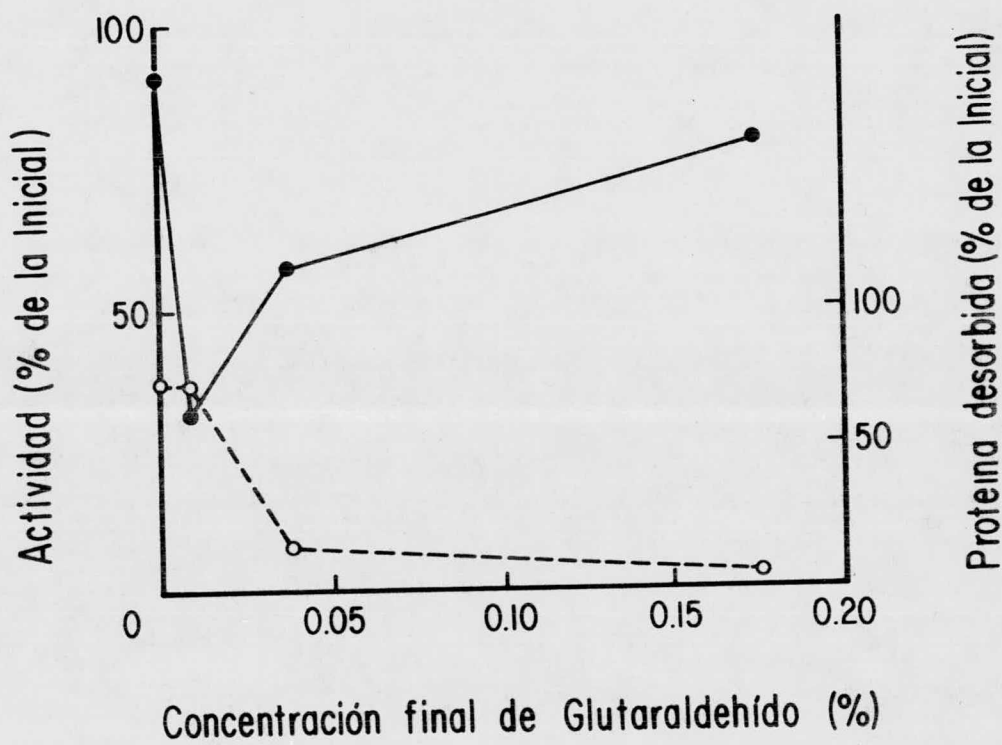


Figura 6. Efecto del glutaraldehído sobre la actividad de la Glucosa Isomerasa Inmovilizada. El entrecruzamiento con glutaraldehído se llevó a cabo según lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad se determinó en reactor en lote después de lavar el exceso de glutaraldehído. La proteína fue determinada por el método de Lowry et al., después de desorber con NaCl 1.0M.

Actividad (●) Proteína desorbida (○)

TABLA IV

ACTIVIDAD DE GLUCOSA ISOMERASA INMOVILIZADA Y ENTRECruzADA
CON GLUTARALDEHIDO.

Glutaraldehído (%)	Actividad total ^a (unidades /g Sop)	Actividad después de Entrecruzamiento	Proteína inmovilizada ^c (mg/g sop.)	Proteína desorbida ^c (mg/g soporte) (%)
0.00	2393	100 (158) ^b	107	107 100
0.166	1877	78 (124)	107	24.4 22.8

a 1 unidad = 1 μmol de D-fructosa \times min^{-1}

b Actividad con respecto a la enzima soluble

c Determinada después de desorber con NaCl 1.0 M

con respecto al tiempo de la enzima inmovilizada y entre cruzada y la de la enzima inmovilizada sin entrecruzar. Puede verse que ^{Empero} el derivado después de entrecruzar presenta una disminución mayor de la actividad, y a las 170 horas de operación, se tiene menos del 5% de la actividad inicial. Es importante mencionar que el derivado entrecruzado mostro una buena actividad al ser medido en reactor en lote, por lo que se pensó que este efecto podría deberse a un exceso de grupos aldehído libres, los cuales al estar en contacto las partículas de DEAE-Celulosa-Glucosa-Isomerasa dentro de la columna, producirían un entrecruzamiento entre las partículas, favorecido por la temperatura de 65°C que se utilizó. Esto daría como consecuencia una pérdida mayor de la actividad debida -- probablemente a desnaturalización de la enzima y a limitaciones difusionales del sustrato y del producto.

Con el objeto de neutralizar dichos grupos aldehído libres y aumentar la estabilidad operacional del derivado insoluble, se utilizaron soluciones de glicina 0.1, ^{-0.3M} 0.2 y 0.3 M, las conversiones iniciales para los derivados fueron con Glicina 0.1M, 45%; Glicina 0.2M, 34.2% y Glicina 0.3M, 43.6%, sin embargo en proceso contínuo, su estabilidad operacional fue prácticamente igual entre sí, como puede verse en la Figura 8, dicha estabilidad operacional comparada con la del derivado entrecruzado mejoró en forma notable, ya que en este último a -

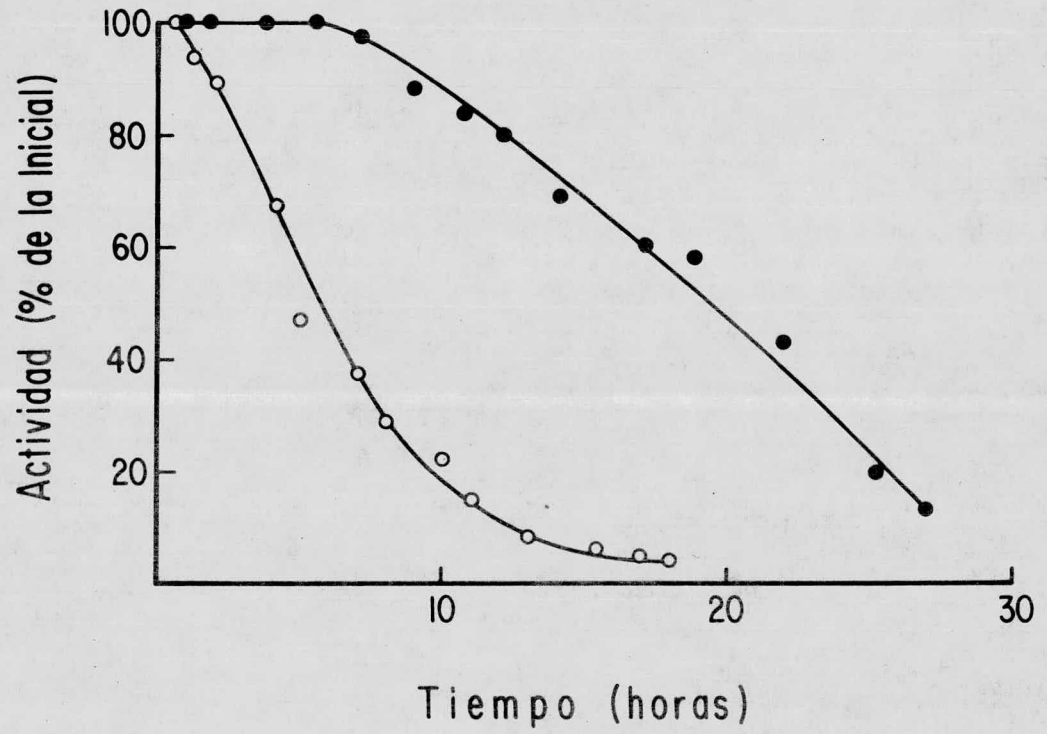


Figura 7. Conversión contfínua de D-Glucosa a D-Fructosa, por la Glucosa Isomerasa inmovilizada. En una columna a 65°C se colocaron 200 mg de la enzima inmovilizada entrecruzada con glutaraldehído o de enzima inmovilizada sin entrecruzar. - Se pasó una solución de Glucosa 1.0M, conteniendo Mg^{++} 0.005M, Co^{++} 0.001M, a una velocidad de flujo de 10 ml/hora. La conversión inicial para el derivado entrecruzado fue del 28.4%, - y para el no entrecruzado fue del 41%.

Glucosa Isomerasa inmovilizada y entrecruzada

(●) .

Glucosa Isomerasa inmovilizada no entrecruzada

(○) .

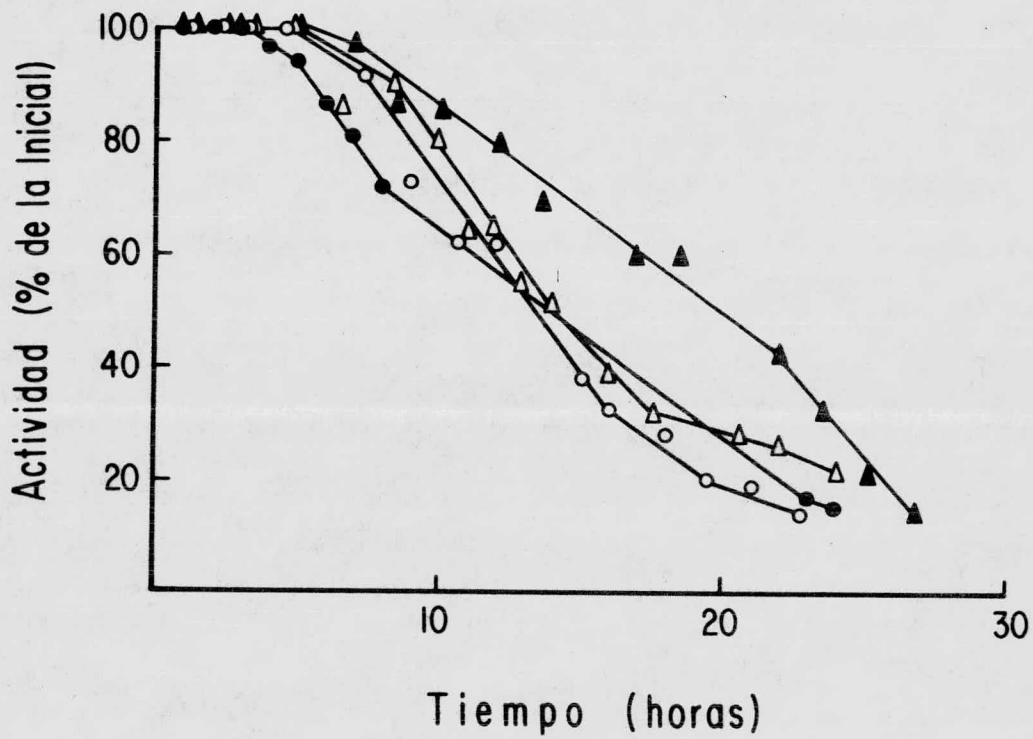




Figura 8. Conversión continua de D-Glucosa a D-Fructosa con Glucosa Isomerasa inmovilizada y entrecruzada con glutaraldehído.

Se emplearon 200 mg de derivado para las columnas, y se pasó una solución de Glucosa 1.0M a pH 6.8 que contenía Mg^{++} 0.005M, Co^{++} 0.001M, a una velocidad de flujo de 10 ml/hora. Temperatura 65°C. Las contracciones de Glicina - empleadas fueron de 0.1M, 0.2M y 0.3M, siendo las conversiones iniciales de 45%, 34.2% y -- 43% respectivamente.

Sin Glicina (▲); Glicina 0.1M (●);

Glicina 0.2M (○); Glicina 0.3M (△).

las 12 horas sólo había aproximadamente el 10% de la actividad inicial en cambio en los derivados tratados con glicina, se tenía en promedio el 60% de la actividad inicial. A pesar de este aumento en la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada, estos derivados tratados con glicina no mostraron una estabilidad operacional mayor a la obtenida cuando se utilizó la enzima inmovilizada pero no entrecruzada.

En base a estos resultados y a que el entrecruzamiento haría difícil la reutilización del soporte, se ha tratado de mejorar la estabilidad operacional de las columnas a través de optimizar la utilización del derivado insoluble no entrecruzado en operación continua. Durante los estudios del proceso continuo descritos anteriormente se observó que las columnas con igual diámetro pero mayor longitud retienen su actividad durante mayor tiempo, es decir, por ejemplo cuando se probó una columna de 200 mg de derivado (1.6 cm X 1.5 cm de longitud), a las 20 horas se había perdido el 50% de la actividad inicial; en cambio, cuando se utilizó una columna de 500 mg de derivado insoluble (1.6 cm X 3.0 cm de longitud), a las 20 horas se tiene aproximadamente el 80% de la actividad inicial, y hasta las 47 horas, se tiene el 50%. Al emplear una columna de 1000 mg de derivado (1.6 cm X 6.0 cm de longitud), a las 42 horas, se tiene el 100% de la actividad inicial, y a las 70 --

horas, sólo se ha perdido un 10% de la actividad. Tomando en cuenta estos resultados, se está buscando en el laboratorio la optimización de la utilización de la Glucosa Isomerasa inmovilizada a DEAE-Celulosa para la producción continua de jarabes con alto contenido de D-fructosa.

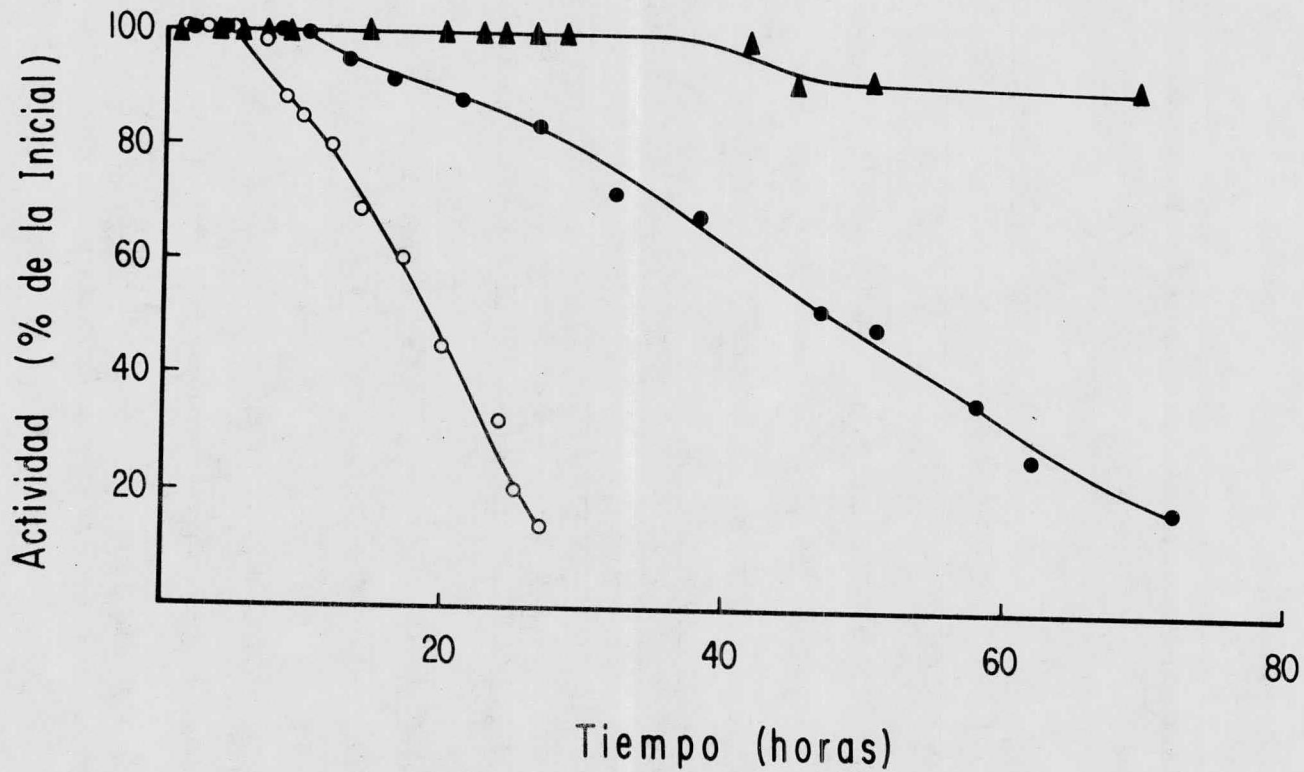


Figura 9. Conversión continua de D-Glucosa a D-Fructosa con Glucosa Isomerasa inmovilizada. Se tomaron 200 mg, 500 mg y 1000 mg de derivado insoluble que se colocaron en una columna a la que se le pasó una solución de D-Glucosa 1.0M, a pH 6.8 que contenía Mg^{++} 0.005M y Co^{++} 0.001M, a una velocidad de flujo de 10 ml/hora. Temperatura 65°C

200 mg (○); 500 mg (●); 1000 mg (▲).

Las conversiones iniciales fueron 41%, 45% y 45% respectivamente.

D I S C U S S I O N

D I S C U S I O N

La utilización práctica de las enzimas inmovilizadas en muchas industrias tiene aún un gran potencial de desarrollo. Sin embargo, su aplicación comercial depende de muchos factores, como son técnicos, económicos y socioculturales. Desde un punto de vista técnico, es muy importante el contar con sistemas enzimáticos inmovilizados muy activos, que presenten una adecuada estabilidad y que se utilicen eficientemente en reactores bioquímicos.

Por ser la Glucosa Isomerasa una de las enzimas que tienen un gran potencial práctico para un futuro cercano, es importante contar con preparaciones insolubles con mayor actividad por unidad de peso de soporte y que sean muy estables, ya que esto permitirá aumentar las perspectivas de utilización a gran escala de esta enzima en --- otros países. En este trabajo se analizó la preparación de Glucosa Isomerasa inmovilizada a DEAE-Celulosa (DE-52), el entrecruzamiento de la enzima después de haber sido adsorbida, y la utilización de estos derivados en la conversión continua de D-glucosa a D-fructosa.

En un trabajo anterior (Huitrón and Limón-Lason, -- 1978), se encontró que el soporte que retuvo mayor actividad por unidad de peso de soporte fue la DEAE-Celulosa

obteniéndose derivados con una actividad específica de 1 700 unidades/g de soporte, Sin embargo, utilizando DEAE-Celulosa (DE-52) como soporte, se encontraron derivados con una actividad de 2 700 unidades/g de soporte, lo cual representa un aumento en la actividad inmovilizada del 60% con respecto a la actividad del derivado insoluble de Glucosa Isomerasa-DEAE-Celulosa (DE-23), y un aumento del 100% con respecto a la enzima soluble. Este aumento en la actividad inmovilizada pudo haberse debido a que el tamaño de partícula de la DEAE-Celulosa (DE-52) es menor que la de la DEAE-Celulosa DE-23, por lo que la superficie de inmovilización es mayor en la (DE-52). El aumento de actividad por inmovilización con respecto a la soluble puede explicarse en términos de una adsorción preferente de la glucosa isomerasa en las condiciones de saturación del soporte y a una mayor estabilidad de la enzima por efectos del microambiente. Es posible que los dos fenómenos ocurran ya que la enzima desorbida siguió presentando un aumento del 72% sobre la actividad original.

La actividad máxima de este derivado fue superior a la preparaciones de Glucosa Isomerasa Inmovilizada reportadas hasta ahora, lo cual abre las posibilidades de seguir mejorando la obtención de derivados de Glucosa Isomerasa.

El valor de K_m aparente de la Glucosa isomerasa so-

luble fue ligeramente mayor de 0.09 M reportado para la enzima purificada de Bacillus coagulans (Danno, 1970), -- sin embargo el valor de Km aparente obtenido fue menor de 0.4 M reportado para la enzima de Streptomyces sp. (Chou et al., 1976). El Km aparente de la Glucosa Isomerasa inmovilizada se mantuvo prácticamente igual al Km de la enzima soluble, a diferencia de los valores reportados para la enzima inmovilizada a DEAE-Celulosa (DE-23) (Huitrón and Limón-Lason, 1978), que fue de $2.5 \times 10^{-1} M$, este valor es ligeramente mayor que el de la enzima soluble aunque este fue determinado a una concentración de Mg^{++} de 0.01M. Sin embargo, se han reportado valores muy altos de Km aparente para Glucosa Isomerasa inmovilizada como es el caso de células rotas e inmovilizadas de Bacillus coagulans, (Poulsen and Zittan, 1975), que es de 2.25 M, valor que refleja entre otros factores, limitaciones difusionales tanto de sustrato como de producto.

Se ha observado, que el Km aparente para las enzimas inmovilizadas puede aumentar, disminuir o mantenerse igual. Cuando el sustrato y el acarreador tienen carga neta opuesta, el Km aparente de la enzima inmovilizada puede ser menor que el Km aparente de la enzima soluble especialmente a baja fuerza iónica (Hornby et al., 1968). Se han observado aumentos en los valores de Km aparente para la malato deshidrogenasa adsorbida en sílica-gel (Tveritina et al., 1972), glucoamilasa inmovilizada a carbón activado -

(Usami and Shrisaki, 1970); amino acilasa a DEAE-Sephadex (Tosa et al., 1969) y aminoacilasa en DEAE-Celulosa (Tosa et al., 1967).

El pH óptimo obtenido para la enzima soluble fue de 7.2 (Huitrón and Limón-Lason, 1978). El pH óptimo de la Glucosa Isomeras inmovilizada, se desplazó ligeramente hacia el rango de acidez en comparación a la enzima soluble, el valor obtenido para la enzima inmovilizada en DEAE-Celulosa (DE-52) fue igual que para la Glucosa Isomerasa inmovilizada en DEAE-Celulosa (DE-23) (Huitrón and Limón-Lason, 1978). Se ha reportado que un sistema de células lisadas e inmovilizadas de Bacillus coagulans, el valor de pH óptimo se desplazó hacia alcalinidad, de un valor de 7.0 a 8.5. El efecto de desplazamiento del pH hacia la acidez también se ha reportado para otras enzimas inmovilizadas por adsorción a DEAE-Celulosa, como la amino acilasa (Tosa et al., 1967), ATP desaminasa (Chung et al., 1968), y para la invertasa (Suzuki et al., 1966).

Todas las enzimas muestran un pH óptimo, cuando se encuentran en forma inmovilizada su pH óptimo puede desplazarse ya sea hacia alcalinidad o hacia acidez. Este efecto es aparente y se ha explicado por la diferencia en el campo electrostático de las moléculas de enzima y las moléculas de agua del medio producido por la carga positiva del soporte (Katchalski et al., 1971).

Goldstein (1970) encontró que este fenómeno era el resultado de una distribución desigual de iones hidrógeno, -- iones oxidrilo y sustrato cargado. La concentración local de iones hidrógeno en el dominio del acarreador cargado es dependiente de la carga del acarreador, si el soporte está cargado negativamente, habrá una acumulación de iones hidrógeno sobre la superficie del acarreador. Si el acarreador tiene mayor número de cargas positivas que el resto de la solución, se acumularán iones oxidrilo sobre la superficie del soporte; por lo tanto, el pH en la superficie del soporte donde la enzima se encuentre localizada será mayor o menor que el resto de la solución, creando un desplazamiento aparente del perfil de pH.

Se ha visto que la estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas por adsorción puede aumentar, disminuir o mantenerse igual que la de la enzima soluble. En nuestro caso a 60°C, durante tiempos largos, la estabilidad a la temperatura del derivado insoluble fue igual a la de la enzima soluble. Se probaron tres diferentes -- temperaturas para probar a la enzima inmovilizada, 40°C, 60°C y 70°C observándose que a 70°C se perdía la mayor actividad. Se ha encontrado un aumento de la estabilidad térmica para la fosfomonoestearasa adsorbida a CM-Celulosa (Gryszkiewicz, 1971), amino acilasa inmovilizada sobre DEAE-Sephadex, NAD pirofosforilasa sobre hidroxipapa-

tita (Traub et al., 1969), y amino acilasa sobre DEAE-Celulosa (Tosa et al., 1967). También hay casos en los -- que la estabilidad termina disminuyó como por ejemplo en el caso de la Glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa adsorbida en colodión (Goldman and Lenhoff, 1971). β -fructofurano sidasa en DEAE-Celulosa (Usami et al., 1971), leucina -- aminopeptidasa en gel de fosfato de calcio (Koelsh et al., 1970). En el caso de la ureasa adsorbida sobre caolinita, no se observó ningún cambio en su estabilidad a la temperatura con respecto a la enzima soluble (Sundaram and Crook, 1971).

El complejo insoluble DEAE-Celulosa-Glucosa Isomerasa operando en forma continua a 65°C mostró una pérdida de actividad con respecto al tiempo. Como se reportó anteriormente (Huitrón and Limón-Lason, 1978) al aumentar la concentración de Mg^{++} , la desorción de proteína también aumentó en el proceso continuo. En nuestro caso, -- también se observó que durante el proceso continuo la -- pérdida de actividad de la columna también se debió principalmente a desorción de la proteína del soporte, puesto que al final del proceso continuo se había perdido el 87% de la proteína inmovilizada.

Se ha reportado que diversos factores afectan la desorción de enzimas inmovilizadas. Por ejemplo la amino acilasa adsorbida a DEAE-Celulosa se desorbe considerablemente cuando se usan concentraciones de sustrato mayo

res 0.2 M (Tosa et al., 1966); también se puede incrementar la desorción por cambios en el pH como por ejemplo - en la papaína adsorbida en vidrio (Messing, 1970); por - cambios de fuerza iónica como la leucina amino peptidasa (Koelsch et al., 1970); por cambios de temperatura, como sucede con el complejo amiloglucosidasa-DEAE-Celulosa en el que hay desorción de proteína al elevarse la temperatura a más de 55°C (Solomon and Levin, 1974).

Se debe tener presente, que este método de inmovili zación es un proceso reversible, si las proteínas son in movilizadas únicamente por atracciones electrostáticas a soportes cargados, se tiene la tendencia de que estos -- conjugados se disocian al aumentar la fuerza iónica, variando el pH o la temperatura del medio, lo que resulta en una mayor pérdida de la actividad de la columna, así como de contaminación del producto. Aunque al principi-- pio resultaría claro intentar cambiar el tipo de inmovi-- zación por adsorción a uno más estable como es el cova-- lente, es conveniente considerar las ventajas que ofrece la desorción y que fueron discutidos previamente. Pensa-- mos que la mejor opción es la de conservar hasta donde - sea posible las características ventajosas del método de adsorción, pero disminuyendo sus desventajas. Una forma de incrementar la adsorción de la enzima a su soporte ha sido aumentando la carga de la proteína por modificación química. Por ejemplo se prepararon derivados polianióni

cos de enzimas acoplado covalentemente α -quimotripsina y tripsina a un copolímero soluble en agua de ácido acrílico y anhídrido maléico y adsorbido posteriormente a --DEAE-Celulosa o DEAE-Sephadex (Bessmertnaya and Antonov, 1975; Yarovaya et al., 1975), acoplamiento covalente de la amiloglucosidasa a un copolímero del ácido etilénico y maléico y posteriormente se adsorbió a DEAE-Celulosa y DEAE-Sephadex para dar complejos más estables en proceso contínuo (Solomon and Levin, 1974). En nuestro trabajo se ha intentado incrementar la retención de la Glucosa - Isomerasa a DEAE-Celulosa por medio del entrecruzamiento de la proteína después de haber sido inmovilizada. De hecho se ha reportado la obtención de un aumento de la estabilidad operacional de la enzima lactasa por entrecruzamiento con glutaraldehído después de su adsorción a alúmina (Charles et al., 1975).

El reactivo que más se ha empleado para la insolubilización de proteínas solubles por entrecruzamiento ha sido el glutaraldehído, el cual se ha empleado para inmovilizar papaína (Jansen and Olson, 1969), Quimotripsina (Jansen et al., 1971), Catalasa (Ferrier et al., 1972), Fructosa 1, 6, difosfatasa (Aloyo et al., 1972), Tripsina (Beaven and Gratxer, 1973), así como para la insolubilización de otras proteínas solubles.

Se ha visto que un buen resultado de este proceso de entrecruzamiento depende tanto de la concentración de

proteína como de la concentración de glutaraldehído para favorecer el entrecruzamiento intermolecular. En nuestro caso, cuando probamos bajas concentraciones de glutaraldehído la retención de la proteína del soporte fue prácticamente igual que la de un derivado sin entrecruzar al tratar el derivado insoluble con cloruro de sodio, además la pérdida de actividad fue mayor. A medida que se aumentó la concentración de glutaraldehído, fue aumentando la retención de la proteína, hasta que se llegó a una concentración de glutaraldehído en la que la retención de proteína fue del 90%, aún después de tratar al derivado con cloruro de sodio, y la actividad se conservó en un elevado porcentaje.

Cuando el derivado tratado con glutaraldehído se sometió a proceso contínuo, la pérdida de actividad fue mucho más rápida en comparación con la enzima sin entrecruzar, en este caso la pérdida no se debió a pérdida de la proteína como en el caso del derivado sin entrecruzar sino a desnaturalización de la enzima.

Se pudo comprobar que había sucedido un entrecruzamiento entre los grupos aldehído libres de las partículas insolubles, ya que al tratar el derivado entrecruzado con glicina, la actividad del complejo insoluble fue recuperada cuando se utilizó en proceso contínuo. Sin embargo, la estabilidad operacional de este derivado no superó a la de la enzima inmovilizada sin entrecruzar. En base a

proteína como de la concentración de glutaraldehído para favorecer el entrecruzamiento intermolecular. En nuestro caso, cuando probamos bajas concentraciones de glutaraldehído la retención de la proteína del soporte fue prácticamente igual que la de un derivado sin entrecruzar al tratar el derivado insoluble con cloruro de sodio, además la pérdida de actividad fue mayor. A medida que se aumentó la concentración de glutaraldehído, fue aumentando la retención de la proteína, hasta que se llegó a una concentración de glutaraldehído en la que la retención de proteína fue del 90%, aún después de tratar al derivado con cloruro de sodio, y la actividad se conservó en un elevado porcentaje.

Cuando el derivado tratado con glutaraldehído se sometió a proceso continuo, la pérdida de actividad fue mucho más rápida en comparación con la enzima sin entrecruzar, en este caso la pérdida no se debió a pérdida de la proteína como en el caso del derivado sin entrecruzar sino a desnaturalización de la enzima.

Se pudo comprobar que había sucedido un entrecruzamiento entre los grupos aldehído libres de las partículas insolubles, ya que al tratar el derivado entrecruzado con glicina, la actividad del complejo insoluble fue recuperada cuando se utilizó en proceso continuo. Sin embargo, la estabilidad operacional de este derivado no superó a la de la enzima inmovilizada sin entrecruzar. En base a

estos resultados y debido a que entrecruzando con glutaraldehído se pierde actividad y a que en estas condiciones se ve más difícil la reutilización del soporte, pensamos que el entrecruzamiento ofrece pocas oportunidades de mejorarse. De tal forma que para hacer más eficiente la conversión de D-glucosa a D-fructosa, deberá buscarse una optimización mayor de la Glucosa Isomerasa inmovilizada sin entrecruzar.

Durante la realización de este trabajo, se encontró que había una desorción más lenta de la enzima en operación continua cuando aumentaba la longitud del lecho de enzima inmovilizada. El tiempo que se mantuvo la actividad al 100% fue muy distinto, puesto que con 200 mg, fue de 5 horas, con 500 mg fue de 10 horas y con 1000 mg fue de 42 horas aproximadamente. El hecho de que este aumento no sea proporcional de acuerdo al aumento en longitud de la columna, podría explicarse tomando en cuenta que el grado de desorción de la enzima sigue siendo el mismo, sin embargo, al ser una columna de mayor longitud, se retarda la velocidad de salida de ésta, y así la pérdida de actividad por desorción es más lenta y por consiguiente se conserva más tiempo la enzima dentro del reactor.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos ya se ha iniciado en el grupo un trabajo sobre el desarrollo de una ecuación de diseño que tome en cuenta los factores que afectan la actividad de la columna como son, la exis

tencia de limitación difusional, el K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima inmovilizada, la concentración de sustrato en el equilibrio, la conversión del producto que se desea obtener, la velocidad de flujo y la geometría de la columna.

Como conclusión de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos decir que el método de adsorción descrito presenta una serie de ventajas sobre otros métodos de inmovilización de enzimas, ya que obtuvimos de la inmovilización de la Glucosa Isomerasa de Bacillus coagulans a DEAE-Celulosa DE-52 una actividad del derivado de 2726 unidades/g de soporte equivalentes a un 52% más actividad con respecto a la enzima soluble. A pesar de que existen una serie de métodos de inmovilización de la Glucosa Isomerasa reportados o patentados, la mayoría no son adecuados para ser utilizados a nivel industrial. Solo el caso de la Glucosa Isomerasa de Streptomyces phaeochromogenes adsorbida a DEAE-Celulosa, se utiliza a nivel industrial, lo cual ahora nos lo podemos explicar en base a las características ventajosas de este método descritas por Huitrón y Limón-Lason (1978) así como las de este trabajo. Aunque la preparación insoluble de la Glucosa Isomerasa de Streptomyces phaeochromogenes se encuentra actualmente explotándose comercialmente, no quiere decir que se hayan agotado las posibilidades de obtener mejores derivados insolubles, utilizando otras fuentes de enzima, otros soportes, así como formas distintas de -

utilización.

Las características de los derivados insolubles de Bacillus coagulans obtenidos en el presente trabajo, apoyan esta idea. Sin embargo, la repercusión industrial de las ventajas que encontramos requieren ser evaluadas en la producción de jarabes ricos en D-fructosa a gran escala.

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Aloyo, V.J., A.M. Geller, C.J. Marcus and W. L. -
Byrne. Biochem. Biophys. Acta, 289, 242.
- 2.- Bachler, M.J., G.W. Strandberg, K.L. Smiley. - -
Biotech. Bioeng., 12, 85 (1970)
- 3.- Bar-Eli, A. and E. Katchalski. J. Biol. Chem., -
238, 1690 (1963).
- 4.- Bartling, G.J., H.D. Brown, L.J. Forrester, M.T.
Koes, A.M. Mather and R.O. Stasiw. Biotech. Bioeng.,
14, 1039 (1972)
- 5.- Baum, G. and M. Lynn. Process Biochem., March (1975).
- 6.- Beaven, G.H. and W.B. Gratzer. Int. J. Peptide Prot.
Res. 5, 215 (1973).
- 7.- Bergmeyer, H.U. and G. Michal. Industrial Aspects of
Biochem., (1974).
- 8.- Bernfeld, P. and J.Wan, Science 142, 678 (1963).
- 9.- Bernfeld, P. and R. E. Bieber. Arch. Biochem. Biophys.,
131, 587 (1969).
- 10.- Bessmertnaya, L.Y. and V.K. Antonov. Chem. Abstr. -
83, 366w (1975)

- 11.- Bishop, W.H., F.A. Quicho and E. Shaw. *Biochem.*, 8, 4941 (1969).
- 12.- Broun, G., E. Selegny, S. Avrameas, D. Thomas, - *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 260 (1969).
- 13.- Broun, G., D. Thomas, G. Gellf, D. Domurado, A.M. Berjonneau and C. Guillon. *Biotech. and Bioeng.* - 15, 359 (1973).
- 14.- Brown, H.D., A.B. Patel and S.K. Chattopadthyay. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2, 231 (1968).
- 15.- Butler, L. G. *Arch. Biochem. and Biophysics*, 171, 645 (1975).
- 16.- Chang, T.M.S. *Science*, 146, 524 (1964).
- 17.- Chang, T.M.S. *Sci. J.*, 3, 62 (1967).
- 18.- Chang, T.M.S. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 44, 1531 (1971).
- 19.- Chang, T.M.S., L.J. Johnson and O.J. Ransome. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 44, 115 (1966).
- 20.- Chang, T.M.S., L.J. Johnson and O.J. Ransome. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 45, 705 (1966).
- 21.- Chang, T.M.S. and M.J. Poznansky. *Nature*, 218, 242 (1968).
- 22.- Charles, M., R.W. Coughlin, E. K. Paruchuri, B.R. Allen and F.X. Hasselberger. *Biotech. Bioeng.* 17, 203 (1975).

- 23.- Chibata, I., T. Tosa, T. Sato, T. Mori and Y. -- Matsuo, en Ferment. Technol. Today, G. Terui ed., Soc. Ferment. Technol., Japan (1972).
- 24.- Chou, C.C., M.R. Ladisch and G. T. Tsao. Appl. - Environm. Microbiol., 32, 489 (1976).
- 25.- Chung, S.T., M. Hamano, K. Aida and T. Vemura. - Agr. Biol. Chem., 32, 1287 (1968).
- 26.- Danno, G. Agr. Biol. Chem., 31, 284 (1967).
- 27.- Danno, G. Agr. Biol. Chem., 34, 1795 (1970).
- 28.- Dickerson, R.E. and I. Geis "The Structure and - Action of Proteins". Harper and Row Publishers., New York (1969).
- 29.- Dische, Z. and E. Borenfreund. J. Biol. Chem., - 192, 583 (1951).
- 30.- Ferrier, L. K., T. Richardson and N. F. Olson. - Enzymologia, 12, 273 (1972).
- 31.- Fukushi, T. and T. Isemura. J. Biochem., 64, 283 (1968).
- 32.- Giovenco, S., F. Morisi and P. Pansolli. FEBS - - Letters, 36, 57 (1973).
- 33.- Gol'dfel'd, M.G., E.S. Vorobleva and O.M. Poltorak. Chem. Abstr. 66, 16713 (1967).
- 34.- Goldman, R., O. Keden, H. I. Silman, S.R. Caplan and E. Katchalski, Biochem. 1, 486 (1968).

- 35.- Goldman, R., O. Kdem, and E. Katchalski. *Biochem.* 10, 165 (1971).
- 36.- Goldman, R. and H.M. Lenhoff. *Biochim. Biophys. Acta.*, 242, 514 (1971).
- 37.- Goldstein, L. en *Ferment. Adv.*, D. Perlman, ed. Acad. Press, New York (1969).
- 38.- Goldstein, L., M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlas and Y. Levin. *Biochem.*, 9, 2322 (1970).
- 39.- Green, M. L. and G. Crutchfield. *Biochem. J.*, - 115, 183 (1969).
- 40.- Gryszkiewicz, J., E. Dziembor and W. Ostrowski. *Chem. Abstr.* 74, 38576h (1971).
- 41.- Habeeb, A.F. *Arch. Biochem. Biophys.*, 119, 264 (1967).
- 42.- Hamilton, B.J., C.K. Colton and C. Cooney, en - *Food and Microbiol Processes*, 71, Ed. A. C. Olson and C.L. Cooney, Plenum Press. (1974).
- 43.- Havewala, N.B. and W.H. Pitcher in *Enzyme Engineering*, 2, 315, E.K. Pye and L.B. Wingard, Plenum Press, -- New York (1974).
- 44.- Haynes, R. and K.A. Walsh. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36, 235 (1969).
- 45.- Hopwood, D. *Histochem. J.*, 4, 267 (1972).

- 46.- Hornby, W.E., M. D. Lilly and E.M. Crook. *Biochem. J.*, 107, 669 (1968).
- 47.- Hucho, F., H. Mullner and H. Sund. *Eur. J. - - - Biochem.*, 59, 79 (1975).
- 48.- Huitrón C., and J. Limón-Lason. *Biotech. and - - - Bioeng.*, en prensa (1978).
- 49.- Ikimura, M. *J. Agr. Biol. Chem. Soc.*, 39, 8 (1965).
- 50.- Inman, J.K. and H.M. Dintzis. *Biochem.*, 8, 4074 - - - (1969).
- 51.- Jacob, F. and J. Monod. *J. Mol. Biol.*, 3, 318 (1961).
- 52.- Jansen, E.F. and A.C. Olson. *Arch. of Bioch. and Biophys.*, 129, 221 (1969).
- 53.- Jansen, E.F., Y. Tomimatsu and A.C. Olson *Arch. of Bioch. and Biophys.*, 144, 394 (1971).
- 54.- Josephs, R.H., H. Eisenberg and E. Reisler. - - - *Biochem.*, 12, 4060 (1973).
- 55.- Kasumi, T., K. Kawashima and N. Tsumura. *J. Ferm. Technol.*, 52, 321 (1974).
- 56.- Koelsch, R., J. Lasch and H. Henson. *Acta Biol. - Med. Ger.*, 24, 833 (1970).
- 57.- Kolorik, M.J., B.J. Chen, A.H. Emery and H.C. Lim en *Immobilized Enzymes in Food and Microbiol - - - Processes*, 71, Ed. por A.C. Olson and C.L. Cooney, Plenum Press. (1974).

- 58.- Koshland, D.E. *Sci. Am.*, 229, 52 (1973).
- 59.- Kostner, A. and M. Kreen. *Enz. Tech. Today* 2, --
121 (1974).
- 60.- Langmuir, I. and V.J. Shaefer. *J. Am. Chem. Soc.*,
60, 1351 (1938).
- 61.- Lehninger, A.L. "Biochemistry" Worth Publishers.,
Inc., New York (1970).
- 62.- Levin, Y. and E. Katchalski. *Biochem. Prep.*, 12,
21 (1968).
- 63.- Leinhard, G.E. *Science*, 180, 149 (1973).
- 64.- Lilly, M.D. and P. Dunnill. *Sci. J.*, April (1969).
- 65.- Lilly, M.D., G. Kay, R.J.H. Wilson and A.K. Sharp.
Chem. Abstr. 72, 118062 (1970).
- 66.- Linko, Y., L. Pohjola, R. Viskari and M. Linko.
FEBS Letters 62, 77 (1976).
- 67.- Liu, C.C., E.J. Lahoda, R.T. Galasco and L.B. - -
Wingard. *Biotech. Bioeng.*, 17, 1695 (1975).
- 68.- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, N.J. Farr and R. J.
Randall. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 69.- Maeda, H. and H. Suzuki. *Agr. Biol. Chem.* 36, 1581
(1972).
- 70.- Manecke, G. *Pure Appl. Chem.*, 4, 507 (1962).

- 71.- Marshall, R.O. and E.R. Kooi. Science, 125, 648 (1957).
- 72.- Melrose, G.J.H. Rev. Pure and App. Chem., 21, - 83 (1971).
- 73.- Messing, R.A. Enzymologia, 38, 39 (1970).
- 74.- Messing, R.A. Res. Development, 25, 32 (1975).
- 75.- Micheel, V.F. and J. Ewers. Makromol, Chem., 3, 200 (1949).
- 76.- Mitz, M.A. Science, 123, 1076 (1956).
- 77.- Mitz, M.A. and R.J. Schlueter. J. Am. Chem. Soc., 81, 4024 (1959).
- 78.- Monod, J., P. Changeux and F. Jacob. J. Mol. Biol., 6, 306 (1963).
- 79.- Monod, J., J. Wyman and J.P. Changeux, J.Mol. Biol., 12, 88 (1965).
- 32 80.- Monsan, P., G. Puzo and H. Mazarguil en Analysis and Control of Immobilized Enzymes Systems, D. - Thomas and J.P. Kernevez, eds. Netherlands (1976).
- 81.- Mosbach, K., H. Gilford, P.O. Larsson, R. Ohlson and M. Scott. Biochim. J., 125, 20 (1971).
- 82.- Nataka, M.J. Agr. Biol. Chem., 30, 887 (1966).
- 83.- Nataka, M. and S. Yoshimura. J. Agr. Biol. Chem., 27, 342 (1963)

- 84.- Nataka, M. and S. Yoshimura. J. Agr. Biol. Chem., 28, 505 (1964).
- 85.- Ozawa, H. J. Biochem., 62, 419 (1967).
- 86.- Patel, A.B., S.N. Pennington and H.D. Brown. - - Biochim. Biophys. Acta, 178, 626 (1969).
- 87.- Pennington, S.N., H.D. Brown, A.B. Patel and S.K. Chattopadhyay. J. Biomed. Mater. Res., 2, 443 - (1968).
- 88.- Pennington, S.N., H.D. Brown, A.B. Patel and C.O. Knowles. Biochim. Biophys. Acta, 167, 479 (1968).
- 89.- Poulsen, P.B. and L. Zittan, Enzyme Engineering - Conference, Portland, Oregon, (1975).
- 90.- Ptashne, M. Nature, 214, 232 (1967).
- 91.- Pye, E.K. en Immobilized Enzymes in Food and - - Microbiol. Processes, A.C. Olson and C.L. Cooney, eds., Plenum Press, New York (1974).
- 92.- Quioco, F.A. and F.M. Richards. P.N.A.S., 52, 833 (1964).
- 93.- Quioco, F.A. and F.M. Richards. Biochem. 5, 4062 (1966).
- 94.- Riesel, E. and E. Katchalski. J. Biol. Chem., 239, 1521 (1964).
- 95.- Robinson, J.W. Food Eng., 47, 57 (1975).

- 96.- Sabatini, D.D. K. Bensch and R.J. Barnett. J. -
Cell Biol., 17, 19 (1963).
- 97.- Sánchez, S. and C. Quinto. Appl. Microbiol., 30,
750 (1975).
- 98.- Sato, T. and N. Tsumura. J. Ind. Chem. (Japan),
67, 683 (1964).
- 99.- Schnyder, B. Die Starke, 26, 409 (1974).
- 100.- Scheiter, A. and A. Bar-Eli. Arch. Biochem. - -
Biophys., 136, 325 (1970).
- 101.- Self, D.A., G. Kay and M.D. Lilly. Biotech. Bioeng.,
11, 337 (1969).
- 102.- Sharp, A.K., G. Kay and M.D. Lilly. Biotech. - - -
Bioeng., 11, 363 (1969).
- 103.- Shaw, E. en "The Enzymes", 3rd. ed., 1, 91, Acad.
Press, New York (1970).
- 104.- Silman, I.H. and E. Katchalski. Ann. Rev. Biochem.,
35, 873 (1966).
- 105.- Slein, M. W. en "Methods in Enzymology," 5, 347
(1962).
- 106.- Solomon, B. and Y. Levin. Biotech. Bioeng., 16, --
1161 (1974).
- 107.- Solomon, B. and Y. Levin. Biotech. Bioeng., 17, --
1323 (1975).

- 108.- Stanley, W.L., G.G. Watters, B. Chou and J.M. - -
Mercer. Biotech. Bioeng., 17, 315 (1975).
- 109.- Steiner, R.F. "The Chemical Foundations of Molecu
lar Biology", Van Nostrand Company, Inc., U.S.A.
(1966).
- 110.- Strandberg, G.W. and K.L. Smiley. Appl. Microbiol.,
21, 588 (1971).
- 111.- Strandberg, G.W. and K.L. Smiley. Biotech. Bioeng.,
14, 509 (1972).
- 112.- Sundaram, P.V. and E.M. Crook. Can. J. Biochem.,
49, 1388 (1971).
- 113.- Surinov, B.P. and S.E. Manoilov. Biokhim. (Engl. -
Trans.), 31, 337 (1966).
- 114.- Suzuki, H., Y. Ozowa and H. Maeda. Agr. Biol. Chem.,
30, 807 (1966).
- 115.- Takasaki, Y. and O. Tanabe. Agr. Biol. Chem., 28, -
710 (1961).
- 116.- Takasaki, Y. J. Agr. Biol. Chem. (Japan), 36, 1010
(1964).
- 117.- Takasaki, Y. J. Agr. Biol. Chem. (Japan), 30, 1247
(1966).
- 118.- Takasaki, Y. and O. Tanabe. Agr. Biol. Chem., 30,
220 (1966).

- 119.- Takasaki, Y., Y. Kosugi and A. Kanabayashi, Agr. Biol. Chem. 33, 1527 (1969).
- 120.- Thang, M.N., M. Graffe and M. Grunberg-Manago. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 1 (1968).
- 121.- Tosa, T., T. Mori, N. Fuse and I. Chibata Enzimologia, 32, 153 (1967).
- 122.- Tosa, T., T. Mori, N. Fuse and I. Chibata. Biotech. Bioeng., 9, 603 (1967).
- 123.- Tosa, T., T. Mori, N. Fuse and I. Chibata. Enzimologia, 31, 225 (1966).
- 124.- Tosa, T., T. Mori, N. Fuse and I. Chibata. Agr. - Biol. Chem., 33, 1047 (1969).
- 125.- Tosa, T., T. Mori and I. Chibata. Agr. Biol. Chem., 33, 1053 (1969)
- 126.- Traub, A., E. Kaufman and Y. Tietz. Anal. Biochem., 28, 469 (1969).
- 127.- Tsumura, N., M. Hagi and T. Sato. J. Agr. Biol. - - Chem., 31, 902 (1967).
- 128.- Tsumura, N. and M. Ishikawa. Nippon Shokohin K. G., 14, 539 (1967).
- 129.- Tsumura, N. and T. Sato. Agr. Biol. Chem., 25, 620 (1961).
- 130.- Tsumura, N. and T. Sato. J. Agr. Biol. Chem., 29, - 1129 (1965)

- 131.- Tverinova, E.A., N.I. Loboda, E.S. Chukhrai and -
O.M. Poltorak. Chem. Abstr. 76, 43455p. (1972).
- 132.- Usami, S., T. Yamada and A. Kimura. Chem. Abstr.,
68, 84499 (1968).
- 133.- Usami, S. and H. Shirasaki. Hakko Kogaky Zasshi,
48, 506 (1970).
- 134.- Usami, S., J. Noda and K. Gato. Hakko Kogaku - -
Zasshi, 49, 598 (1971).
- 135.- Vieth, W.R., S.S. Wang and R. Saini. Biotech. -
Bioeng., 15, 565 (1973).
- 136.- Visser, J. and M. Strating. FEBS Letters, 57, 183
(1975).
- 137.- Walsh, K.A., L.L. Huston and R.A. Kenner y en
"Structure Function Relationships of Proteolytic
Enzymes" (P. Desnuelle, H. Neurath and M. Ottensen,
eds.) Academic Pres, New York (1970).
- 138.- Weliky, N. and H.H. Weetall, Immunochemistry 2, --
293, (1965).
- 139.- Weetall, H.H. Science, 166, 615 (1969).
- 140.- Weetall, H.H. and L.S. Hersh. Biochim. Biophys. -
Acta 206, 54 (1970).
- 141.- Weetall, H.H. en Immobilized Biochemicals and - -
Affinity Chromatography. Ed. R. Bruce, Dunlap - -
(1974).

- 142.- Weetall, H.H. *Process Biochemistry*, July (1975).
- 143.- Wharton, C.W., E.M. Crook and K. Brocklehurst. - *Eur. J. Biochem.*, 6, 565 (1968).
- 144.- Wieland, T., H. Determann and K. Bunning. *Z. - - Naturforsch.*, 21B, 1003 (1966).
- 145.- Yamanaka, K. *J. Agr. Biol. Chem.*, 27, 265 (1963).
- 146.- Yamanaka, K. *J. Agr. Biol. Chem.*, 27, 271 (1963).
- 147.- Yamanaka, K. *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 670 - - (1968).
- 148.- Yarovaya, G.A., T.N. Gulyanskaya, V.L. Dotsenko, - L.Y. Bessmectnaya, L.V. Kozlov and V.K. Antonov. - *Chem. Abstr.* 83, 128206c (1975).
- 149.- Yoshimura, S., G. Danno and M. Nataka. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 1015 (1966).
- 150.- Zaborsky, O. "Immobilized Enzymes". CRC-Press, U.S.A. (1973).
- 151.- Zittan, L., P.B. Poulsen and S.H. Hemmingsen. *Die Starke*, 27, 236 (1975).