

24/10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTABILIDAD ENZIMATICA DE ALCOHOL OXIDASA EN FLUIDOS SUPERCRITICOS"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO
PRESENTA

FRANCISCO URBANO BARNES REGUEIRO



México, D.F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1994



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 está 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.

**A Casilda por mis mejores cuatro años**

**A mis abuelas y a la memoria de mis abuelos que han sido y fueron en todo momento, un ejemplo en mi vida**

**A mis papás, que ansiaban tanto este momento.**

**A mis hermanas y amigos**

**Quiero agradecer especialmente:**

**A Eduardo por haber actuado mas que como director de tesis como padre adoptivo.**

**A Santiago por su disposición y ayuda en todo momento.**

**A Pancho Rojo, Fanny, Angeles y Agustin por su apoyo.**

**A Mónica, Lupita, Sandra, Manuel, Blanca y Jorge por hacer de éste trabajo un agradable recuerdo.**

Este trabajo fué realizado con apoyo del programa PAPIIT de la DGAPA-UNAM, a través del proyecto IN302993.

## JURADO ASIGNADO:

Presidente: M. en C. Santiago Capella Vizcaino.  
Vocal: Dr. Eduardo Bárzana García.  
Secretario: Dr. Tomás Viveros García.  
1er Suplente: M. en C. Francisco Rojo Callejas.  
2do Suplente: M. en C. Jose Mariano García Garibay



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Alimentos y Biotecnología &  
Departamento de Química Analítica.  
Facultad de Química.  
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

Dr. Eduardo Bárzana García.

Supervisor técnico:

M. en C. Santiago Capella Vizcaino.

Sustentante:

Francisco Barnes Regueiro

## INDICE

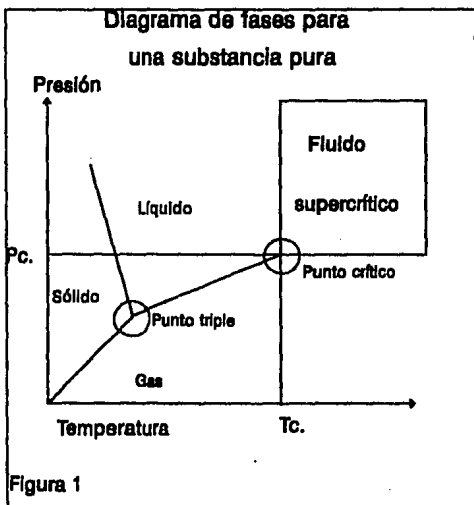
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	5
2.1 Enzimas como catalizadores.	5
2.2 Alcohol Oxidasa.	10
2.3 Biocatálisis en fluidos supercríticos.	11
2.4 Efecto de la presión en las enzimas.	15
2.5 Efecto del agua en las enzimas.	17
2.6 Efecto del CO <sub>2</sub> en las enzimas.	21
3. Objetivos.	23
4. Materiales y Métodos.	24
4.1 Lavado del soporte.	25
4.2 Inmovilización de la enzima Alcohol Oxidasa.	25
4.3 Determinación de la actividad en fase acuosa.	26
4.4 Evaluación del efecto de altas presiones en la estabilidad enzimática.	27
4.5 Evaluación del efecto del CO <sub>2</sub> en la estabilidad enzimática.	28
4.6 Incubación de la enzima soportada en CO <sub>2</sub> a condiciones supercríticas.	30
4.7 Estabilidad de la enzima con distintos niveles de hidratación en CO <sub>2</sub> SC	31
5. Resultados y Discusión.	33
5.1 Incubación de la enzima a altas presiones.	33
5.2 Efectos químicos y físicos del CO <sub>2</sub> en la actividad enzimática.	34

<b>5.3 Actividad enzimática en CO<sub>2</sub>SC.</b>	<b>36</b>
<b>5.4 Efecto del grado de hidratación en enzimas sometidas a CO<sub>2</sub>SC.</b>	<b>39</b>
<b>6. Conclusiones.</b>	<b>43</b>
<b>7. Recomendaciones.</b>	<b>45</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>47</b>



## 1. INTRODUCCION

Un medio supercrítico es aquel en el que un fluido se encuentra a temperatura y presiones por arriba de su punto crítico ( presión y temperatura más alta a la que puede existir una sustancia en equilibrio líquido · vapor) (Figura 1).



La atracción especial de los fluidos supercríticos (FSC) como solventes es que, en contraste con el comportamiento de gases y líquidos, sus propiedades físicas son muy sensibles a pequeñas variaciones en temperatura y/o presión. Debido a que el poder solvatante de un fluido es proporcional a su densidad, en el caso particular de un medio supercrítico la solubilidad de una sustancia no es solo función de las

interacciones solvente-soluto sino que también depende de manera importante de la presión y temperatura del sistema. Esta capacidad de solvatación ajustable con cambios de temperatura y presión, permite disponer de un solvente muy poderoso y ajustable a necesidades y problemas específicos.

Los fluidos supercríticos han sido objeto de numerosos estudios en la última década por sus promesas de uso extensivo en el sector químico y agroalimentario.

Su principal uso industrial se ha centrado en la extracción de productos naturales utilizando dióxido de carbono en condiciones supercríticas ( $\text{CO}_2$  SC) y como alternativa atractiva a los solventes orgánicos como el hexano o el cloruro de metileno. Esto es debido a la alta selectividad que presenta para remover compuestos de interés de mezclas multicomponentes, aunado a su bajo grado de reactividad, explosividad, toxicidad y a la fácil recuperación de productos por precipitación al despresurizar el sistema a condiciones ambientales.

Actualmente existen grandes plantas para la extracción de cafeína del café, para eliminación de desechos orgánicos del agua, para la extracción de aromas de sustancias naturales utilizadas en perfumería, para la extracción de lúpulo para cervecería, etc. (Johnston, 1989).

En la última década, el uso de los FSC se ha diversificado cada vez más. Así, se han empleado como fase móvil en cromatografía a altas presiones existiendo hoy en día equipos analíticos comerciales basados en su uso.

Más recientemente se ha trabajado intensamente en proyectos de investigación dirigidos a evaluar los FSC como medio de una variedad de reacciones, resultando especialmente atractiva la posibilidad de utilizarse como solventes para llevar a cabo reacciones biológicas basadas en la catálisis enzimática y como una extensión del potencial estimado para aplicaciones de la biocatálisis en solventes orgánicos.

La mayoría de las propiedades físicas de los FSC tienen valores intermedios entre aquellas de gases y líquidos (Tabla 1).

**Tabla 1 Cuadro comparativo de propiedades físicas**

Estado físico	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Coefficiente de Difusión (cm <sup>2</sup> /s)	Viscosidad (g/cm.s)	Tensión superficial (dinas/cm)
líquido	0.6-1.6	(0.2-2.0)x10 <sup>-5</sup>	(0.2-3.0)x10 <sup>-2</sup>	finito
FSC	0.2-0.9	(0.2-0.7)x10 <sup>-3</sup>	(1.0-9.0)x10 <sup>-4</sup>	0
gas	(0.6-2)x10 <sup>-3</sup>	0.1-0.4	(1.0-3.0)x10 <sup>-4</sup>	0

Se puede observar que los FSC presentan una densidad relativamente alta cercana a la de los líquidos, lo que les confiere un poder solvatante similar a éstos. Poseen una alta difusividad lo que les propociona una gran capacidad de penetración dentro del soluto, una baja tensión

superficial, que permite el mojado de poros más pequeños que aquellos accesibles a solventes líquidos y una baja viscosidad lo que permite niveles altos de transferencia de masa. Todo esto aunado a su capacidad de modificar su densidad con pequeños cambios en temperatura y presión los convierte en alternativas viables como medios de reacción.

En la Tabla 2 se presenta un ejemplo de la variedad de fluidos que pueden ser llevados a condiciones supercríticas y avala el potencial de manejo de éstos como medios solubilizantes en aplicaciones industriales.

## Propiedades críticas de algunas sustancias

Compuesto	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (atm)	Densidad crítica (g/cm <sup>3</sup> )
Amoníaco	132.4	112.5	0.235
Butano	152.0	37.5	0.228
Dióxido de Carbono	31.3	72.9	0.443
Etano	32.8	48.1	0.203
Etileno	9.2	48.7	0.218
Oxido de dinitrógeno	36.0	71.7	0.450
Pentano	196.6	37.5	0.232
Propano	96.6	41.8	0.217
Agua	374.2	217.8	0.322
Etanol	48.0	243.0	0.280
n-Hexano	68.2	234.0	0.280
Hexafluoruro de Azufre	148.0	37.1	0.740
Xenón	16.6	57.8	0.110
Freón (R13)	28.9	36.7	0.579
Fluorotorno	26.9	47.7	0.528

Tabla 2

## 2. ANTECEDENTES

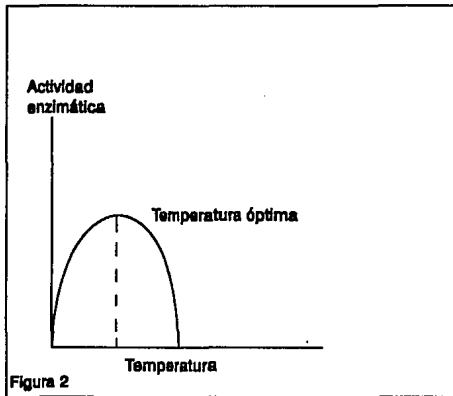
### 2.1 Enzimas como catalizadores

Las enzimas se definen como catalizadores biológicos de naturaleza proteica conformadas por una secuencia polimérica de aminoácidos. Pueden constar de solamente una cadena de proteína o de varias cadenas unidas no covalentemente y cumplen con todos los requisitos de la catálisis química: 1) aumentan la velocidad de las reacciones pero solo modifican reacciones termodinámicamente posibles (espontáneas); 2) no modifican el equilibrio de la reacción; y 3) sólo acortan el tiempo para alcanzar el equilibrio disminuyendo la energía de activación.

Toda reacción catalizada enzimáticamente tiene lugar en un sitio específico de la proteína conocido como sitio activo. Las enzimas poseen determinadas características que no son comunes a otros tipos de catalizadores:

**1) Sensibilidad especial a la temperatura.** Las estructuras secundarias y terciarias de la cadena de la proteína de la cual depende la actividad del sitio activo son resultado de fuerzas débiles (van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.) que inducen a la cadena a arreglarse de acuerdo a una determinada disposición espacial. El calor produce que la cadena se desacople por excesivos movimientos moleculares perdiendo su actividad por completo. A este fenómeno se le denomina desnaturalización protéica y es irreversible en términos

prácticos. Como resultado se presenta una temperatura óptima de operación según se observa en la Figura 2.



2) **Sensibilidad a pH.** Pequeños cambios en el grado de acidez se traducen en cambios muy marcados de actividad debido a modificaciones en las interacciones moleculares señaladas anteriormente.

3) **Altamente específicas.** Por lo general catalizan exclusivamente un tipo particular de reacción, aún con sustratos presentes en mezclas complejas y a bajas concentraciones. Aún más, esta especificidad llega a distinguir formas enantioméricas, diferencias geométricas (cis vs. trans) y variaciones posicionales (regio-especificidad).

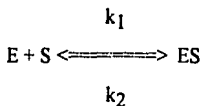
4) **Mucho más eficientes que los catalizadores no bioquímicos.** El número de interacciones entre sustrato y enzima que tiene lugar en un determinado sitio activo por segundo (número de recambio),

generalmente fluctúa entre  $10^3$  y  $10^9$ , lo que es indicativo de las bajas energías de activación en las reacciones enzimáticas. Aún más, este intervalo ocurre a temperaturas cercanas a la ambiental, condición a la cual los catalizadores químicos son generalmente inaplicables.

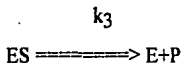
Debido a los números de recambio tan altos que se observan en las enzimas, se cree que las moléculas del sustrato no se unen estrechamente con estas, ya que, de ser así, bloquearían el sitio activo volviendo la reacción mucho más lenta

La manera común de poner a la enzima en contacto con el sustrato es la de solubilizar a la proteína en el medio de reacción. Este mecanismo implica la pérdida de la enzima al querer recuperar los productos de reacción. Una alternativa es la de inmovilizar a la enzima sobre un soporte inerte, mediante por ejemplo, fuerzas iónicas opuestas (adsorción). Con esto se reduce significativamente la pérdida cuantitativa de enzima sin un detrimento importante en la eficiencia de contacto con el sustrato.

La mayoría de los sistemas enzimáticos estudiados se comportan como si existiera un equilibrio entre el sustrato (S) y la enzima activa (E).



El símbolo ES se denomina "complejo enzima sustrato". Este reacciona para dar un producto (P) y liberar el sitio activo en forma esencialmente irreversible.



Este esquema, denominado de Michaelis-Menten ha predominado como aplicable a una gran cantidad de reacciones. Claramente se asume que el paso limitante es la reacción y no la difusión de las moléculas de sustrato y producto en el sitio activo.

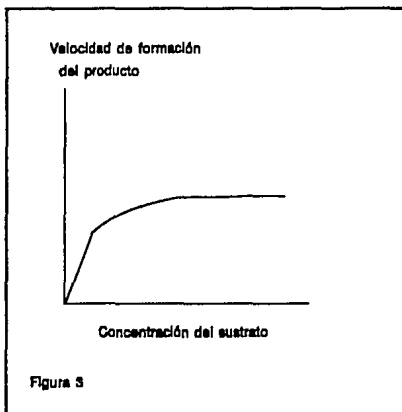
La cinética que se observa en la mayoría de los sistemas enzimáticos es de primer o cero orden en función de la concentración del sustrato. La velocidad de reacción se define de la siguiente manera:

$$v = (ES)k_3$$

Conforme aumenta la concentración de sustrato (S) aumenta (ES) y se incrementa la velocidad de la reacción comportándose como una cinética de primer orden. Si hay un exceso de S, todos los sitios activos quedan ocupados y un sucesivo aumento de la concentración de sustrato ya no se traduce en un incremento en la velocidad de reacción ( Figura 3). El modelo resultante de Michaelis-Menten tiene la siguiente forma:

$$v = \frac{k_3(ES)(S)}{k_1/k_2 + (S)} = \frac{V_{\max}(S)}{K_m + (S)}$$





Las enzimas han sido empleadas como catalizadores industriales desde principios de siglo. Sólo en el área alimentaria existen alrededor de cincuenta aplicaciones actuales y potenciales (Bárcana y López-Munguía, 1993). Esta cifra puede verse incrementada si se incluyen los sectores químico, ambiental y de salud. Sin embargo, es en las últimas dos décadas cuando se lograron consolidar procesos basados en una transformación enzimática, más que una aplicación accesoria. Algunos ejemplos son la producción de antibióticos semi-sintéticos, de jarabes fructosados a partir de almidón y de acrilamida, éste último recientemente iniciado en Japón.

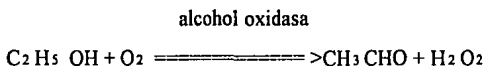
Se espera en el futuro cercano una notable expansión de procesos enzimáticos industriales que partan de mejoras moleculares logradas mediante los métodos de la ingeniería genética. Sin embargo será también necesario proponer nuevos sistemas de reacción que maximicen

las conversiones deseadas, y garanticen una alta vida de operación para los biocatalizadores usados.

## 2.2 Alcohol Oxidasa

La enzima Alcohol Oxidasa proviene de la levadura Pichia pastoris; es específica para alcoholes de cadena corta y su actividad enzimática se reduce considerablemente si se aumenta o se ramifica la cadena (Bárzana et al, 1989).

Una reacción de gran interés con esta enzima es la oxidación de etanol a acetaldehído con la producción simultánea de peróxido de hidrógeno:



Esta reacción es considerada irreversible debido al hecho de que la constante de equilibrio es del orden de  $10^{12}$ .

Dentro de la estructura enzimática existen 65 grupos SH (cisteínas) por molécula, los cuales son sensibles a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, subproducto de la oxidación (Bárzana, 1989). Se ha probado que la vida media de la enzima puede aumentar considerablemente con la inclusión de enzimas que degraden el peróxido de hidrógeno como catalasa o peroxidasa.

La temperatura y el pH óptimos para la enzima son 35° C y 7.5 respectivamente.

Varios usos potenciales han sido descritos para la enzima Alcohol Oxidasa, incluyendo la detección de alcohol (es) denominados biosensores, como secuestrante de oxígeno y la producción de aldehídos de interés industrial como aditivos alimentarios o similares (Duff y Murray, 1988; Mizuno e Imada, 1986).

### **2.3 Biocatálisis en fluidos supercríticos**

La importancia central de los solventes en la industria química es bien conocida. Prácticamente no existe ningún proceso químico en el que algún solvente no esté íntimamente ligado a las etapas de síntesis y separación. En la mayoría de las reacciones orgánicas, la elección de un solvente adecuado es fundamental debido a que generalmente es el componente más abundante. En esta determinación debe de tomarse en cuenta la compatibilidad del solvente con las reacciones de interés (reactivos y productos). La búsqueda de nuevos solventes que posean un espectro más amplio de propiedades físicas continúa siendo parte fundamental de las investigaciones en química orgánica. Para el caso de sistemas de reacción enzimáticas en fase orgánica, la elección del solvente es particularmente crítica. Por ejemplo, los productos de reacción polares tienden a permanecer en las vecindades de la enzima y pueden causar inhibición o propiciar reacciones secundarias. Además deben considerarse otros factores como que el solvente seleccionado sea

inerte a la reacción y con los valores apropiados de densidad, viscosidad, tensión superficial, toxicidad, flamabilidad y costo.

Hasta ahora la elección de solventes apropiados ha sido por demás arbitraria, aunque recientemente se han desarrollado modelos que correlacionan las propiedades físico químicas de los solventes con la actividad enzimática (Vermue et al, 1992).

Aún a pesar de sus propiedades catalíticas únicas, las enzimas no se utilizan con frecuencia en el sector de la industria química, en parte debido a su incapacidad de funcionar en solventes no acuosos, lo que impide utilizar un mayor número de sustratos. Sin embargo, este concepto ha sido claramente descartado en la última década.

Estudios recientes han probado que algunas enzimas pueden exhibir actividades inclusive superiores en mezclas de agua y solventes, que en agua pura (Butler, 1979). Además se ha demostrado que algunas enzimas son activas en solventes orgánicos prácticamente puros conteniendo únicamente 0.02 % de agua (Zaks y Klibanov 1985; Mattiasson y Aldercreutz, 1991; Gorman y Dordick, 1992).

Hoy en día existe consenso en que se requiere un mínimo de hidratación para mantener la actividad en estos sistemas ya que se cree que el agua se encuentra fuertemente ligada a la proteína, estabilizándola y proporcionándole una configuración activa por medio de una variedad de interacciones del tipo fuerzas de van der Waals. En consecuencia se piensa que la delgada película de agua rodeando a la enzima confiere una

mayor rigidez a la estructura, en comparación con un medio totalmente acuoso, evitando cambios conformacionales que lleven a la inactivación y aumentando su estabilidad a la desnaturalización térmica.

Además de proporcionar un medio en el que las enzimas funcionen mejor catalíticamente, los solventes no acuosos presentan algunas ventajas importantes sobre el agua en cuanto a sus aplicaciones en ingeniería:

- Los reactivos pueden ser más solubles en solventes no acuosos. Si el sustrato es insoluble o solo parcialmente soluble en agua, la enzima no puede alcanzar un máximo de actividad en una solución acuosa.

- En algunos casos la ausencia de agua puede prevenir reacciones secundarias indeseables. Además se ha probado que bajos niveles de agua mejoran significativamente la termoestabilidad en las enzimas debido a una reducción en el desdoblamiento parcial y a otras alteraciones covalentes en la estructura primaria de las moléculas enzimáticas que resultan en inactivación.

- La insolubilidad de la enzima en medio orgánico permite su recuperación sencilla por filtración, ya sea en forma libre o inmovilizada.

Debido a que los solventes orgánicos no son el medio natural de las enzimas, la actividad presentada en la mayoría de los casos es inferior a la que exhiben en agua. Se ha probado que la reducción en actividad no se debe a cambios en el mecanismo enzimático sino a variaciones en la

energía de inactivación dependientes de la rigidez molecular de la enzima. Por otra parte, al igual que en sistemas acuosos pueden presentarse limitaciones en la transferencia de masa de los sustratos. Existen dos barreras difusionales en este tipo de sistemas:

1) **Difusión externa.** La transferencia de masa desde el solvente a la superficie de la partícula puede ser limitante. Una agitación vigorosa de la suspensión de partículas enzimáticas puede aliviar este problema.

2) **Difusión interna.** Las moléculas enzimáticas en el centro de la partícula están expuestas a restricciones difusionales distintas a aquellas situadas en la superficie de ésta y la magnitud de la diferencia es dependiente del tamaño de poro.

Por su alta difusividad, tensión superficial casi inexistente y bajas viscosidades, los FSC resultan una excelente alternativa a los solventes orgánicos reduciendo las limitaciones de mojado y problemas difusionales tanto internos como externos para catalizadores enzimáticos.

Por otra parte, la naturaleza lábil de las enzimas hacia la temperatura no presenta un problema real debido a las bajas temperaturas críticas de algunos solventes como el CO<sub>2</sub> (T<sub>c</sub> = 31° C). Además, las etapas de recuperación de los productos y eliminación del disolvente puede efectuarse mediante una simple reducción de la presión hasta llegar al estado gaseoso.

La factibilidad de llevar a cabo una reacción enzimática en FSC depende básicamente de tres factores: solubilidad del sustrato ( predecible teóricamente a partir de modelos), estabilidad enzimática y actividad de la enzima en condiciones supercríticas.

A partir de las primeras evidencias reportadas durante los 80's (Hammond, 1985; Randolph et al, 1985, 1988) la efectividad de fluidos supercríticos en biocatálisis ha sido reportada para una variedad de reacciones y enzimas (Nakamura, 1990; Valentinotti, 1992). En estas publicaciones se especifican condiciones para seis enzimas y el tipo de operación empleada. Recientemente Russell y su grupo han logrado reacciones de polimerización de metacrilatos y otros productos catalizados por enzimas comerciales (Kamat et al, 1992 y 1993; Russell, 1994).

#### **2.4 Efectos de la presión en las enzimas**

Con la excepción de algunos resultados presentados por Hammond y colegas utilizando polifenol oxidasa en fluoroforno (Hammond et al, 1985) y lipasa en fluoroforno (Russell, 1994) todos los estudios hiperbáricos de estabilidad enzimática en condiciones supercríticas han sido conducidos exclusivamente utilizando CO<sub>2</sub>.

Existen reportes de que muy altas presiones desnaturalizan a las enzimas en soluciones acuosas aunque no siempre de manera irreversible (Russell y Beckman, 1991). La mayoría de las enzimas estudiadas hasta ahora no

reflejan ninguna pérdida de actividad por debajo de 400 MPa, presiones muy inferiores a las reportadas en la Tabla 2.

Trabajos previos de Weder (1980) demuestran que la exposición de enzima inmovilizada a CO<sub>2</sub> a 30 MPa por una hora, prácticamente no produce ninguna diferencia entre la actividad enzimática residual y la original. Otras investigaciones han demostrado que una variedad de enzimas retienen su actividad en presencia de CO<sub>2</sub> a presiones de hasta 35 MPa por extensos períodos de tiempo. Por ejemplo, Taniguchi y colaboradores estudiaron el comportamiento de una variedad de enzimas en CO<sub>2</sub>SC con y sin cosolventes y no observaron ninguna pérdida significativa en actividad (Taniguchi et al 1987).

Sin embargo, Kasche (1988) advierte que los efectos mecánicos acompañados de una rápida despresurización pueden desnaturalizar a las enzimas.

En resumen puede decirse que el trabajo realizado hasta ahora por estos grupos de investigación ha demostrado que las enzimas retienen su actividad al someterse a altas presiones por lo menos hasta un intervalo del orden de los 35 MPa.



## 2.5 Efecto del agua en las enzimas

El agua parece jugar un papel dual en la catálisis enzimática. Por un lado se requiere para dar estabilidad a la enzima manteniendo la conformación activa de las moléculas y por otro promueve su inactivación.

Mientras que la necesidad del agua es obvia, la cantidad requerida por sistemas enzimáticos permanece siendo una incógnita. Evidencias recientes sugieren que las moléculas enzimáticas en soluciones acuosas se hidratan por completo de las capas de agua más cercanas. Se han hecho estimados sobre el grosor de esta capa pero siguen siendo meras especulaciones. La hipótesis más común es que las moléculas enzimáticas requieren de una pequeñísima capa de hidratación que actúa como componente principal en la formación de un microambiente necesario para lograr una adecuada conformación. La capa actúa como un eslabón entre la superficie enzimática y el medio de reacción. En este caso es altamente improbable que la moléculas enzimáticas sean afectadas por la fase acuosa por encima de la capa de hidratación a menos que se suponga una alteración considerable al microambiente enzimático por el medio de reacción. Este principio de catálisis enzimática con bajos contenidos de agua es lo que ha llevado a la investigación de solventes alternativos a los acuosos como medios de reacción, entre los que destacan los solventes orgánicos, fluidos supercríticos y las reacciones en fase gaseosa (Dordick et al, 1989).

Han sido propuestos varios modelos para la degradación enzimática como función de la temperatura y el contenido de agua, pero existen muy pocos datos experimentales que los avalen.

Bárzana et al (1989) conduciendo estudios en fase gaseosa con Alcohol Oxidasa reporta que el contenido de agua afecta de manera significativa tanto la actividad como la termoestabilidad enzimática y el efecto producido en ambas es opuesto. Sus estudios demuestran que la actividad de la enzima inmovilizada en DEAE celulosa aumenta en un factor de  $10^4$  cuando la humedad medida en términos de la actividad acuosa ( $A_w$ ) se incrementa desde 0.11 hasta 0.84, mientras que la vida media de la enzima disminuye en un factor de  $10^2$ .

Estrada et al (1993) estudiaron la dependencia de la actividad y termoestabilidad de polifenol oxidasa con el contenido de humedad en diferentes solventes orgánicos. Sus estudios demuestran que la energía de activación de la reacción química en un solvente determinado es independiente del contenido de agua, mientras que la energía de activación de la reacción de desnaturalización (después de alcanzar la temperatura óptima) es directamente proporcional al contenido de agua del sistema. Es decir, un decremento en el contenido de humedad produce una disminución en la energía del proceso de inactivación después del punto de máxima actividad.

La termoestabilidad de la enzima inmovilizada fué estudiada variando la cantidad de agua en el sistema (tolueno) y la temperatura de incubación. La actividad residual de la enzima alcanzó valores cercanos al control

cuando el contenido de agua en el solvente se aumentó hasta un 0.2% (v/v) y la temperatura de incubación se mantuvo por debajo de los 60° C. A valores más altos de 0.2 % (v/v) de hidratación se observó una clara disminución de actividad con el aumento de cantidad de agua a cualquier temperatura, lo que sugiere una baja estabilidad enzimática en presencia de altos contenidos de agua.

Dumont et al (1992) realizaron estudios de reacciones enzimáticas de esterificación catalizadas por lipasa de hongos en CO<sub>2</sub>SC y en hexano y evaluaron el efecto de diferentes niveles de hidratación en la velocidad de reacción. Los resultados demuestran una influencia drástica de la concentración de agua en ambos casos, señalando un aumento de actividad con el aumento de hidratación hasta un punto óptimo después del cual se observa un efecto contrario. Los efectos son mucho más marcados en el caso del sistema con CO<sub>2</sub>SC que del hexano. La razón de esto es que el CO<sub>2</sub>SC es capaz de solubilizar mayor cantidad de agua que el hexano y tiende a provocar un desprendimiento de la capa de agua esencial de la enzima al alcanzar el equilibrio de potenciales químicos. Por otro lado, cuando se añaden grandes cantidades de agua y la enzima se hidrata con varias capas de agua, estas actúan como una barrera entre la superficie enzimática y el medio de reacción.

Taniguchi (1987) reporta que la actividad de lipasa conteniendo agua en un porcentaje en peso del 50% perdió 2/3 de su actividad original después de ser tratada con CO<sub>2</sub>SC. Sin embargo establece que las actividades de alfa amilasa y glucoso oxidasa permanecen inalteradas después de haber sido sometidas al mismo tratamiento.

Como puede observarse, existe una clara tendencia a aumentar la actividad enzimática con el incremento gradual del nivel de hidratación hasta alcanzar un máximo, después del cual se observa un descenso de actividad. Este fenómeno ha sido detectado tanto en fase gaseosa (Bárzana, 1989) como orgánica y en FSC (Russell, 1994). Sin embargo, la interrogante en cuanto a la estabilidad enzimática en relación a la cantidad de agua aún no ha quedado totalmente resuelta, sobre todo en el caso particular de los fluidos supercríticos.

## 2.6 Efecto del CO<sub>2</sub> sobre las enzimas

El CO<sub>2</sub> es una base de Lewis. Su dipolo inducido ácido / base le permite solvatar un gran número de sustancias tanto en fase líquida, gaseosa, como en condiciones supercríticas.

Los posibles efectos del CO<sub>2</sub> en la modificación química de proteínas han sido reportados por Weder (1980). Señala que el CO<sub>2</sub>, a pesar de su relativa baja reactividad puede reaccionar bajo ciertas condiciones con grupos amino de algunas proteínas, produciendo ácidos alquilcarbámicos, alquilcarbamatos, dialquilureas, bicarbonatos y carbonatos. La mayoría de estas reacciones son reversibles.

Los ácidos carbámicos y carbamatos pueden formarse tanto en soluciones acuosas, como en sistemas de baja humedad. El ácido carbámico es inestable pero puede ser estabilizado mediante la transferencia de un protón al agua o a un grupo amino. Por su parte, los carbamatos de aminoácidos son inestables y se descomponen a temperatura ambiente incluso en solución mediante la liberación de CO<sub>2</sub> gaseoso.

Otras referencias de esta revisión indican que en soluciones alcalinas puede darse la formación de carbamino-adyuctos de aminoácidos y péptidos. Estas reacciones juegan un papel importante en algunas reacciones fisiológicas, como en la marcada influencia del dióxido de carbono en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Se ha probado

que la reactividad de los grupo amino es muy dependiente del pH y del tipo de proteína, reaccionando solo grupos amino no protonados.

Weder (1980) realizó estudios de la composición de aminoácidos en la enzima RNasa incubada en dióxido de carbono a 300 bares y a temperatura ambiente por 6 horas y comparó los resultados contra un control de RNasa en una atmósfera de nitrógeno a la misma presión y temperatura. La composición de aminoácidos en las proteínas de los dos sistemas estudiados no difirió mucho. Además, los resultados no indicaron formación alguna de ácido alquil carbámico o alquil carbamatos.

Son tantos los tipos de enzimas existentes que es difícil hacer una aseveración tajante en cuanto al efecto químico del  $\text{CO}_2$  en las enzimas y la relación que este efecto pueda tener en la actividad de las mismas.

### **3. OBJETIVOS**

Estudios previos (Valentinotti, 1992) sugieren que la enzima Alcohol Oxidasa mejora su estabilidad al aumentar el tiempo de tratamiento. Sin embargo, no se evaluó el contenido de agua de las muestra tratadas ni se intentó detectar la presencia de cambios moleculares como resultado de ello. Es claro, con los antecedentes planteados, que cualquier efecto resultante de aplicar CO<sub>2</sub>SC a un biocatalizador basado en Alcohol Oxidasa puede ser producto de diferentes componentes; tal sería el caso de la alta presión, el contenido de agua o un efecto directo del CO<sub>2</sub> visto como agente de modificación química de las proteínas. En consecuencia, los objetivos del presente estudio son:

#### **Objetivo general:**

Evaluar el efecto del CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas sobre la actividad y estabilidad de la enzima Alcohol Oxidasa.

#### **Objetivos particulares:**

1. Determinar el efecto de la alta presión en la estabilidad de Alcohol Oxidasa.
2. Determinar el efecto del CO<sub>2</sub> independientemente de la alta presión en la estabilidad de Alcohol Oxidasa.
3. Evaluar la estabilidad de Alcohol Oxidasa sometida a condiciones supercríticas en función del tiempo de exposición.
4. Determinar el efecto de la humedad en la estabilidad de Alcohol Oxidasa expuesta a CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas.

#### **4. MATERIALES Y METODOS**

En esta sesión se describirán las técnicas analíticas empleadas en la determinación de la estabilidad enzimática de alcohol oxidasa. Para ello se siguió el programa de actividades que se presenta a continuación:

- 1) Evaluación del efecto de altas presiones en la estabilidad enzimática.
- 2) Evaluación de posibles efectos directos del CO<sub>2</sub> en la actividad e independientes de la alta presión.
- 3) Análisis de estabilidad de enzima sometida a CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas y en función del tiempo de exposición.
- 4) Análisis de estabilidad de enzima con distintos niveles de hidratación sometidos a CO<sub>2</sub>SC.

La preparación del catalizador enzimático y su caracterización en términos de actividad se llevó a cabo de la siguiente forma:

- a) Lavado de soporte (DEAE celulosa, Amberlita IRA-400).
- b) Inmovilización de la enzima alcohol oxidasa por fuerzas iónicas.
- c) Tratamiento de la enzima (específico para cada caso).
- d) Determinación de la actividad enzimática residual en fase acuosa por cromatografía de gases.

Los reactivos empleados fueron adquiridos de casas comerciales y eran todos de grado analítico.



#### 4.1 Lavado del Soporte

Los soportes DEAE Celulosa y Amberlita fueron adquiridos de SIGMA Chemical Co. El procedimiento de lavado para todos los soportes fue idéntico:

- Se pesó una cierta cantidad de soporte y se suspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 1mM (pH 7.5) agitándola por 10 min.
- La solución se dejó sedimentar y se extrajo el excedente de líquido.
- Se repitieron los dos pasos anteriores tres veces.
- El soporte fue lavado con sosa y posteriormente con solución de HCl para eliminar cationes e impurezas.
- Se filtró la mezcla resultante y se lavó exhaustivamente con agua destilada hasta que el sobrenadante presentaba un pH=7.5.
- El material resultante se dejó secar bajo una corriente de aire y se almacenó en refrigeración.

#### 4.2 Inmovilización de la enzima alcohol oxidasa

La enzima alcohol oxidasa fue adquirida de la compañía PROVESTA ENZYMES con las siguientes características:

Actividad 1371 E.U./ml. y una concentración de proteína 54.7 mg./ml., actividad específica 25 E.U./mg., donde una E.U. oxida 1m mol de metanol a formaldehído por minuto a 25° C y pH 7.5.

La enzima fue almacenada a -10° C. La técnica empleada para inmovilizar a la enzima sobre los soportes (Amberlita y DEAE) fue la siguiente:

- Se pesó el soporte previamente lavado y secado.

- Un ml de alcohol oxidasa se mezcló con 10 ml. de una solución amortiguadora de fosfatos 1mM, pH 7.5.
- Se añadió la mezcla de enzima- solución amortiguadora a 5 g de soporte y se agitó suavemente hasta alcanzar la máxima adsorción de enzima posible sobre el soporte. Esto se determinó midiendo la absorbancia residual cada cinco minutos en un espectrofotómetro a 280 nm, longitud de onda a la que absorben los grupos aromáticos en las proteínas. Por lo tanto, es una medida indirecta de la concentración de la proteína en solución, o del nivel de inmovilización.
- Se decantó el sobrenadante y se liofilizó el preparado enzimático para eliminar todo remanente de agua.
- Una vez seco, el catalizador enzimático se almacenó a una temperatura de -5° C para su uso posterior.

#### 4.3 Determinación de Actividad en fase acuosa

Una cantidad conocida del preparado enzimático se suspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 1mM, pH 7.5. Para iniciar la reacción se agregó una solución de etanol 50 mM. Tanto el volumen de solución amortiguadora como el de etanol fueron diferentes dependiendo del soporte en el que se realizó la inmovilización enzimática.

Soporte	Cantidad	Vol. de Etanol	Vol. de Sol. Amortiguadora
DEAE	0.1 g.	0.01 ml.	1 ml.
Amberlita	0.6 g.	0.2 ml.	2.5 ml.

La muestra se agitó vigorosamente y la velocidad inicial fue obtenida a partir de la concentración de producto (acetaldehído) formado. Para ello se hicieron inyecciones de un microlitro cada cinco minutos en un

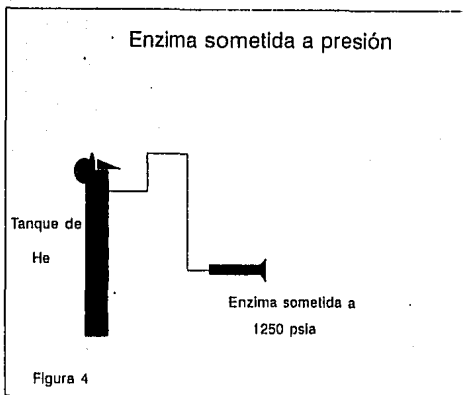
cromatógrafo de gases Hewlett Packard 8390. Se utilizó una columna capilar sensible a compuestos polares y las condiciones del cromatógrafo fueron:

Temperatura del inyector	200° C
Temperatura del detector	200° C
Temperatura del horno	80° C
Split	1/20

Las muestra de biocatalizador sujetas a diversos tratamientos fueron recuperadas y la actividad remanente fue determinada en forma similar. De esta forma se estableció el porcentaje de actividad con respecto a un control (sin tratamiento o especificado en cada caso).

#### **4.4 Evaluación del efecto de altas presiones en la estabilidad enzimática**

Se tomaron 0.6g. de preparado enzimático y se colocaron dentro de una celda de acero inoxidable. Se conectó la celda en uno de sus extremos a un tanque de helio con un regulador de presión y manómetro que soportaba hasta 1500 lb/in<sup>2</sup> de presión y se cerró el otro extremo de la celda permitiendo la salida de aire pero no de polvo enzimático. Una vez purgado el aire existente se selló completamente la celda y se reguló la presión a 1250 lb/in<sup>2</sup> (Figura 4).



La enzima fue incubada por doce horas al término de las cuales se despresurizó cuidadosamente el sistema. El polvo fue recuperado de la celda y su actividad fue determinada en fase acuosa de acuerdo con la metodología indicada.

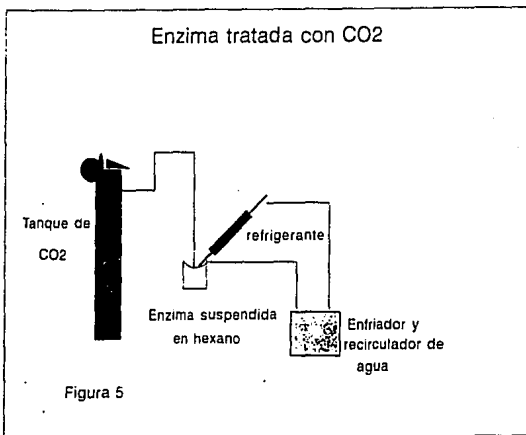
#### 4.5 Evaluación del efecto del CO<sub>2</sub> en la estabilidad enzimática

Para evaluar el efecto intrínseco del CO<sub>2</sub> independiente de altas presiones en la estabilidad de alcohol oxidasa se montaron dos sistemas:

##### I- Suministro de CO<sub>2</sub> gaseoso a una suspensión de enzima en hexano

Se tomaron dos muestras de 1 g. de enzima inmovilizada cada una y se añadieron a dos recipientes de 50 ml. de hexano. A un recipiente se le burbujó CO<sub>2</sub> por espacio de tres horas directamente de un tanque como

se muestra en la Figura 5, y al otro se le burbujeó  $N_2$  por el mismo intervalo de tiempo a manera de control.



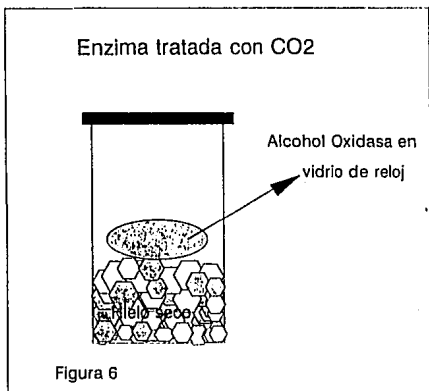
Para evitar la evaporación del hexano, fue necesario conectar al sistema un equipo de enfriamiento y recirculación de agua con el fin de condensar el hexano y evitar su pérdida.

Al término del tiempo establecido se decantó el hexano y se recuperó el polvo enzimático. Se secó el polvo en la campana y se le midió la actividad en fase acuosa.

## II- Tratamiento de la enzima soportada con hielo seco.

Se tomaron 0.6 g. de enzima inmovilizada en Amberlita y se colocaron en un vidrio de reloj (Figura 6). La muestra se introdujo en un recipiente que contenía hielo seco. El frasco fue tapado provocando un aumento en la presión de vapor del sistema por la sublimación del  $CO_2$  y dejando a la

enzima en un ambiente rico en este gas. Después de tres horas se recuperó el polvo y se le midió la actividad residual en fase acuosa.

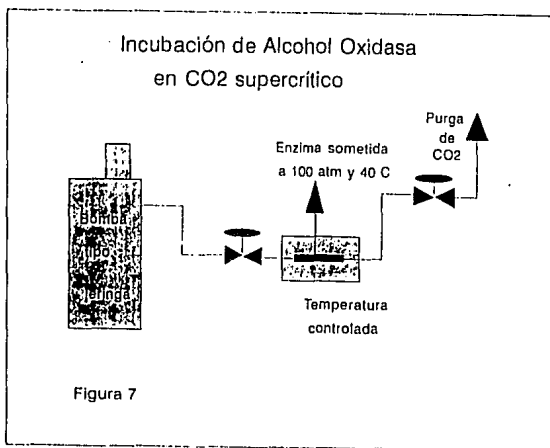


#### 4.6 Incubación de la enzima soportada en CO<sub>2</sub> a condiciones supercríticas

- Se montó un sistema como el que se muestra en la Figura 7.
- Se tomaron 0.6 g. de polvo enzimático y se introdujeron dentro de una celda de acero inoxidable conectada a una bomba tipo jeringa la cual suministraba CO<sub>2</sub> a 100atm. Después de eliminar el aire contenido dentro de la celda mediante un flujo de CO<sub>2</sub>, la celda se selló herméticamente alcanzando rápidamente las 100 atm.. La celda se cubrió con una cinta térmica eléctrica conectada a una fuente de poder que permitió regular la temperatura a 40° C, temperatura superior a la temperatura crítica para el CO<sub>2</sub> (31° C).
- Una vez cargada con enzima, la celda se incubó por diferentes intervalos de tiempo (1,6,12 y 24 horas) a 40° C y 100 atm de presión.

Al final del tratamiento la celda se despresurizó y al polvo enzimático recuperado se le determinó la actividad en fase acuosa

Como control se utilizó la enzima inmovilizada almacenada a 5° C.

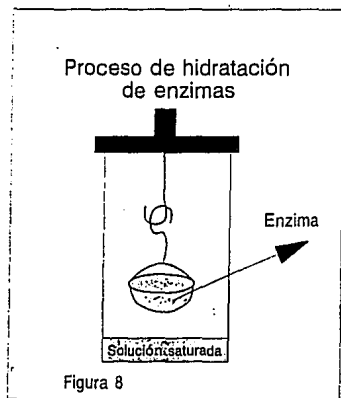


#### 4.7 Estabilidad de enzimas con distintos niveles de hidratación en CO<sub>2</sub>SC

Se hidrataron muestras de enzima inmovilizada en DEAE Celulosa en atmósferas cerradas de soluciones saturadas de diferentes sales por 72 horas como se muestra en la Figura 8. A una temperatura establecida la humedad relativa de una solución saturada es fija (Greenspan, 1977). Las soluciones utilizadas fueron:

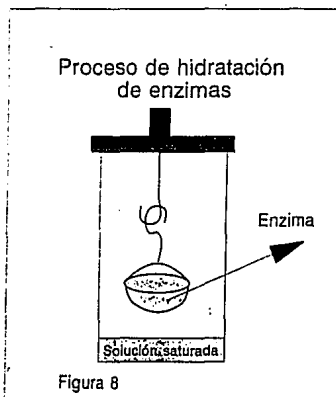
Solución	Humedad Relativa
NaOH	7.6%
NaCl	76%

Al término del tiempo de hidratación cada una de las muestras se separó en dos. Una sirvió como control y la otra fue incubada en  $\text{CO}_2\text{SC}$  a 100 atm y  $40^\circ\text{C}$  por una hora siguiendo el mismo procedimiento que en el experimento anterior.





Al término del tiempo de hidratación cada una de las muestras se separó en dos. Una sirvió como control y la otra fue incubada en  $\text{CO}_2\text{SC}$  a 100 atm y  $40^\circ\text{C}$  por una hora siguiendo el mismo procedimiento que en el experimento anterior.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Incubación de la Enzima a Altas Presiones

Partiendo de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación los cuales han determinado que el someter enzimas a altas presiones no se observan efectos considerables sobre la actividad residual, se buscó determinar las respuestas en términos de su estabilidad de Alcohol Oxidasa inmovilizada al incubarse bajo una atmósfera de un gas inerte como el Helio.

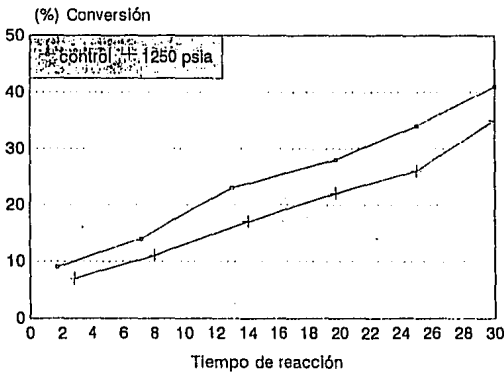
Para ello, se procedió a incubar por doce horas enzima inmovilizada sobre Amberlita IRA-400 a temperatura ambiente y a 1250 psia siguiendo el procedimiento mencionado en el capítulo anterior.

Al terminar el tratamiento la enzima fue recuperada y su actividad determinada en fase acuosa, medida como la cinética de formación de acetaldehído a partir de una solución de etanol, según se muestra en la Figura 9.

Se puede observar que la enzima sometida a 1250 lb/in<sup>2</sup> presentó una actividad de 0.83 con respecto al control en fase acuosa. Después de 30 minutos de reacción, la enzima tratada alcanzó un 35 % de conversión de etanol en acetaldehído contra un 41% de conversión alcanzado por el control. La pérdida de actividad puede deberse a la manipulación del polvo enzimático sobre todo si se considera que el control (enzima refrigerada a -5° C) no sufrió manipulación alguna. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que la pérdida de actividad se deba a

trastornos producidos en la estructura terciaria de las proteínas particularmente en el sitio activo por efecto de la presión.

## Efecto de la presión en la actividad enzimática



La actividad de la enzima tratada es 83% de la actividad del control determinada en fase acuosa.

### 5.2 Efectos Químicos y Físicos del CO<sub>2</sub> en la Actividad Enzimática

El objeto de este estudio fue tratar de esclarecer si el CO<sub>2</sub> es capaz de interactuar a nivel molecular con las enzimas, ya sea por medio de una reacción química, o por la formación de enlaces físicos que afecten el arreglo molecular y conlleven a un cambio en la actividad enzimática. Las referencias citadas en el capítulo anterior nos han llevado a considerar tal posibilidad. La factibilidad de una producción de ácido carbónico, carbonatos, ácidos carbámicos y carbamatos, sugieren la posibilidad de un cambio en el pH del sistema que altere en forma permanente las propiedades catalíticas. Estas podrían mantenerse aún

después de resuspender el catalizador en una solución amortiguadora para la determinación de la actividad residual.

Ante tal perspectiva se montó el equipo ejemplificado en el capítulo anterior en el cual se burbujeó  $\text{CO}_2$  a la enzima inmovilizada en soporte de Amberlita y suspendida en hexano por espacio de tres horas. Como control se montó un sistema idéntico pero utilizando  $\text{N}_2$ .

La enzima tratada con  $\text{CO}_2$  presentó una actividad relativa del 92% con respecto al control. Una pérdida del 8% de actividad no se considera suficiente para establecer conclusiones sobre la existencia de una inactivación enzimática ocasionada por el  $\text{CO}_2$ .

Se consideró entonces la posibilidad de que se requiera de una mayor concentración de  $\text{CO}_2$  para propiciar un posible cambio químico. En el sistema descrito, el contacto entre la enzima y el  $\text{CO}_2$  se encuentra limitado por la solubilidad de  $\text{CO}_2$  en hexano y por la difusión de este hacia las moléculas enzimáticas (mucho más lenta que en un gas). Debido a esto resulta improbable que las moléculas de alcohol oxidasa se encuentren expuestas a una alta concentración de  $\text{CO}_2$ .

Se procedió entonces a incubar a la enzima en un recipiente cerrado conteniendo hielo seco. La continua sublimación del  $\text{CO}_2$  sólido produce un aumento en la presión parcial de  $\text{CO}_2$  en el sistema gaseoso dejando a la enzima suspendida en un ambiente enriquecido en este gas con alta penetración en la estructura microscópica del catalizador.

Después de tres horas de incubación la actividad de la enzima tratada fue del 100% con respecto al control. Con base en estos resultados se infiere que el CO<sub>2</sub> no presenta un efecto dramático en las propiedades catalíticas de la enzima Alcohol Oxidasa, por lo menos a presiones atmosféricas o ligeramente superiores.

### **5.3 Actividad Enzimática en CO<sub>2</sub>SC**

Después de comprobar que la estabilidad de la enzima alcohol oxidasa no sufría grandes modificaciones al ser expuesta a altas presiones ni al ser sometida a una atmósfera de CO<sub>2</sub>, el siguiente paso consistió en determinar su estabilidad en un medio supercrítico. Se procedió a incubar en CO<sub>2</sub>SC durante doce horas enzima liofilizada e inmovilizada en Amberlita.

Al suspender a la enzima en medio acuoso para determinar la actividad remanente se observó un burbujeó muy violento que ocasionó que se desbordara parte del polvo enzimático del recipiente y fuera imposible realizar la medición. La explicación inmediata de este fenómeno fué que hubo una adsorción intensa del CO<sub>2</sub> sobre el soporte y que al poner a éste en contacto con la solución amortiguadora, se liberó el CO<sub>2</sub> en forma de gas. Para comprobar esta posibilidad se liofilizó soporte de Amberlita previamente lavado y secado y se sometió al mismo tratamiento que la enzima inmovilizada. Al suspender el soporte tratado en solución amortiguadora, se observó el mismo fenómeno, lo que confirmó la alta afinidad de adsorción de CO<sub>2</sub> sobre la Amberlita.

Para eliminar el espumado resultante, altamente dañino para las enzimas, se repitió el experimento utilizando trazas de heptanol como agente antiespumante y agregando la enzima tratada muy lentamente a la solución amortiguadora. Aunque logró reducirse considerablemente el espumado, no pudo efectuarse una determinación adecuada de la actividad en fase acuosa debido a que el heptanol contaminó severamente la resolución cromatográfica durante la determinación de actividad.

Se repitió la prueba utilizando como soporte DEAE Celulosa con lo que se eliminó el fenómeno de adsorción de  $\text{CO}_2$  observado con la Amberlita. En este caso la actividad presentada por la enzima incubada fue considerablemente menor al control por lo que se procedió a incubar a la enzima por distintos periodos de tiempo. Se iniciaron pruebas de 1, 6, 12 y 24 horas por duplicado y en todas ellas se observó una clara pérdida de actividad según se muestra en las Figuras 10 y 11. No sólo fue menor que en el caso de la enzima sin tratamiento sino que, a medida que se incrementaba el tiempo de exposición se observó un decremento. Así, a una hora de exposición, se observa ya una pérdida del 50 % de actividad. Esta continúa disminuyendo drásticamente hasta las 6 horas de exposición donde se observa una pérdida del 75 % con respecto al control. A partir de este momento, un sucesivo aumento en el tiempo de incubación hasta las 24 horas ya no produjo cambios significativos en la actividad enzimática.

# Estabilidad enzimática en CO<sub>2</sub> supercrítico

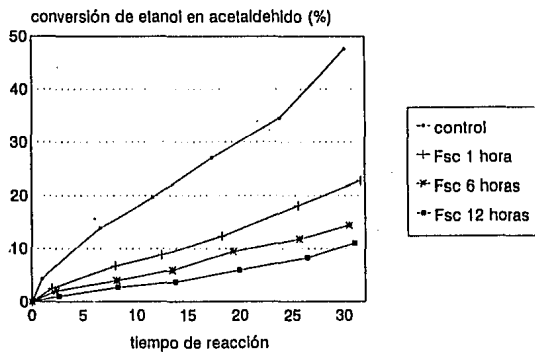
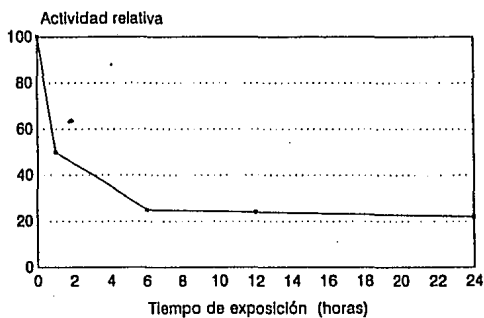


Figura 10

## Efecto del tiempo de incubación en CO<sub>2</sub>sc. (Fase acuosa)



CO<sub>2</sub> supercrítico (100 atm, 40 C)  
Figura 11

Para verificar que el fenómeno de despresurización no tuviera efectos en la desnaturalización de las enzimas, fenómeno observado por Kasche et al, (1988), se repitió la prueba a una hora de incubación utilizando un restrictor que permitía despresurizar el sistema lentamente (30 minutos) y se comparó contra una muestra de enzima incubada por el mismo período de tiempo pero despresurizada en forma repentina. No se observó ninguna diferencia en la actividad residual de ambas enzimas.

Las razones del fenómeno de inactivación no están claras. Podría deberse a cambios en la estructura protéica a través de un reacomodo de las subunidades que conforman a la enzima. Otro factor importante a considerar es el contenido de agua en el sistema enzimático. EL CO<sub>2</sub> utilizado fue de grado extraseco. Este, al ser capaz de solubilizar una cantidad considerable de agua, puede haber provocado un desprendimiento en la capa de agua esencial de la enzima provocando cambios irreversibles en la estructura terciaria de la proteína y dañando al sitio activo. Sin embargo, estas especulaciones no fueron comprobadas en forma experimental.

#### **5.4 Efecto del grado de hidratación en enzimas sometidas a CO<sub>2</sub>SC**

Dada la importancia del nivel de hidratación en la estabilidad de enzimas, reportadas tanto para medios orgánicos como fluidos supercríticos, se efectuaron pruebas de incubación en muestras con diferentes humedades.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



Con el objeto de tratar de obtener un patrón de comportamiento para la inactivación enzimática en relación al contenido de agua del sistema, se hidrataron muestras de enzima a diferentes niveles de humedad relativa siguiendo el procedimiento mencionado en el capítulo anterior.

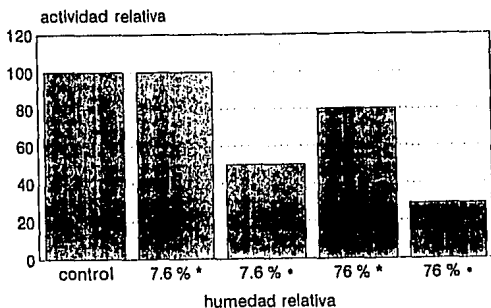
Después de incubar las muestras hidratadas en  $\text{CO}_2\text{SC}$  por una hora a 7.6 % y 76 % de humedad relativa, se midió la actividad en fase acuosa y se compararon contra sus respectivos controles hidratados y contra un control liofilizado almacenado en atmósfera de nitrógeno a 5° C.

Después de 24 horas de hidratación, la enzima hidratada a 7.6 % de humedad relativa presentó una actividad del 100 % con respecto al control sin tratar y almacenado a 5° C. Por otro lado, la enzima equilibrada a 76 % de humedad relativa presentó una actividad del 80 % con respecto al mismo control. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Bárzana et al (1989) y reflejan un decremento de la vida media de las enzimas al incrementarse el contenido de agua.

Una vez hidratadas las enzimas, fueron incubadas en  $\text{CO}_2$  a 100 atm y 40° C por una hora. Los resultados de la actividad residual se presentan en la Figura 12. Se observa que existe una disminución en la actividad enzimática relativa conforme aumenta el contenido de agua del sistema. A 7.6 % de humedad, la enzima incubada en  $\text{CO}_2\text{SC}$  muestra una actividad del 50 % en referencia a su propio control (también hidratado) mientras que aquella equilibrada a un 76 % de humedad solo retiene el 35% de su actividad previa al tratamiento en  $\text{CO}_2\text{SC}$ .

# Efecto del agua en la estabilidad enzimática

Figura 12



Como control se utilizó enzima liofilizada y sin exposición a CO<sub>2</sub>sc

\* Enzima hidratada 24 horas a 5 C

Aparentemente, el contenido de agua favorece el proceso de degradación enzimática observado en enzimas tratadas con CO<sub>2</sub>SC. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron totalmente reproducibles y sería muy aventurado formular conclusiones definitivas al respecto.

Sin embargo, estos resultados sugieren que la enzima es altamente sensible a incrementos en el nivel de hidratación cuando se expone a CO<sub>2</sub>SC, aún durante tiempos cortos de una hora. Este comportamiento es consistente con lo reportado por Bárzana et al (1989) para Alcohol Oxidasa incubada en aire a presión atmosférica, donde se observó una reducción notable de actividad al aumentar la hidratación en el intervalo de 11% a 90% de humedad relativa. Asimismo, es opuesto al reportado por Valentinotti (1992) que señala una mejoría en actividad residual como resultado de la exposición a CO<sub>2</sub>SC, si bien dicho estudio se efectuó en muestras sin control del agua presente.

Es importante destacar que el equipamiento empleado en ambos estudios resulta de adaptaciones a un cromatógrafo supercrítico que no permite el mantenimiento estricto de condiciones. En consecuencia, estas conclusiones son preliminares y sujetas a confirmación en un equipamiento adecuado para ello como sería el caso de un extractor supercrítico.

## 6. CONCLUSIONES

- La enzima alcohol oxidasa es estable a altas presiones de gases inertes (He a 1250 lb/in<sup>2</sup> y temperatura ambiente)
- La actividad enzimática no se ve afectada al incubar a la enzima en un medio rico en CO<sub>2</sub> a bajas presiones
- La exposición de Alcohol Oxidasa a CO<sub>2</sub>SC (100 atm., 40° C) disminuye en forma importante su poder catalítico
- El tiempo de incubación en CO<sub>2</sub>SC favorece el proceso de degradación enzimática, registrándose una pérdida del 75 % de la actividad original en medio acuoso después de 6 horas de incubación
- El fenómeno de degradación enzimática es independiente de efectos relacionados con la despresurización del sistema
- El soporte Amberlita IRA-400 adsorbe grandes cantidades de CO<sub>2</sub> y por lo tanto resulta inadecuado para realizar pruebas de estabilidad enzimática en CO<sub>2</sub>SC
- El proceso de hidratación de Alcohol Oxidasa a 5° C produce una disminución en la actividad residual de las mismas y en función de la humedad relativa de equilibrio

· El aumento en el grado de hidratación enzimática promueve el fenómeno de degradación en Alcohol Oxidasa sometida a  $\text{CO}_2\text{SC}$  (100 atm y  $40^\circ\text{C}$ )

## 7. RECOMENDACIONES

El trabajo realizado deja en claro algunos aspectos sobre el comportamiento de la enzima alcohol oxidasa en diferentes medios. Tal es el caso de su probada estabilidad tanto a presiones de hasta 1250 lb/in<sup>2</sup>, como en medios concentrados de CO<sub>2</sub> a condiciones ambientales. En lo referente a las pruebas realizadas en condiciones supercríticas, se considera que los resultados presentados sobre la creciente pérdida de actividad con el aumento del tiempo de incubación son razonablemente confiables. Sin embargo, los experimentos realizados a distintos niveles de hidratación fueron poco reproducibles. No se puede afirmar con seguridad cuál es el papel que juega el agua en el proceso de degradación en enzimas tratadas con CO<sub>2</sub>SC, ni la cantidad que se requiere para que esto ocurra. Además, este problema se ve acrecentado debido a que se desconoce cuál es la solubilidad del agua en CO<sub>2</sub>SC a 100 atm y 40° C y por lo tanto, se ignora qué cantidad de agua se desprende de la enzima al alcanzarse el equilibrio.

Sería de gran utilidad contar con diagramas de fases en mezclas binarias CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O para condiciones supercríticas y subcríticas que permitan conocer la solubilidad de agua en CO<sub>2</sub> para un intervalo dado de presión y temperatura.

Próximamente el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química contará con uno de los equipos más avanzados de extracción supercrítica. Este equipo tiene seis celdas donde se pueden realizar pruebas simultáneas de manera independiente variando la

presión, temperatura y contenido de agua del sistema . Con estas facilidades se estará en condiciones de evaluar diversos efectos de manera reproducible y estadísticamente confiables.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Bárzana E., Karel M. y Klíbanov A.M. (1989) Enzymatic Oxidation of Ethanol in the Gaseous Phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 34: 1178-1185 .
- Bárzana E., Klíbanov A.M. y Karel M. (1989) A Colorimetric Method for the Enzymatic Analysis of Gases. The Determination of Ethanol and Formaldehyde Vapors Using Solid Alcohol Oxidase. *Analytical Biochemistry* , 82: 109-115.
- Bárzana E. y López-Munguía A. (1992) La Tecnología Enzimática; en *Biología Alimentaria*, García M., Quintero R. y López Munguía A. Editores, Limusa, México, 103-123.
- Dordick J. (1989) Enzymatic Catalysis in Monophasic Organic Solvents, *Enz. Microb. Technol*, 11.
- Duff S.J. y Murray W.A. (1988) Production and Application of Methylophilic Yeast *P. Pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 31: 44-49.
- Dummont T. y Barth D., Corbier C., Branlant G. y Perrut M. (1992) Enzymatic Reaction Kinetic: Comparison in an Organic Solvent and in Supercritical Carbon Dioxide, *Biotechnology and Bioengineering*, 39: 329-333



- Estrada P., Baroto, Castillon M.P., Acebal C. (1993) Temperature Effects on Polyphenol Oxidase Activity in Organic Solvents with Low Water Content, *J. Chem. Tech. Biotec*, 56: 59-65.
  
- Gorman L.A. y Dordick J.S. (1992) Organic Solvents Strip Water off Enzymes, *Biotechnology and Bioengineering*, 39:392-397.
  
- Greenspan L. (1977) Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions., *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 81.
  
- Hammond D., Klibanov M., Karel M. y Krukonis V. (1985) Enzymatic Reactions in Supercritical Gases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11 : 393-400.
  
- Hyatt J. (1984) Liquid and Supercritical Carbon Dioxide as Organic Solvents. *American Chemical Society* 5097-5098.
  
- Johnston K.P. (1989) *New Directions in Supercritical Fluid Science and Technology*. American Chemical Society Symposium Series.
  
- Kamat S., Barrera J., Beckman E., Russell A. (1992) Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Organic Solvents and Supercritical Fluids: I. Optimization of Enzyme Environment, *Biotechnology and Bioengineering*, 40:158-166.

- Kamat S., Iwaskewycz B., Beckman A., Russell A. (1993) Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Supercritical Fluids; Tuning Enzyme Activity by Changing Pressure, Proc. Natl. Acad. Sci. 90 : 2940-2944.
  
- Kasche. V., Sholothauer R y Brunner G (1988) Enzyme Denaturation in Supercritical Carbon Dioxide: Stabilizing Effect of Disulfide Bonds During the Depressurization Step. Biotech. Lett. ,10 : 569-574.
  
- Mattiasson B. y Aldercreutz P. (1991) Tailoring the microenvironment of enzymes in water-poor systems. TIBTECH, 9 : 394-398.
  
- Mizuno S. e Imada Y. (1986) Conversion of Methanol to Formate through the Coupling of the Enzyme Reactions of Alcohol Oxidase, Catalase and Formaldehyde Dismutase. Biotech. Lett. 8 : 79-84.
  
- Nakamura K. (1990) Biochemical Reactions in Supercritical Fluids TIBTECH. 8 : 288-292.
  
- Randolph T.W. (1990) Supercritical fluid extractions in biotechnology, Tibtech. 8:78-82.
  
- Randolph T.W., Clark D.S., Blanch H.W. y Prausnitz J.M. (1988) Cholesterol Aggregation and Interaction with Cholesterol Oxidase in Supercritical Carbon Dioxide. Proc. Natl. Acad. Sci. 85 : 2972-2983.

- Randolph T.W., Clark D.S., Blanch H.W., Prausnitz J.M. y Wilke C.R. (1985) Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluid, *Biotech. Lett.* 7 : 325-328 .
  
- Russell A., Beckman E. (1991) Enzyme Activity in Supercritical Fluids, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 131 : 197-211.
  
- Russell A., Ayala G., Kamat S., Komives C. y Beckman E. (1991) Solubilization and Activity of Proteins in Supercritical Fluids, *Annals of the New York Academy of Sciences*.
  
- Russell A. y Beckman E. (1991) Should the High Diffusivity of a Supercritical Fluid Increase the Rate of an Enzyme-Catalyzed Reaction?, *Enz. Microb. Technol.* 13.
  
- Russell A., Beckman E. y Chaudhary A. (1994) Studying Enzyme Activity in Supercritical Fluids, *CHEMTECH*, 33-37.
  
- Steytler, D.C. , Moulson, P.S. y Reynolds J. (1991) Biotransformations in Near-Critical Carbon Dioxide. *Enz. Microb. Technol.*, 13 : 221-226.
  
- Taniguchi M., Kamihira M. y Kobayashi T. (1987) Effect of Treatment with Supercritical Carbon Dioxide on Enzymatic Activity. *Agric. Biol. Chem.* 51(2) : 593-594.
  
- Valentinotti S. (1992) Estabilidad Enzimática en Fluidos Supercríticos, Tesis Faç. Química UNAM, México.

- Vermue M., Tramper J., Jong J. y Oostrom H. (1992) Enzymic transesterification in Near Critical Carbon Dioxide: Effect of Pressure, Hildebrand Solubility Parameter and Water Content., *Enz. Microb. Technol.*, 14.
- Weder J. (1990) Effect of Supercritical Carbon Dioxide on Proteins, *ZLebensm Unters Forsch* 171: 95-100.