

87



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DETERMINACION DE GRUPOS
SULFHIDRILO EN ENZIMAS
INMOVILIZADAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

Gabriela Martínez Miranda

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO
1er SUPLENTE
2do SUPLENTE

PROF. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA
PROF. AGUSTIN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES
PROF. FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS
PROF. RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO
PROF. JOSE GUILLERMO DE JESUS AGUILAR O.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. FRANCISCA A. ITURBE CHIÑAS

SUSTENTANTE:

GABRIELA MARTÍNEZ MIRANDA

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Angelina y Gabino

Por el apoyo y confianza que siempre han depositado en mí. Por su invaluable ejemplo de lucha y superación constante. Por impulsarme a seguir adelante en todo momento.

A ustedes todo mi amor y gratitud.

A mis Hermanos:

Rafael, Adriana y Gustavo

Por la paciencia y fé que siempre han tenido en mí.

A mi abuelita:

Carmela

Por el cariño y sabios consejos brindados. Por todos esos gratos momentos compartidos.

A todos mis familiares:

Con cariño por todo el apoyo brindado.

A todos y cada uno de ustedes



!GRACIAS!



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por brindarme la oportunidad de alcanzar una de mis metas y espero nunca defraudarla.

Al Dr. Eduardo Bárzana:

Por el apoyo y asesoría brindados durante la realización de esta tesis.

A la M. en C. Francisca A. Iturbe:

Por su constante colaboración, asesoría y apoyo incondicional durante la realización de la presente investigación, pero principalmente por su invaluable amistad y confianza.

Muchas Gracias Fanny.

A mis profesores:

Que me guiaron por el camino del conocimiento.

A los miembros del jurado:

Por sus valiosas sugerencias en la revisión de esta tesis.

CONTENIDO

	Página
Lista de Tablas	i
Introducción	ii
I. Generalidades	
1.1. Características Generales de las Enzimas	1
1.2. Inmovilización de Enzimas	4
1.2.1. Perspectiva Histórica	4
1.2.2. Propiedades de las Enzimas Inmovilizadas	6
1.2.3. Desventajas en la Inmovilización de Enzimas	7
1.3. Métodos de Inmovilización	8
1.3.1. Clasificación	8
1.3.2. Métodos de inmovilización Física	11
1.3.2.1. Enzimas Ligadas por Adsorción	11
1.3.2.2. Enzimas Atrapadas	17
1.3.3. Métodos de inmovilización Químicos	23
1.3.3.1. Enlace Covalente	23
1.3.3.2. Entrecruzamiento	26
1.4. Soportes	29
1.4.1. Consideraciones generales	29
1.4.2. Soportes Orgánicos e Inorgánicos	30
1.4.3. Soportes de Origen Natural y Sintético	33
1.4.3.1. Polímeros Orgánicos Naturales	33
1.4.3.2. Polímeros Orgánicos Sintéticos	33
1.4.4. Clasificación de los Soportes con base en su Naturaleza Química	33

	Página
1.5. Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas	36
1.5.1. Procesos Analíticos	36
1.5.1.1. Cromatografía de Afinidad	36
1.5.1.2. Electrodo Bioquímico	38
1.5.1.3. Tiras Reactivas	40
1.5.1.4. Aplicaciones en el Campo de la medicina	41
1.5.1.5. Aplicación en la Industria Alimentaria	45
1.6. Enzima Alcohol Oxidasa	50
1.7. Cuantificación de Grupos Sulfhidrilo	53
1.7.1. Titulación de Grupos -SH con N-etil maleimida	53
1.7.2. Cuantificación de Grupos -SH con DTNB	55
II. Materiales y Métodos	
2.1. Metodologías Analíticas	58
2.2. Selección del Soporte	59
2.3. Inmovilización de Alcohol oxidasa	60
2.4. Inmovilización de Proteínas de Referencia	63
III. Resultados y Discusión	
3.1. Espectro de Absorción del Anión Colorido	67
3.2. Determinación del Tiempo Mínimo Necesario para la reacción Estabilidad del Color	68
3.3. Coeficiente de Extinción Molar del TNB²⁻	69

	Página
3.4. Selección del Soporte	71
3.4.1. DEAE-Celulosa	72
3.4.2. Alúmina	73
3.4.3. Vidrio Poroso Glicerado	75
3.4.4. Vidrio Poroso no Glicerado	78
3.4.5. Inmovilización en Perlas de Alginato	82
IV. Conclusiones	97
Bibliografía	100

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1.1. Enzimas Inmovilizadas por Adsorción Física	13
1.2. Enzimas Inmovilizadas por Adsorción Iónica	15
1.3. Soportes Utilizados en la Inmovilización por Enlace Covalente	24
1.4. Enzimas Inmovilizadas por Entrecruzamiento	28
1.5. Clasificación de los Soportes de acuerdo a su Naturaleza	32
1.6. Ejemplos de Electroodos Enzimáticos	39
1.7. Principales Propiedades de la enzima Alcohol oxidasa de <i>P. pastoris</i>	52

INTRODUCCIÓN

La utilización de enzimas con fines comerciales se ha venido extendiendo en una gran variedad de campos tales como; industria alimentaria, industria textil, industria química, medicina, industria farmacéutica, entre otras. Sin embargo, no siempre han resultado ser catalizadores ideales de aplicación industrial, debido a su inestabilidad y su elevado costo.

Tradicionalmente las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo en procesos por lote incubando el sustrato con la enzima soluble, lo cual provoca que sean empleadas solo una vez y, debido a la dificultad técnica que representa el recuperar la enzima activa de la mezcla de reacción, sus restos son desechados sin tratar de recuperarlos. Por esta razón se ha tratado de darles un uso más económico y eficiente, así se ha recurrido a técnicas de inmovilización.

Por otro lado, estudios realizados con anterioridad han puesto de manifiesto que algunas enzimas, como son las pertenecientes al grupo de las oxidasas (alcohol oxidasa, glucosa oxidasa, colesterol oxidasa, etc.) y algunas cinasas entre las que se encuentran la adenilato cinasa y acetato cinasa, presentan elevada sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al oxígeno (O_2), lo cual sugiere la presencia de grupos cisteicos sensibles a la oxidación y esenciales para la actividad. Es por ello que se ha tratado de evaluar el efecto del oxígeno sobre estas enzimas, tomando como parámetros de estudio la actividad enzimática y la cuantificación de grupos sulfhidrilo libres (-SH). Sin embargo, los métodos para cuantificar grupos -SH reportados en la bibliografía

sólo permiten realizar la determinación partiendo de una enzima o proteína en solución.

La importancia económica que representa el uso de enzimas inmovilizadas y la necesidad de conocer el mecanismo de inactivación de algunas enzimas por efecto de agentes oxidantes, llevó a la necesidad de buscar métodos para cuantificar grupos -SH, partiendo de la idea de hacerlo directamente en la enzima inmovilizada, sin necesidad de liberar ésta del soporte. Esto es particularmente crítico para enzimas inmovilizadas por interacciones de tipo covalente, en cuyo caso la partición de la enzima a solución resulta imposible. Es por ello que el presente trabajo está orientado a la búsqueda de las condiciones de trabajo necesarias para cuantificar los grupos sulfhidrilo de una enzima inmovilizada.

Los objetivos del presente estudio son: 1) Seleccionar las condiciones de reacción adecuadas para la determinación de grupos sulfhidrilo, 2) Elección de soportes adecuados para inmovilizar enzimas, que no interfiera con la determinación de grupos sulfhidrilo.

CAPITULO I

GENERALIDADES

CAPÍTULO I

I. GENERALIDADES

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan procesos biológicos. Estas son nombradas y clasificadas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan:

a) Oxidoreductasas:

Comprende todas las enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción (deshidrogenasas, oxidasas, oxígenasas, peroxidasas).

b) Transferasas:

Catalizan la transferencia de un grupo químico, de un sustrato a otro, a excepción del hidrógeno y del agua.

c) Hidrolasas:

Poseen la capacidad de llevar a cabo reacciones de hidrólisis de enlaces C-O, C-N, C-C entre otros.

d) Liasas:

Catalizan la escisión reversible de enlaces químicos, que son desprendidos de sus sustratos, por mecanismos en los que no interviene la hidrólisis (C-C, C-O, C-N y otros enlaces).

e) Isomerasas:

Catalizan el rearrreglo estructural o geométrico dentro de la molécula (racemasa, epimerasa, isomerasa, tautomerasa, mutasa o cicloisomerasa).

f) Ligasas:

Catalizan la unión de dos moléculas con hidrólisis de ATP, el cual proporciona la energía necesaria para llevar a cabo la unión de los primeros.

En general se puede decir que las enzimas presentan las siguientes características generales (Quintero, 1987):

1. Son muy específicas.
2. Funcionan en condiciones moderadas de presión, pH y temperatura.
3. La velocidad de reacción puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de la enzima.
4. Son fácilmente inactivadas después de haber alcanzado el cambio deseado.
5. La velocidad de reacción es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la de los catalizadores inorgánicos.
6. Las condiciones de reacción, temperatura y presión relativamente bajas, hacen que su uso sea menos costoso.
7. Se pueden producir fácilmente y en gran cantidad mediante técnicas genéticas y de fermentación.

Sin embargo, a pesar de tan notables propiedades, las enzimas no han sido ampliamente usadas debido a que presentan algunas desventajas como son:

1. Su inestabilidad en condiciones de operación.
2. Su solubilidad en agua dificultando con ello su separación de los sustratos y productos, por lo que no pueden ser usadas repetidamente.
3. Su costo.

Es por ello que intentando superar estos inconvenientes se ha observado un gran impulso a la aplicación de las enzimas en forma inmovilizada.

La aplicación de las enzimas dentro de los procesos industriales se fundamenta en la evaluación de las siguientes propiedades:

1. Especificidad. Uno de los atributos más sobresalientes de las enzimas es su especificidad, ya que solo ciertos sustratos experimentan su acción y únicamente tiene lugar un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales. Su grado de especificidad puede ser muy variado; algunas poseen una especificidad casi absoluta respecto a un sustrato determinado, y no actuarán sobre otras moléculas aunque estén muy relacionadas; mientras que otras atacarán un grupo de moléculas que poseen una estructura común, aunque lo hagan a velocidades diferentes.

2. Estabilidad. La estabilidad de las enzimas ya sea durante su almacenamiento o en uso, es esencial para su aplicación industrial. Las enzimas en solución acuosa son generalmente inestables y pueden perder actividad durante la reacción, además de que su recuperación resulta costosa. Así mismo, los métodos usualmente empleados pueden causar su desnaturalización, dando como consecuencia que las enzimas no sean re-utilizadas en los procesos por lote o en los continuos.

3. Actividad. La actividad que presenta una enzima se encuentra determinada por su concentración, por la concentración del sustrato así como por la disponibilidad del mismo, la concentración de cofactores, efectos alostéricos, la presencia y concentración de sustancias inhibidoras, la fuerza iónica, el pH y la temperatura.

4. Disponibilidad. La disponibilidad depende de varios factores; a pesar de que las enzimas son producidas por todos los organismos vivos, las provenientes de fuentes microbianas resultan ser las más prácticas para ser usadas con fines industriales. Su obtención resulta más económica ya que no está sujeta a factores de localización de la fuente ó a cambios de las condiciones climatológicas. En la célula se pueden encontrar ya sea en el citoplasma, en el espacio periplásmico, o ser liberada al medio de cultivo de donde son fácilmente recuperadas; adicionalmente el tiempo de producción es en general más corto en relación a las de origen animal o vegetal (Gould, 1978).

1.2 INMOVILIZACION DE ENZIMAS

1.2.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

La inmovilización de enzimas se inició desde 1916, año en que Nelson y Griffin encontraron que un extracto de invertasa era adsorbido sobre carbón activado y que la enzima adsorbida mostraba la misma actividad que la enzima nativa.

En 1948, Summer reportó la inmovilización de ureasa por tratamiento con alcohol y cloruro de sodio. En 1949, la inmovilización de proteínas fisiologicamente activas fue realizada por Micheal y Ewers. Posteriormente, en 1951, Campbell *et al.*, prepararon antígeno inmovilizado por la unión de albúmina con p-aminobenzil celulosa. Subsecuentemente un número de reportes en la preparación y aplicación de antígenos y anticuerpos aparecieron.

En 1953, Grobhofer y Schleith inmovilizaron enzimas tales como; carboxipeptidasa, diastasa, pepsina y ribonucleasa utilizando como soporte una

resina de poliaminopoliestireno diazotado, mediante unión covalente (Chibata,1978).

Durante los años de 1954 a 1961, Mc. Laren y Zittle se preocuparon por la adsorción de las enzimas empleando soportes inorgánicos; mientras que Katchalski (1960) se interesó por la inmovilización de enzimas mediante uniones covalentes a copolímeros orgánicos; a su vez Mitz se dedicó a unir covalentemente las enzimas a soportes de tipo celulósico (Katchalski,1960).

En 1969, con base en las investigaciones realizadas por I. Chibata, la compañía japonesa Tanabe Seiyaku introdujó un método para producir L-aminoácidos a partir de una mezcla racémica usando L-aminoacilasa ionicamente inmovilizada en un soporte de DEAE-Sephadex (Chibata, 1978).

Mattiason y Mosbach, en 1971, realizaron estudios en los que observan que diferentes enzimas presentan mayor eficiencia en su forma inmovilizada que en su forma libre para un proceso particular.

A mediados de la década de los ochentas, C. Wandrey y M.R. Kula lograron a nivel industrial la producción de L-aminoácidos en reactores de membrana (Winfried,1988).

En general se puede decir que se cuenta con un considerable número de métodos reportados para la inmovilización de enzimas, y que ésto se debe en gran parte a que las preparaciones enzimáticas en su forma soluble, presentan una serie de limitaciones en cuanto a su baja estabilidad operacional y a su capacidad de regeneración.

1.2.2. PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

Una enzima inmovilizada es definida como una enzima físicamente confinada o localizada en una cierta región de espacio definida, con retención de su actividad catalítica, lo cual puede ser utilizada repetida y continuamente (Chibata,1978).

Las enzimas al ser inmovilizadas sufren apreciables cambios tanto físicos como químicos. Estos cambios se observan principalmente en su estabilidad y en sus constantes cinéticas, todo ésto debido al nuevo microambiente al cual se encuentran sometidas y efectos causados por productos propios de la reacción. Las ventajas generales que ofrecen las enzimas inmovilizadas se enumeran a continuación (Quintero,1987) :

1. Capacidad de reuso.
2. Son fácilmente separables de los reactantes al finalizar la reacción.
3. Permiten un control más preciso de la reacción.
4. Generalmente presentan un incremento en la estabilidad de operación.
5. Reducen la inhibición por producto.
6. No ocurre autodigestión de enzimas proteolíticas.
7. Se reducen las posibilidades de reacciones inmunológicas.
8. Permite el uso de enzimas de organismos patógenos.
9. Permite la operación al alterar el pH óptimo por modificación característica de la carga del soporte.
10. Se previene que los productos finales no se encuentren contaminados por sustancias proteicas que pueden causar reacciones inmunológicas.

1.2.3. DESVENTAJAS EN LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Una de las desventajas más importantes en la inmovilización de enzimas, corresponde a los cambios en sus propiedades cinéticas. A continuación se mencionan algunos de los efectos más importantes que pueden ocurrir:

- a) Cambios conformacionales causados por modificaciones de las enzimas durante la inmovilización.
- b) Efectos estéricos, debido a la orientación de las enzimas después de la inmovilización.
- c) Partición del sustrato, productos o de los iones entre el volumen de la solución y el soporte empleado en la inmovilización, debido a las interacciones hidrofílicas y electrostáticas que se originan en el medio de reacción.
- d) Efectos microambientales; esto se refleja principalmente en la interacción de la enzima y el sustrato, ya que ésta se encuentra en un ambiente modificado en el que prevalecen en gran parte las propiedades físicas y químicas del material empleado como soporte.
- e) Restricciones difusionales externas en la transferencia del sustrato o de los productos alrededor de las capas circundantes que envuelven a las partículas de las enzimas.
- f) Restricciones difusionales internas en la transferencia del sustrato o del producto dentro del material usado como soporte.

Los tres primeros incisos permiten explicar el decremento que se observa en la actividad específica de las enzimas inmovilizadas en comparación con las enzimas que se encuentran en solución.

Los efectos difusionales son los inconvenientes más importantes de las enzimas inmovilizadas, especialmente cuando las reacciones deben efectuarse con gran rapidez debido a que las concentraciones del sustrato son muy bajas; ésto implica la necesidad de emplear partículas altamente porosas como soportes.

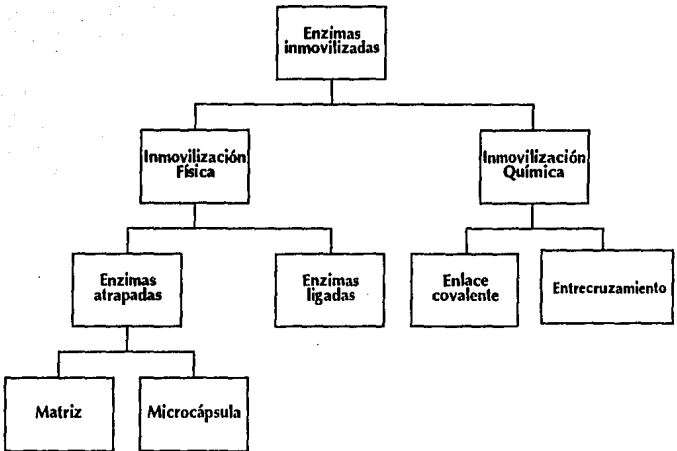
1.3 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

1.3.1 CLASIFICACIÓN

Los métodos para inmovilizar enzimas pueden ser clasificados en dos principales grupos:

1. Métodos de inmovilización física
2. Métodos de inmovilización química

Estos a su vez pueden ser subdivididos en la siguiente forma:



Cada uno de los anteriores casos se ejemplifican en la *Figura 1.1*.

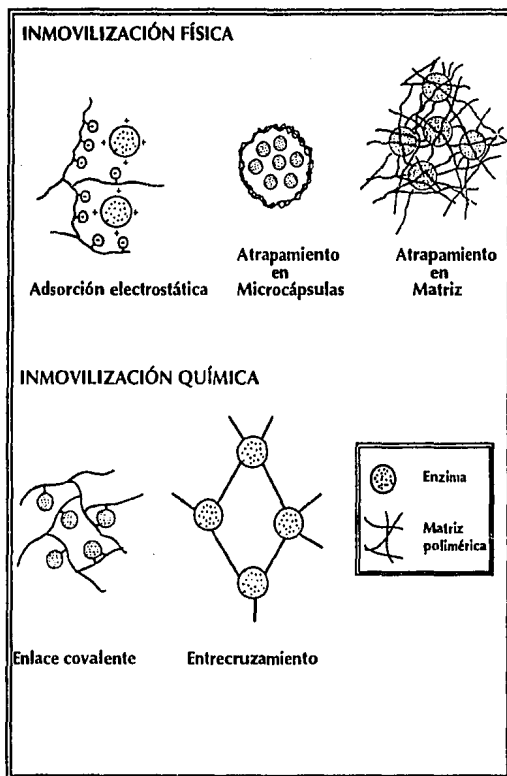


Fig. 1.1 Representación esquemática de las diferentes técnicas de inmovilización.

En la inmovilización de enzimas pueden intervenir diferentes tipos de enlace (Monsan, 1987):

- ♦ Fuerzas de Van der Waals
- ♦ Interacciones hidrófobas
- ♦ Puentes de hidrógeno
- ♦ Fuerzas electrostáticas
- ♦ Quimisorción
- ♦ Enlaces covalentes

Es evidente que cada sistema enzima-soporte no está exclusivamente sujeto a un sólo tipo de interacción, sino a la intervención de una combinación de diferentes fuerzas entre las mencionadas.

1.3.2. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN FÍSICA

1.3.2.1. ENZIMAS LIGADAS POR ADSORCIÓN

Existen una serie de parámetros que pueden influir en la adsorción de enzimas, dentro de los cuales se pueden enumerar los siguientes (Monsan, 1987):

- **CONCENTRACIÓN DE ENZIMA.** Efecto descrito por isothermas de saturación del tipo de Langmuir y de Freunlich, en donde al aumentar la concentración de la enzima en solución se aumenta la masa adsorbida en el soporte hasta llegar a un máximo donde ya no se adsorbe más.

- **TIEMPO DE CONTACTO.** La velocidad de adsorción dependerá de las características fisicoquímicas del soporte y de la enzima; de las dimensiones de las moléculas, las cargas eléctricas presentes, etc., y aumentará con la

temperatura. En las condiciones habituales de inmovilización este tiempo no excede de algunas horas.

- **PH.** El efecto del pH está orientado hacia la modificación de cargas naturales tanto del soporte como de la enzima, según el valor del pH de los grupos ionizables.

- **COMPOSICIÓN DEL MEDIO.** A este respecto se ha visto que la presencia de determinadas concentraciones de solventes orgánicos y de sales produce un efecto favorable a la adsorción.

- **CANTIDAD DE SOPORTE.** En una solución dada es posible ajustar la cantidad de soporte hasta lograr la adsorción de casi la totalidad de la enzima.

- **ÁREA ESPECÍFICA DEL SOPORTE.** El área específica es un parámetro fundamental que puede decidir el que un soporte dado sea adecuado para adsorber una enzima. Los posibles fenómenos de impedimento estérico, así como los gradientes de concentración intraparticular pueden disminuir la actividad enzimática observada, a pesar de adsorber una cantidad considerable de enzima.

a) MÉTODO DE ADSORCIÓN FÍSICA

Este método está basado en la inmovilización de una enzima sobre la superficie de un soporte insoluble en agua, interviniendo fuerzas físicas como son las de Van der Waals y puentes de hidrógeno (Winfried,1988). Algunas enzimas inmovilizadas por adsorción física son mencionadas en la *Tabla 1.1*.

Existe una gran variedad de soportes utilizados en este método entre los cuales se pueden mencionar algunos soportes inorgánicos como son carbón activado, vidrio poroso, Kaolinita, alúmina, silica gel, bentonita, entre otros.

**TABLA 1.1. Enzimas inmovilizadas por adsorción física
(Chibata, 1978)**

SOPORTE	ENZIMA
Concanavalina A	Arilsulfatasa
Butil-sefarosa	Lipoamida deshidrogenasa
Carbón activado	Glucosa oxidasa α -amilasa β -amilasa Glucoamilasa Invertasa
Alúmina	Glucosa oxidasa Glucoamilasa
Bentonita	Invertasa
Kaolinita	Lisozima Invertasa
Vidrio poroso	Glucosa oxidasa Ribonucleasa Lipasa
Silica gel	Fosfolipasa Aspartasa
Oxido de titanio	Lactasa

b) MÉTODO DE ADSORCIÓN IÓNICA (ELECTROSTÁTICA)

Este método se fundamenta en la atracción electrostática que se presenta entre la enzima y el soporte, el cual contiene algún grupo de intercambio iónico

(Winfried,1988) . Entre los soportes empleados para este fin se encuentran los polisacáridos y los polímeros sintéticos que contienen residuos iónicos, por ejemplo, DEAE-Celulosa, CM-Celulosa, Amberlita, Duolita, Dowex, etc.

La unión de la enzima al soporte es fácilmente realizada utilizando condiciones suaves de operación por lo que los cambios conformacionales que se provocan son mínimos o casi nulos.

Debido a que las fuerzas de unión entre la enzima y el soporte son más débiles que cuando se tiene unión covalente, la enzima puede separarse del soporte al encontrarse en soluciones de elevada fuerza iónica o bien debido a variaciones de pH.

Algunas enzimas inmovilizadas por el método de adsorción iónica son listadas en la *Tabla 1.2*.

TABLA 1.2. Enzimas inmovilizadas por adsorción iónica.
(Chibata, 1978)

SOPORTE	ENZIMA
DEAE-Celulosa	Catalasa Invertasa Glucoamilasa Pepsina Proteasa Aspartasa
ECTEOLA-Celulosa	Aminoacilasa D-oxinitrilasa Aminoacilasa
DEAE-Sephadex	Aminoacilasa Aspartasa Glucosa fosfato isomerasa
n-Octilamino-Sephadex	Lactato deshidrogenasa Xantino oxidasa Ribonucleasa Ureasa
Amberlita IR-45	Invertasa Glucoamilasa
Amberlita IRA-93	Invertasa
Amberlita IRA-410	Invertasa
CM-Celulosa	Tripsina α -Quimotripsina Asparaginasa
Dowex-50	Ribonucleasa

Algunas ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización por adsorción son listadas a continuación (Monsan, 1987):

1. El método experimental es extremadamente sencillo; basta con poner en contacto el soporte con la enzima a un pH, una fuerza iónica y una temperatura adecuados y lavar enseguida el complejo para eliminar la enzima débilmente ligada.
2. La desorción de la enzima puede ocurrir con relativa facilidad (lo que quizá pueda considerarse como inconveniente), al modificar el pH o la fuerza iónica; sin embargo, la adsorción puede ser lo suficientemente fuerte como para evitar el lavado de la enzima en condiciones adversas.
3. El soporte puede regenerarse cuando pierde parte de su actividad.
4. La masa de enzimas adsorbidas depende del tamaño de partícula; ciertos soportes presentan problemas de utilización en columna empacada por problemas de caída de presión y taponamiento.
5. Toda enzima es adsorbible, aunque varía la afinidad entre los diferentes soportes.
6. La molécula de enzima no es modificada sensiblemente por la adsorción, pero la actividad del complejo no es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida, ya que puede existir la adsorción en multicapas que limita el acceso del sustrato a las capas internas.
7. El empleo de este método queda excluido para sistemas en los que es imperativo evitar la liberación de enzimas al medio de reacción. Es fundamentalmente aplicable a la inmovilización de enzimas de bajo precio.

8. Existe la posibilidad de aplicar métodos mixtos que consisten en inmovilizar por adsorción, seguidos de una reticulación de las moléculas adsorbidas mediante un agente bifuncional, generalmente glutaraldehído.

1.3.2.2. ENZIMAS ATRAPADAS

Este método está basado en restringir a la enzima, ya sea en la matriz de un polímero o en una microcápsula para lo cual se suele preparar una solución de monómero-enzima, y se procede a efectuar la reacción de polimerización en condiciones lo menos desnaturizantes que sea posible. Este método difiere de la unión covalente y el método de entrecruzamiento en que la enzima no se une por sí misma a la matriz o membrana.

a) ATRAPAMIENTO EN UNA MATRIZ.

Este método incluye el atrapamiento de la enzima dentro del espacio intersticial de un polímero insoluble en agua, es decir, dentro de la matriz de un gel. Es importante considerar que el sustrato y los productos deben ser capaces de atravesar la matriz. Así mismo los poros de la matriz no deben ser tan grandes que permitan que el biocatalizador escape del soporte.

La forma externa de la matriz que contiene la enzima puede variar dentro de un amplio límite dependiendo de la aplicación que se le vaya a dar. Así se tiene forma esférica, cilíndrica, en fibras, entre otras (Winfried, 1988).

Varios son los polímeros naturales y sintéticos empleados para el atrapamiento de enzimas. Algunos polímeros naturales empleados son alginato, carragenina, pectina, agar y gelatina, los cuales presentan la ventaja de no ser

tóxicos y la metodología empleada para la gelificación de éstos es bajo condiciones suaves por lo que son ampliamente utilizados para la inmovilización de células completas y componentes celulares activos (organelos). Dentro de los polímeros sintéticos se pueden mencionar poliacrilamida, alcohol polivinílico entre otros. No obstante, estos materiales sintéticos son altamente tóxicos por lo que generalmente no son empleados para el atrapamiento de células vivas y sí para enzimas libres.

ATRAPAMIENTO EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

El polímero más comunmente empleado para el atrapamiento de enzimas es poliacrilamida. La reacción de polimerización es llevada a cabo por la acrilamida en presencia de N,N'-metilén-bisacrilamida como agente polimerizante. Esta reacción es iniciada con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) o riboflavina y acelerada con β -dimetil-amino propionitrilo (DMAPN), N,N,N',N'-tetrametilén diamina (TEMED) o aluminio (*Fig. 1.2.*).

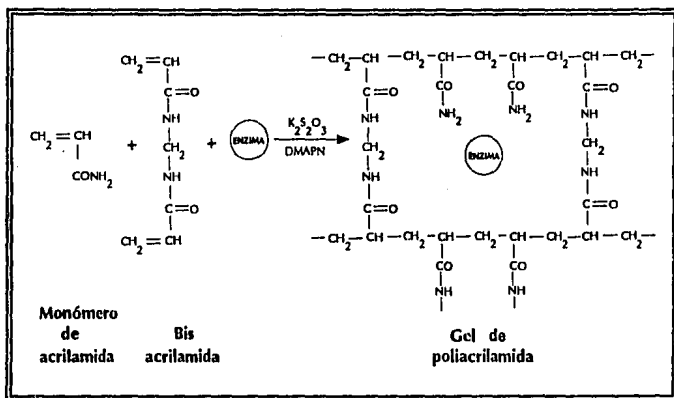
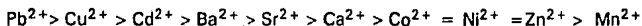


Fig. 1.2. Atrapamiento de enzimas en poli-acrilamida (Winfried, 1988).

ATRAPAMIENTO EN ALGINATOS.

Los alginatos constituyen una familia de copolímeros binarios no ramificados de ácido β-D-manurónico (M) y ácido α-L-gulurónico (G) unidos por enlaces α y β (1→4) glucosídicos. La proporción y el arreglo secuencial de estos ácidos varía dependiendo del organismo y tejido de donde es aislado. (Bucke, 1987).

Se ha demostrado que los alginatos presentan una alta afinidad a iones divalentes como son Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} los cuales se unen principalmente a bloques de ác. gularónico formando así los geles. A continuación se escribe la serie de afinidad para varios cationes divalentes (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990).



El atrapamiento en perlas de alginato de calcio es uno de los métodos de inmovilización más empleado bajo condiciones muy suaves, la suspensión de enzima es mezclada con la solución de alginato de sodio y la mezcla es goteada en una solución de cationes divalentes (generalmente Ca^{2+}), las gotitas forman esferas de gel instantaneamente, atrapando la enzima en un enrejado tridimensional de alginato (*Fig. 1.3.*) (Martinsen *et al.*, 1989).

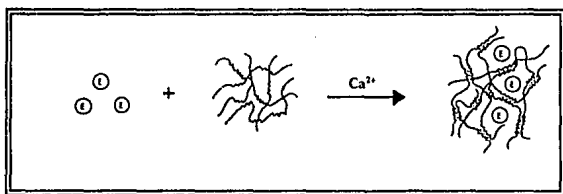
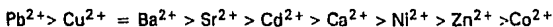


Fig. 1.3. Atrapamiento en perlas de alginato (Martinsen, A. *et al.*, 1990)

El gel de alginato de calcio es una red polimérica inerte tridimensional con espacios intersticiales interconectados. La dimensión de esos espacios varía con el tipo de alginatos y con las interacciones electrostáticas entre la matriz de alginato cargada negativamente y las proteínas u otras especies cargadas. Las propiedades mecánicas de las perlas dependen principalmente de la composición monomérica y tamaño de la molécula de alginato. Se tienen evidencias que

sugieren una correlación entre la resistencia mecánica del gel y la afinidad para los cationes. En general, la rigidez del gel se incrementa con la afinidad excepto para Cd^{2+} y Ni^{2+} .



El tamaño y esfericidad de las perlas depende principalmente de la viscosidad de la solución de alginato de sodio y la distancia entre la jeringa con que se forman las gotas y la solución de cloruro de calcio en que se reciben éstas. La turbidez de los geles de alginato de calcio es generalmente inversa a la fuerza del gel, por lo que alta transparencia en geles son alcanzadas utilizando alginato con un alto contenido de G (mayor a 60%).

Los geles de alginato de calcio, en contraste con otros hidrogeles, son estables en un rango de solventes orgánicos y tienen potencial de uso como matrices de inmovilización para enzimas en sistemas no acuosos (Smidsrød, O. y Skjåk-Bræk, G., 1990)

En general se puede decir que las perlas de alginato presentan las siguientes propiedades generales:

- ⊕ Alta estabilidad mecánica
- ⊕ Estabilidad química
- ⊕ Baja toxicidad pirogénica e inmunogénica
- ⊕ Tamaño de poro definido
- ⊕ Estrecha distribución de poro

Esto puede ser logrado por la selección y purificación de alginatos, selección y control del proceso de gelificación, combinación con otros polímeros (Smidsrød, O. y Skjåk-Bræk, G., 1990).

Entre las limitaciones que presenta el atrapamiento en geles de alginato se pueden mencionar:

Baja estabilidad: Sustancias como el fosfato o citrato, las cuales tienen una alta afinidad por calcio, pueden secuestrar los iones Ca^{2+} y por lo tanto desestabilizar el gel. Debido a que el Ca^{2+} puede ser intercambiado por otros cationes, el gel puede ser desestabilizado por altas concentraciones de iones que no inducen la gelatinización, por ejemplo el Na^+ .

Alta porosidad: La estructura abierta del entrecruzamiento del gel, conduce a pérdida de proteínas por lo que limita el uso a células completas u organelos celulares. Sin embargo, la alta porosidad es una ventaja que permite una alta velocidad de difusión de sustancias y productos.

Toxicidad de algunos cationes: La elevada toxicidad en el uso de algunos cationes como el Pb^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} , limita el uso de estos, por lo que solo Sr^{2+} y Ba^{2+} pueden ser utilizados para atrapar células vivas, además del Ca^{2+} .

b) ATRAPAMIENTO EN UNA MICROCÁPSULA

El método de microencapsulación consiste en rodear la solución enzimática con una membrana polimérica que permite el libre paso de productos y sustratos (Chang, 1964).

Uno de los reactivos es parcialmente soluble en fase acuosa y orgánica y el segundo componente del copolímero es soluble sólo en fase orgánica. Las proporciones de la membrana dependerán del coeficiente de partición entre la fase orgánica y acuosa del reactivo soluble en agua (Monsan, 1987). En este método la enzima y el monómero hidrofílico son emulsificados en forma de cápsulas en el solvente orgánico que no es soluble en agua (ciclohexano y

cloroformo). El tamaño de las cápsulas puede ser influenciado por la intensidad de la emulsificación y por la adición de reactivos de superficie. Los monómeros hidrofóbico e hidrofílico reaccionan en el sitio de contacto (polimerización interfacial) para formar un polímero. Como paso final las cápsulas pueden ser lavadas repetidamente para remover las trazas de monómero.

Algunos monómeros hidrofílicos empleados son: poliamidas, glicoles y polifenoles. Entre los monómeros hidrofóbicos se pueden mencionar formiato dihalogenado y di- y poli-isocianato. Los polímeros formados en la interfase son: poliamidas, poliuretanos, poliésteres y poliureas dependiendo del monómero utilizado (Winfried, 1988).

1.3.3. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN QUÍMICOS

1.3.3.1. ENLACE COVALENTE

La inmovilización de enzimas por enlace covalente es de particular atractivo dada la menor tendencia a que la enzima se pierda con el tiempo. Se trata de efectuar una reacción química entre grupos funcionales de la enzima y del soporte. Estos grupos funcionales no suelen ser suficientemente reactivos por lo que requieren de una activación. Teóricamente podrían activarse tanto los grupos funcionales del soporte como de la enzima; sin embargo, activar estas últimas podría acarrear su desnaturalización. Por lo tanto, los esfuerzos se han centrado en la activación de soportes.

A pesar de existir varios grupos funcionales en las enzimas que podrían reaccionar con soportes activados, en la práctica sólo se han explotado cuatro:

- ❖ Funciones aminadas α y ϵ (lisina y aminoácidos terminales).

- ❖ Funciones ácidas carboxílicas α , β y γ (ácido aspártico, ácido glutámico y aminoácidos terminales).
- ❖ Funciones tiol (cisteína).
- ❖ Anillos fenólicos (tirosina).

Los principales soportes usados en la inmovilización de enzimas por enlace covalente se muestran en la **Tabla 1.3**. (Monsan,1987).

Tabla 1.3. Soportes utilizados en la inmovilización por enlace covalente. (Monsan,1987)

		Grupo activable
Sustancias orgánicas	Celulosa CM Celulosa DEAE Celulosa pAB Celulosa Dextranas Agarosa Almidón (dialdehído) Pectina	-OH -COOH -NH ₂ -Ø-NH ₂ -OH -OH -CH = O -COOH
Proteínas	Colágena	-NH ₂ -COOH
Polímeros sintéticos	Polivinílicos (etileno/anhídrido maleico) Poliacrílicos Poliacrilamida Poliacrilatos Ácido metacrílico	Anhídridos -NH ₂ -COOH -COOH
Sustancias minerales	Vidrio poroso Silicatos de aluminio Óxidos de aluminio	-OH -OH -OH
Soportes mixtos	Magnéticos Organominerales	Variable Variable

Dentro de las ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización por enlace covalente podemos mencionar (Monsan, 1987):

1. La preparación de complejos es más delicada que otros métodos, ya que las condiciones de reacción son, en ocasiones, desnaturalizantes para la enzima.
2. Las cantidades de enzima inmovilizada son menores, lo que da como resultado bajos rendimientos de inmovilización.
3. Se establece una sólida unión enzima-soporte, por lo que el método es adecuado para enzimas de elevado precio, o para sistemas en los que es fundamental evitar la presencia de enzima en el medio de reacción.
4. La inmovilización por enlace covalente se traduce en un cambio en las propiedades de la enzima lo que, en muchos casos, produce un aumento en la estabilidad tanto operacional como de almacenamiento de la enzima.
5. La selección del soporte dependerá de la aplicación prevista, lo que hasta el momento es relativamente empírico, sobre todo porque un mismo método de activación puede dar buenos resultados con una enzima y pésimos con otra.
6. Los soportes orgánicos pueden ser atacados por microorganismos, de lo que resulta una disminución de la vida media del sistema. Sus propiedades mecánicas son de fundamental importancia, así como la densidad de los sitios activos.

1.3.3.2. ENTRECruzAMIENTO (UNIÓN COVALENTE)

El principio de esta técnica consiste en la inmovilización de las enzimas por formación intermolecular de enlaces covalentes, por acción de reactivos bi o multifuncionales, sin utilizar soportes.

Los grupos funcionales de las enzimas que participan en la reacción incluyen los grupos α -amino terminales, los grupos ϵ -amino de las lisinas, los grupos fenólicos de la tirosina, los grupos sulfhidrilo de la cisteína y el grupo imidazol de la histidina. También se emplean agentes bifuncionales simétricos que pueden reaccionar con funciones idénticas en la misma molécula resultando un entrecruzamiento intramolecular o bien con diferentes moléculas, formandose así agregados moleculares (Broun,1976).

La reacción de entrecruzamiento se ha realizado bajo condiciones relativamente severas, por lo que en ocasiones se ve afectada la conformación del centro activo de la enzima, provocando una pérdida significativa de la actividad.

El reactivo bifuncional más comunmente utilizado para el entrecruzamiento es el glutaraldehído. Los aldehídos terminales del glutaraldehído reaccionan con los grupos amino libres de las enzimas formando sustancias del tipo bases de Schiff's (Fig. 1.4.) (Chibata,1978).

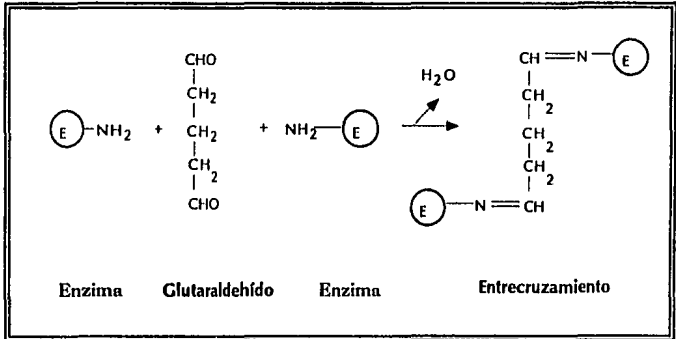


Fig. 1.4. Reacción de entrecruzamiento con glutaraldehído (Chibata, 1978)

Otros reactivos empleados son: diisocianatos (enlaces peptídicos -CO-NH-), bis-diazobencidina (acoplamiento diazo), N,N'-polimetilén-bis-iodoacetoamida (alquilación) y N,N'-etilen bis-maleimida (enlace peptídico), entre otros (Chibata, 1978). Algunas enzimas inmovilizadas por entrecruzamiento son mencionadas en la **Tabla 1.4.**

TABLA 1.4. Enzimas inmovilizadas por entrecruzamiento
(Chibata,1978)

REACTIVO	ENZIMA
Bisdiazobenzidina	Papaina
N,N'-Etilen bismaleimida	α -amilasa
Hexametilén-diisocianato	Ribonucleasa α -amilasa Tripsina
Toluen diisocianato	Aminoacilasa
Glutaraldehído	Alcohol deshidrogenasa Glucosa oxidasa Tirosinasa Catalasa Peroxidasa Carboxipeptidasa A Lisozima Papaina Aminoacilasa

1.4 SOPORTES

1.4.1 CONSIDERACIONES GENERALES

En la actualidad se han reportado una gran cantidad de soportes empleados en las técnicas de inmovilización. Sin embargo, no todos cumplen con las necesidades que se requieren para un determinado objetivo, por lo que es necesario tener una serie de criterios que nos permitan efectuar una adecuada elección o en última instancia utilizar aquel material que cumpla con las necesidades más críticas para obtener un buen biocatalizador (Messing, R.A., 1975).

En primer lugar un soporte deberá ser durable bajo las condiciones en que se use. En otras palabras, la solubilidad del soporte tendrá que ser muy baja en relación al medio ambiente en que operará. Esto no implica que el soporte tenga que ser insoluble bajo todas las condiciones en las que se pueda emplear, sino sólo en aquellas que sean dictadas por el tipo de reacción enzimática en que participará, es decir, pH, fuerza iónica, temperatura, etc.

En forma general, un soporte deberá cumplir con las siguientes características (Kolot, 1988):

a) Buena capacidad de atrapamiento, o una elevada disponibilidad de área superficial, que permita una considerable retención o unión de los biocatalizadores inmovilizados.

b) Durabilidad química respecto a las condiciones ambientales en donde se efectuará la reacción enzimática (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.)

c) Estabilidad dimensional y fuerza mecánica, con el fin de prevenir la compactación del soporte, así como que permita mantener su configuración.

d) Resistencia a la degradación microbiológica; los soportes ricos en fuentes de carbono como el almidón, o ricos en fuentes de nitrógeno como las proteínas son potencialmente buenos nutrientes para los microorganismos.

e) Estabilidad térmica. Aquellos materiales que poseen grandes coeficientes de expansión presentan problemas debido a que al expandirse o contraerse por cambios de temperatura permiten la liberación de las enzimas o de las células. Esto puede ocurrir durante la misma inmovilización o durante las condiciones de operación del bioreactor.

f) Forma y tamaño de partícula; estas dos características tienen su máxima importancia con respecto a la operación de los reactores, ya que en el caso de partículas muy grandes se tienen problemas de difusión, por lo que la actividad enzimática se ve disminuida en comparación a la que se obtiene en los sistemas libres, sin embargo se disminuye considerablemente las caídas de presión, lo que se ve favorecido al emplearse partículas pequeñas.

g) Regeneración del soporte, los soportes que son más fácilmente regenerables son los inorgánicos, ya que pueden ser sometidos a un proceso de pirólisis simple y económico de realizarse. Los soportes orgánicos principalmente los de origen natural, no son regenerables y en el caso de encontrar un proceso que lo permita, resulta generalmente incosteable.

h) Disponibilidad comercial del material.

1.4.2. SOPORTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS.

Los soportes pueden ser divididos dentro de dos categorías: orgánicos e inorgánicos. Los orgánicos a su vez pueden ser subdivididos en polisacáridos, proteínas y polímeros sintéticos. Los polisacáridos pueden ser clasificados de

acuerdo al tipo de subunidad que constituye su cadena. Es decir, los de tipo celulósico, los formados por dextranas y los formados por unidades de agarosa. Los polímeros sintéticos se subdividen en polímeros de acrilamida, copolímeros del fenol, y formaldehído (resinas fenólicas) y finalmente copolímeros del estireno y del divinilbenceno.

Los materiales inorgánicos comprenden varios óxidos y sus combinaciones exhiben una alta termoestabilidad y buenas propiedades de flujo. En solución su superficie se hidroliza y forma grupos hidróxilo que pueden reaccionar directamente con los grupos carboxilo o amino presentes en los aminoácidos de la enzima. Esta reacción ocurre sobre todas las superficies de los materiales inorgánicos y se les denomina soportes no mezclados. Los soportes inorgánicos mezclados son combinaciones de los polímeros con agentes químicos que les proporcionan grupos de enlace covalente (*Tabla 1.5.*) (Kolot,1988).

TABLA 1.5. Clasificación de los soportes de acuerdo a su naturaleza química (Kolot, 1981)

SOPORTES ORGÁNICOS	SOPORTES INORGÁNICOS
Polisacáridos carragenina agar agarosa celulosa sephadex pectinas	No mezclados alúmina zirconio magnesio sílica gel vidrio cerámica ferromagnetita bentonita hidroxiapatita
Proteínas colágena	Mezclados uso de agentes químicos acoplantes
Polímeros sintéticos acrilamida resinas fenólicas polímeros de poliestireno	

El vidrio poroso es el soporte inorgánico más comúnmente utilizado. Contiene una gran cantidad de grupos -OH en su superficie. Procesos especiales permiten la síntesis de "vidrio de poro controlado" (CPG) con poros de 3 a 300 nm de diámetro (Weetall, 1975). Es resistente contra el ataque microbiológico

pero es lábil a la acción de alcalí lo cual puede ser abatido por revestimiento con dióxido de zirconio y grupos funcionales orgánicos.

1.4.3. SOPORTES DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO

1.4.3.1 POLÍMEROS ORGÁNICOS NATURALES (POLISACÁRIDOS)

Los polisacáridos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de subunidad que constituye su cadena. Es decir, los formados por unidades de celulosa, dextranas, almidón o agarosa. Dextrana y Agarosa son generalmente objeto de entrecruzamiento con epíclorhidrina con la finalidad de aumentar su estabilidad y son comercialmente disponibles como sephadex y sepharosa respectivamente.

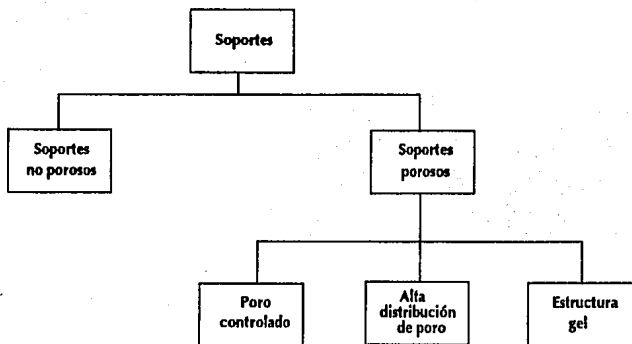
1.4.3.2 POLÍMEROS ORGÁNICOS SINTÉTICOS

Existe una gran variedad de polímeros sintéticos, los cuales pueden ser sintetizados por dos vías. La primera utiliza polímeros prefabricados a los cuales se les introduce grupos funcionales y la otra se basa en copolimerización. La síntesis puede ser acompañada de copolimerización, policondensación o polimerización de compuestos vinilo. Algunos ejemplos de estos polímeros son poliuretano, poliamidas, poliéster, poliaminoestireno, etc. (Meneck *et al*, 1979).

1.4.4. CLASIFICACIÓN DE LOS SOPORTES CON BASE EN SU NATURALEZA

QUIMICA

En la clasificación anterior no se hace gran referencia sobre la morfología de los materiales. Este es un parámetro de importancia por su relación con el área superficial y el tamaño de poro, ya que de ellos depende la cantidad o carga de las enzima que pueden ser inmovilizadas. A continuación se da una clasificación morfológica de los soportes:



Los soportes no porosos presentan una gran desventaja en su uso, debido a que su área superficial es extremadamente baja, dando lugar a que la superficie disponible para la unión de las enzimas sea muy limitada. Los materiales pertenecientes a este grupo son partículas muy finas o fibras. Esto dificulta su separación en las mezclas de reacción, además de que no pueden ser empleados en reactores contínuos ya que provocan altas caídas de presión y limitan el flujo.

Dentro de los materiales no porosos que ofrecen ventajas en su utilización se encuentra el nylon, ampliamente utilizado en medicina por no causar respuestas inmunológicas. Al usarlo la enzima queda superficialmente unida, lo que permite un contacto inmediato con la solución evitando los problemas difusionales.

En el grupo de los soportes porosos encontramos materiales de naturaleza orgánica e inorgánica, así como naturales y sintéticos. Los soportes de poros controlado son adquiridos en el mercado, y son materiales macroreticulados de poliestireno, fabricados principalmente por la compañía Rhom & Hass. En el caso de soportes inorgánicos de poro controlado se pueden obtener de vidrio, titanio y alúmina.

Existen muchos soportes de amplia distribución de poro; frecuentemente empleados como catalizadores de reacciones químicas más que biológicas; un ejemplo de esto es el aluminio.

Los soportes porosos presentan una alta área superficial interna por lo que en muchas ocasiones la unión deberá realizarse dentro de la estructura del soporte. Esto es un inconveniente en el caso de emplear sustratos más grandes que las enzimas mismas, impidiendo de esta forma el paso de las moléculas del sustrato, o solo tendrán acceso por aquellos poros que presenten un mayor diámetro. Otro punto es el microambiente, ya que si el poro se encuentra cargado negativamente y el sustrato también, esto origina que el sustrato sea repelido.

Las ventajas de los materiales porosos son:

1. Presentan una alta área superficial.
2. Las uniones en la parte interna del soporte están más protegidas de los medios ambientes adversos.
3. Si el soporte presenta cargas opuestas a las moléculas del sustrato, se favorece que la reacción se lleve a cabo más rápidamente, ya que se tiene una alta atracción por el sustrato.

Los soportes clasificados como estructura gel son empleados por la técnica de atrapamiento, la cual se explicó con anterioridad y en donde se expuso detalladamente los mecanismos para conseguir formar la matriz del gel. Estos soportes permiten inmovilizar grandes cantidades de enzimas sin que se vean limitados por el área superficial. Su desventaja son los problemas difusionales, además de que solo se podrán emplear sustratos de pesos moleculares bajos (Padilla, 1985).

1.5. APLICACIONES DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

1.5.1. PROCESOS ANALÍTICOS

1.5.1.1. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La cromatografía de afinidad es un proceso de purificación basado en las propiedades específicas de sustancias biológicas. Las interacciones altamente específicas de las enzimas pueden ser utilizadas para la separación y purificación de sustancias biológicas como son enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, hormonas, coenzimas, inhibidores enzimáticos, sustratos y productos enzimáticos entre otros.

El fundamento de esta técnica consiste en seleccionar como ligando una sustancia biológicamente relacionada con la sustancia a purificar, la cual debe ser inmovilizada y utilizada como adsorbente para la cromatografía de afinidad. La muestra que contiene la sustancia a purificar es vertida a través de una columna empacada con el adsorbente, de tal forma que únicamente la sustancia con afinidad específica hacia el ligando inmovilizado será adsorbido en el "acarreador". Las impurezas son removidas lavando el adsorbente y la sustancia adsorbida puede ser eluida de la columna empleando cambios de pH, fuerza

iónica o por adición de otras sustancias que también tengan una alta afinidad por la enzima (por ejemplo un inhibidor, etc.). Fig. 1.5.

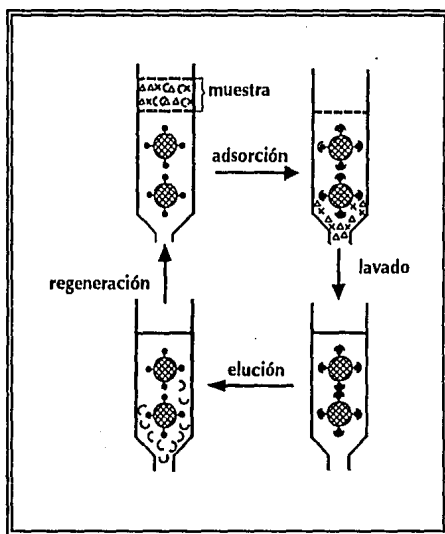


Fig. 1.5. Diagrama esquemático de cromatografía de afinidad.

Dentro de las ventajas de la cromatografía de afinidad podemos mencionar su elevada especificidad, lo que permite la separación y purificación de enzimas, así como la remoción de impurezas las cuales no pueden ser removidas por los métodos tradicionales. Otra ventaja de esta técnica es la posibilidad de reuso de las columnas empleadas, lo que disminuye el costo del proceso (Chibata, 1978).

1.5.1.2 ELECTRODOS BIOQUÍMICOS

Los electrodos bioquímicos también conocidos como biosensores o bioelectrodos han recibido considerable atención en la determinación analítica de metabolitos presentes en fluidos biológicos. Su bio-especificidad está basado en la enzima inmovilizada que emplean.

El electrodo bioquímico consiste en una sección enzimática que reacciona específicamente con el compuesto a estudiar y un transductor que detecta los cambios que se presenten. Existen más de veinte electrodos sensibles a diferentes iones como son NH_4^+ , H^+ , K^+ , Na^+ , I^- , etc. Así como los electrodos sensibles a H_2O_2 ó gas como el O_2 ó el CO_2 .

En la actualidad existe una gran variedad de electrodos bioquímicos entre los cuales se pueden mencionar aquellos destinados a la cuantificación de glucosa, urea, colesterol, penicilina, etc. (*Tabla 1.6.*).

**TABLA 1.6. Ejemplos de electrodos enzimáticos
(Chibata, 1978)**

SUSTANCIA DETECTADA	ENZIMA INMOVILIZADA	ELECTRODO EMPLEADO
L-amino ácido	L-amino ácido oxidasa	Electrodo sensible a NH ₄
Urea	Glucosa oxidasa	Electrodo de O ₂
Penicilina	Ureasa	Electrodo sensible a NH ₄
	Penicilinasas	Electrodo de vidrio
H ₂ O ₂	Catalasa	Electrodo de O ₂
Colesterol	Colesterol oxidasa	Electrodo de O ₂
Acido Láctico	Lactato deshidrogenasa	Electrodo de platino
Lisina	Lisina descarboxilasa	Electrodo sensible al CO ₂

A pesar de la diversidad de aplicaciones que presentan los electrodos bioquímicos, su uso se encuentra limitado por la inestabilidad de las enzimas inmovilizadas empleadas, debido a que generalmente las enzimas son susceptibles a la inactivación durante el proceso de inmovilización o bien durante

el desarrollo de la reacción por productos propios de la misma, por ejemplo el oxígeno, el peróxido de hidrógeno, etc.

1.5.1.3 TIRAS REACTIVAS

Varias casas comerciales han desarrollado en los últimos años reactivos denominados "Reactivos de química seca", los cuales contienen los componentes necesarios en forma de tabletas o de tiras para la determinación rápida (30seg - 2 min), cualitativa o semicuantitativa de uno o varios metabolitos.

Las "tabletas reactivas" permiten determinar un sólo metabolito, mientras que las "tiras reactivas" tienen zonas de prueba para determinar de uno a nueve metabolitos.

La elección del tipo de tira o pastilla reactiva que se utilizan, depende de los metabolitos que se requieren determinar (Curiel, 1989).

La base de casi todos los análisis clínicos rápidos es la tira reactiva diagnóstica de inmersión, que es una tira de plástico a la que se fija una (o varias) almohadillas de celulosa, impregnada con una solución buffer conteniendo la enzima inmovilizada, que permitirá identificar el metabolito en cuestión y un reactivo cromógeno que permite la detección del mismo. Cuando se humedece, cada almohadilla se convierte en un medio químico en miniatura que responde a la presencia de compuestos químicos específicos presentes en la muestra.

Existen una gran variedad de metabolitos detectados con pruebas comerciales, entre los cuales se pueden mencionar glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina, urubilinógeno, sustancias reductoras, etc.

Es importante considerar las limitaciones que presentan las tiras reactivas como son la baja vida de anaquel debido a la inestabilidad de las enzimas empleadas, el elevado costo que presentan, así como las variaciones en la sensibilidad y en los colores durante el transcurso del tiempo. Sin embargo podemos mencionar dentro de las ventajas que ofrecen la comodidad para su uso por su sencillez y rapidez de detección (Tood *et al.*, 1991).

1.5.1.4 APLICACIONES EN EL CAMPO DE LA MEDICINA

Las enzimas inmovilizadas también presentan aplicación en el campo de la medicina, principalmente en la remoción de compuestos indeseables contenidos en la sangre. Esto puede lograrse ya sea administrando enzimas inmovilizadas dentro del cuerpo humano o usando varios dispositivos extracorporales.

A) TERAPIA INTRACORPORAL CON ENZIMAS INMOVILIZADAS

La administración de enzimas en caso de deficiencia enzimática, errores inatos del metabolismo y en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer parece ser una terapia exitosa. Las principales ventajas en el uso de enzimas inmovilizadas es la prevención de degradaciones proteolíticas así como de reacciones inmunológicas.

Enzimas microencapsuladas

La microencapsulación de enzimas es una de las técnicas más utilizadas para la inmovilización de enzimas destinadas a ser inyectadas. La enzima es atrapada dentro de una membrana "polimérica" semipermeable que permite el paso de componentes sanguíneos de bajo peso molecular de tal forma que se evita que la enzima tenga contacto con enzimas proteolíticas, anticuerpos y células productoras de anticuerpos, permitiendo que la enzima mantenga su

actividad por períodos de tiempo largos. Sin embargo una de las limitaciones de esta técnica es la eliminación del material capsular (Winfried, 1988).

B) TERAPIA ENZIMÁTICA EXTRACORPORAL

La aplicación de tratamientos extracorporales proporciona ventajas adicionales a la administración directa de enzimas inmovilizadas en lo que respecta a seguridad y factores técnicos debido por ejemplo, a que pueden ser activados o desactivados los sistemas, mientras que las enzimas inyectadas no pueden ser removidas o inactivadas. La *Fig. 1.6.* ilustra el principio de la terapia enzimática extracorporal.

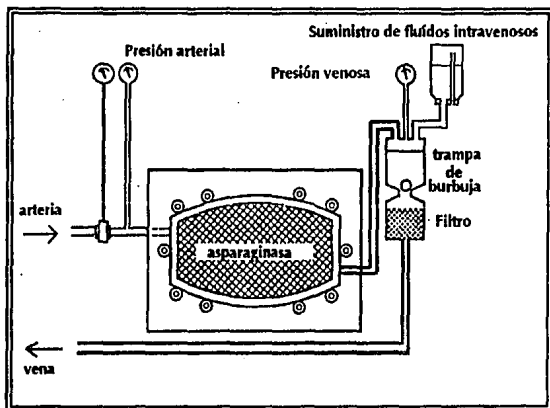


Fig. 1.6. Terapia enzimática extracorporal con asparaginasa inmovilizada

Las terapias enzimáticas extracorporales pueden ser empleadas en tratamientos por envenenamiento, así como en personas con deficiencias enzimáticas o linfosarcoma (Winfried,1988).

Organos artificiales

Un ejemplo muy prometedor para el uso de enzimas inmovilizadas son los organos artificiales, específicamente en el caso de pacientes con transtornos renales. Las terapias son realizadas extracorporalmente removiendo metabolitos de la sangre como son urea y el ácido úrico a través de una membrana de diálisis, como se muestra en la *Fig.1.7*.

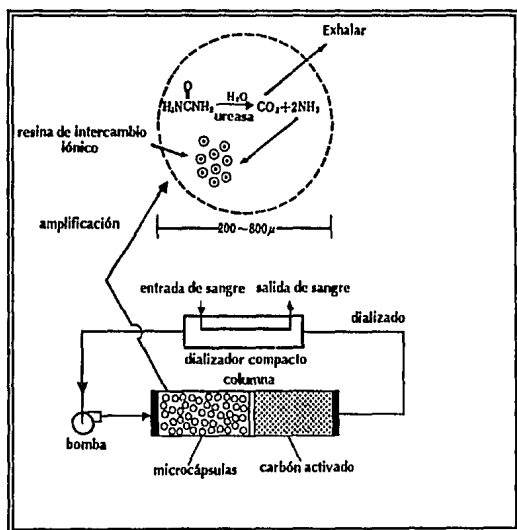


Fig. 1.7. Esquema de un riñón artificial (Wingrove,1988)

La ureasa y la resina de intercambio iónico son microencapsulados, y empacados junto con el carbón activado dentro de una columna. Cuando esta columna y el dializador compacto son conectados, el dializado es bombeado a través de la columna, donde la urea es descompuesta por la ureasa microencapsulada, en amonio y dióxido de carbono. El amonio es removido por la resina de intercambio iónico. El CO₂ es exhalado por los pulmones. Otros metabolitos presentes en el dializado son removidos por el carbón activado. En este sistema el volumen de dializado es considerablemente menor en comparación con el que resulta de métodos convencionales. Sin embargo, es incapaz de realizar algunas funciones normales del riñón como son la remoción de agua o el mantenimiento del balance electrolítico, por lo que el desarrollo de un riñón completamente artificial aun se encuentra en etapas preliminares (Winfried, 1988).

Otra aplicación importante de las enzimas inmovilizadas es aquella en la cual los pacientes necesitan pasar su sangre a través de un organo artificial o por una bomba oxigenadora, en donde se tiene que heparinizar la sangre con el fin de evitar que ésta se coagule dentro del equipo. Posteriormente debe removerse la heparina, antes de que ésta sea reincorporada a la sangre. De no hacerlo se tendrían complicaciones de tipo hemorrágico. Este problema puede resolverse con el uso de un filtro de sangre que contenga la enzima heparinasa inmovilizada, la cual puede degradar en un 99% la actividad anticoagulante de la heparina (Bernstein *et al*, 1987).

5.1.1.5 APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

A) EDULCORANTES

Una de las aplicaciones comerciales más importantes es la producción de jarabes fructosados (jarabe de maíz rico en fructosa).

La industria de alimentos, se encuentra tecnológicamente rezagada en comparación con las industria farmacéutica y química. Aún así, los competidores de las enzimas, los catalizadores químicos, no han podido jugar un papel importante en este caso debido principalmente a que son incompatibles con los alimentos. Por su parte, las enzimas han sido ampliamente usadas por la tecnología de alimentos en procesos tan tradicionales como es la producción de quesos, en panificación, cervecera, producción de aditivos alimenticios, etc.

B) INDUSTRIA LACTEA (LACTASA)

Existe gran cantidad de publicaciones sobre estudios de inmovilización de β -galactosidasa o lactasa (E.C.3.2.1.23). Sin embargo, recientemente se han logrado industrializar dos procesos (García y López-Munguía, 1984).

La lactasa hidroliza a la lactosa en los monosacáridos, glucosa y galactosa, lo que hace accesible la leche y los lácteos a la población con problemas de intolerancia a la lactosa. Asimismo, los productos de la hidrólisis presentan mayor solubilidad que la lactosa, evitándose así los problemas de cristalización asociados.

La lactasa ha abierto amplias posibilidades para la utilización del suero de queso. El suero contiene entre 4 y 5% de lactosa, y cerca de un 1% de proteínas de excelente calidad como principales constituyentes sólidos. Cuando se hidroliza la lactosa del suero y el hidrolizado se concentra a un 60-70% de sólidos, se obtiene lo que se conoce como jarabes de suero. Estos jarabes son

menos viscosos que el suero concentrado y por lo tanto de más fácil manejo, pero sobre todo, tienen un poder endulzante considerable y una cantidad importante de proteínas. Los jarabes así obtenidos pueden utilizarse como sustitutos parciales de azúcar en helados, confitería, productos lácteos endulzados, aderezos, productos de panadería y bebidas refrescantes de alto valor nutritivo.

La lactasa es una enzima cara, lo cual ha sido un obstáculo para su aplicación en forma libre a gran escala. El uso de lactasa inmovilizada reduce considerablemente el costo, y por lo tanto esta tecnología se ha industrializado y goza de un considerable potencial de industrialización (García y López-Munguía, 1984).

C) INVERTASA

La invertasa o β -fructofuranosidasa (E.C.3.2.1.26) cataliza la hidrólisis de la sacarosa en sus constituyentes glucosa y fructosa y se utiliza principalmente en la producción de azúcar invertido, que es más dulce que la sacarosa y permite, dada la mayor solubilidad de los productos de hidrólisis, manejar soluciones más concentradas, por lo cual es de interés para la industria de alimentos. El azúcar invertido se produce actualmente por hidrólisis ácida o utilizando invertasa libre (Bucke, 1981). Actualmente no hay procesos de producción con invertasa inmovilizada. Sin embargo se han hecho estudios piloto en los cuales se han revelado amplias perspectivas para su uso.

La invertasa es una enzima de bajo costo y poca demanda comercial. Sin embargo, la tecnología disponible para la separación de la fructosa y la conversión de glucosa en fructosa, así como la creciente demanda de fructosa cristalina y jarabes de fructosa dan a este proceso un gran potencial para su

Industrialización. Además, la alternativa de manejar soluciones concentradas de azúcar, evitando la costosa e inútil etapa de cristalización, abre también un campo de aplicación para la invertasa, ya que el azúcar invertido es más soluble y disminuye el riesgo de caries dental. Esta posibilidad se está explorando en la compañía Beghin Say de Francia (García y López-Munguía, 1984).

D) PROTEASAS

La utilización de proteasas inmovilizadas no tiene aplicaciones comerciales hasta la fecha. Sin embargo, se ha reportado gran número de trabajos sobre la inmovilización de estas enzimas cuya aplicación se orienta principalmente a tres áreas: la clarificación continua de cerveza, la coagulación de la leche para la fabricación de quesos, y la obtención de hidrolizados de proteínas, principalmente de soya. De las tres aplicaciones, la clarificación de cerveza es, probablemente, la que tiene mayor posibilidad de uso comercial en un futuro cercano, y al respecto existen estudios realizados en planta piloto. Durante el proceso de elaboración de cerveza se solubilizan algunas proteínas y se generan compuestos proteico-polfenólicos de alto peso molecular, de los cuales una proporción permanece en el producto final y que origina turbiedad en la cerveza cuando se refrigera. Para evitar este fenómeno, se ha utilizado papaína (E.C.3.4.22.2) en el proceso. La posibilidad de utilizar papaína o alguna otra proteasa en forma inmovilizada resulta atractiva por el ahorro económico que se obtendría, porque puede volver a utilizarse la enzima, y porque se logra un proceso de clarificación continuo. Por otro lado, no es recomendable una hidrólisis total de los polipéptidos, ya que éstos estabilizan la espuma de la cerveza y pueden generar sabores amargos. Sobre esto, se han llevado a cabo estudios piloto con papaína inmovilizada (Olson y Richardson, 1974).

Las proteasas inmovilizadas se usan también en la coagulación de la leche para la elaboración de quesos. La renina o quimosina (E.C.3.4.23.4) es la proteasa más apreciada en la elaboración de quesos, debido a que efectúa una hidrólisis muy específica y limitada de la kapa-caseína, pero suficiente para iniciar el proceso de coagulación. Otras proteasas hidrolizan las caseínas en forma indiscriminada generando polipéptidos de sabor amargo y una textura inadecuada del queso. Sin embargo, debido a que la renina se obtiene del abomaso de terneros, su disponibilidad está ligada al mercado de la carne, lo cual la vuelve cara e insuficiente; algunas otras proteasas se utilizan como sustitutos de cuajo, tales como las mezclas con renina o pepsina; (Scott, 1979). El uso de renina inmovilizada para la fabricación de quesos permitiría que se utilizara una segunda vez la enzima, con las consecuentes ventajas económicas, mientras que la utilización de otras proteasas inmovilizadas permitiría un gran control de grado de hidrólisis, evitando así los problemas provocados por una hidrólisis excesiva.

E) NARINGINASA

La toronja y algunas variedades de naranja contienen una glucósido flavona, llamada naringina, de sabor amargo muy intenso. Durante el proceso de obtención industrial de jugos de estos cítricos, la naringina que se encuentra en el albedo se mezcla inevitablemente con el producto confiriéndole un sabor amargo intenso, proporcional a la intensidad de la extracción. Mediante el uso de la enzima naringinasa o rhamnosidasa (E.C.3.2.1.40) obtenida de *Aspergillus niger*, puede separarse la parte flavona de la naringina, de aquella glucosídica que consta de una ramnosa y una glucosa. Los productos de la hidrólisis no

tienen sabor amargo por separado. Existen para esto, preparados comerciales de la enzima naringinasa, que son utilizados por los fabricantes de jugos cítricos.

Algunos autores han reportado la posibilidad de inmovilizar esta enzima, para lograr un proceso continuo que elimine el sabor amargo de los jugos. Por otra parte, las preparaciones de naringinasa que se usan en la industria, deben tener un cierto grado de pureza, ya que de lo contrario pueden causar deterioro de la calidad del producto. Al utilizar la enzima inmovilizada se hace innecesaria tal purificación (García y López-Munguía, 1984).

Se han mencionado una gran variedad de aplicaciones de enzimas inmovilizadas; sin embargo sólo algunos de los procesos mencionados presentan aplicación industrial debido a una serie de inconvenientes entre los que se pueden mencionar (Chibata, 1978):

- 1) El soporte o reactivo para inmovilizar es caro.
- 2) La eficiencia de la inmovilización es baja.
- 3) La estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas no es suficiente.
- 4) Se requiere de equipo complejo en reacciones continuas.
- 5) La demanda de productos no es lo suficientemente elevada para obtener ventajas significativas a escala.
- 6) Enzimas inmovilizadas son menos eficientes con sustratos de elevado peso molecular.

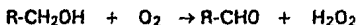
Sin embargo, principalmente la reducida vida media que presentan algunas enzimas aún en forma inmovilizada ha sido la causa de la limitación en el uso de éstas. A raíz de esta serie de inconvenientes se ha tratado de dilucidar el mecanismo por medio del cual las enzimas se inactivan fácilmente durante el

proceso de inmovilización, principalmente en el caso de las oxidasas, dentro de las cuales se encuentra la alcohol oxidasa.

Estudios realizados con anterioridad han puesto de manifiesto que enzimas como son la alcohol oxidasa (Cromartie,1981), glucosa oxidasa, adenilato cinasa, acetato cinasa, (Whitesides,1978) entre otras, presentan elevada sensibilidad al peróxido de hidrógeno, lo que sugiere la presencia de cisteínas esencialmente oxidables. Es por esto que se busca evaluar el efecto del oxígeno sobre la enzima alcohol oxidasa tomando como parámetros de estudio la actividad enzimática y la cuantificación de grupos -SH libres.

1.6. ENZIMA ALCOHOL OXIDASA

La alcohol oxidasa o alcohol:oxígeno oxidoreductasa (E.C. 1.1.3.13) es una de las principales proteínas que intervienen en el metabolismo del metanol. Es una flavoproteína cuyo cofactor es el FAD y cataliza la oxidación de pequeños alcoholes primarios a los correspondientes aldehídos y H₂O₂ en presencia de oxígeno molecular (Geissler *et al.*, 1986 ; Couderc, R. y Baratti, J., 1980).



La forma activa de la enzima es un oligómero de aproximadamente 600,000 Daltons, integrado por ocho subunidades idénticas no covalentemente unidas, cada una de las cuales contiene un grupo FAD asociado covalentemente (Van der Klei *et al.*, 1989).

Durante el crecimiento de levaduras metilotróficas en metanol, se observa una proliferación masiva de organelos subcelulares unidos a la membrana, conocidos como peroxisomas. Estos peroxisomas contienen las enzimas claves en el metabolismo del metanol; alcohol oxidasa, catalasa y dihidroxiacetona sintetasa. Se conoce que la alcohol oxidasa dentro de los peroxisomas forma cristales los cuales han sido extensamente estudiados por microscopia electrónica (Tykarska *et al.*, 1990)

La enzima nativa tiene un espectro de absorción con máximos a 460, 372 y 290 nm (Sahm *et al.*, 1982). Ésta cataliza la oxidación de alcoholes alifáticos primarios como el metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-propen-1-ol y 2-cloroetanol; sin embargo es inactiva en alcoholes con cadenas alquílicas mayores a 5 carbonos, alcoholes secundarios y terciarios, así como alcoholes aromáticos; es decir, la actividad específica y la afinidad disminuyen conforme se incrementa la longitud de la cadena hidrocarbonada (Sahm *et al.*, 1982 y Van der Klei *et al.*, 1990).

Las principales propiedades de Alcohol Oxidasa de *Pichia pastoris* son señaladas en la tabla 1.7. (Couderc y Baratti, 1980; Cromartie, T., 1982; Tagliaro *et al.*, 1991)

Tabla 1.7. Principales propiedades de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (Couderc y Baratti, 1980 ; Cromartie, T., 1982 ; Tagliaro *et al.*, 1991)

PROPIEDAD	VALOR
Masa molecular de la enzima nativa	600,000
Masa molecular de monómero	75,000
Subunidades	8
Cofactor	FAD
Temperatura optima	37°C
pH optimo	7.5-8
Actividad especifica	10-40 I.U./mg
Km (pH 7.5)	0.7 mM (MeOH)
	9.0 mM (EtOH)
Inhibición por H ₂ O ₂	>100 mM
Punto Isoelectrico	5.7-6.3
Nº -SH enzima nativa	8
Nº -SH enzima desnaturalizada	64

Existe una gran variedad de compuestos que inhiben la actividad enzimática de A.O. dentro de los cuales se pueden mencionar ciclopropanona, ciclopropanol, H₂O₂, azida de sodio, p-cloro-mercuribenzoato, Cu²⁺ entre otros (Couderc y Baratti, 1980 ; Cromartie, T., 1982; Van der Klei *et al.*, 1990).

El interés en alcohol oxidasa se origina en su elevada concentración en levaduras metilotróficas, las cuales son consideradas una fuente potencial de biomasa. Sin embargo, recientemente, su producción ha resultado ser más importante y atractiva debido a la baja especificidad de la enzima, lo cual permite orientar su uso hacia síntesis orgánica, previa modificación de sus propiedades a través de mutagenesis dirigida (Tykarska *et al*, 1990).

1.7. CUANTIFICACION DE GRUPOS SULFHIDRILLO (-SH)

Los grupos sulfhidrilo (-SH) son químicamente muy reactivos. Estos reaccionan fácilmente con la mayoría de agentes alquilantes, se combinan con varios metales pesados y son fácilmente oxidados por agentes oxidantes.

Los grupos sulfhidrilo desempeñan un papel muy importante en la estructura de las proteínas así como en su actividad catalítica por lo que el estudio de éstos es de gran interés.

Debido a la importancia química que representan estos grupos, se han desarrollado una gran variedad de métodos analíticos para su cuantificación. Entre los principales reactivos empleados para la cuantificación de grupos -SH se pueden mencionar los siguientes: N-etil maleimida (NEM), o-iodosobenzoato, DTNB, iodoacetamida, p-cloromercuribenzoato entre otros.

1.7.1 TITULACIÓN DE GRUPOS -SH CON N-ETIL MALEIMIDA

N-etil maleimida (NEM) es un reactivo sulfhidrilo ampliamente utilizado para determinar tanto el efecto de la modificación de grupos -SH en enzimas así como el número de grupos -SH presentes en una proteína dada (Riordan y Vallee, 1972).

La reacción de NEM con los grupos -SH involucra la adición del grupo sulfhidrilo al doble enlace olefínico, dando origen a la formación de un tio-éter estable a pH neutro (Fig. 1.8).

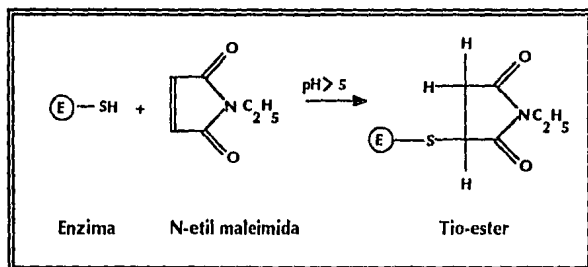


Fig. 1.8. Reacción de titulación de grupos -SH con NEM

La N-etil maleimida tiene un máximo de absorbancia cerca de los 300 nm ($\epsilon = 620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), lo cual es utilizado para seguir la concentración de NEM durante la reacción siendo ésta la base de la determinación (Tsao y Bailey, 1953).

1.7.2 CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS -SH CON DTNB (MÉTODO DE ELLMAN)

El ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) fué descubierto por Ellman (1958) como reactivo estándar para la determinación de grupos -SH reactivos por medición de absorbancia a 412 nm.

El DTNB es un disulfuro aromático, el cual reacciona con tioles alifáticos por una reacción de intercambio para formar una mezcla de disulfuro de proteína y una mol de 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB²⁻) por mol de grupo sulfhidrilo proteico (Habeeb, 1972). El color producido corresponde a la formación de un tio-anión el cual tiene su máximo de absorbancia a 412 nm, pH neutro (Fig. 1.9.).

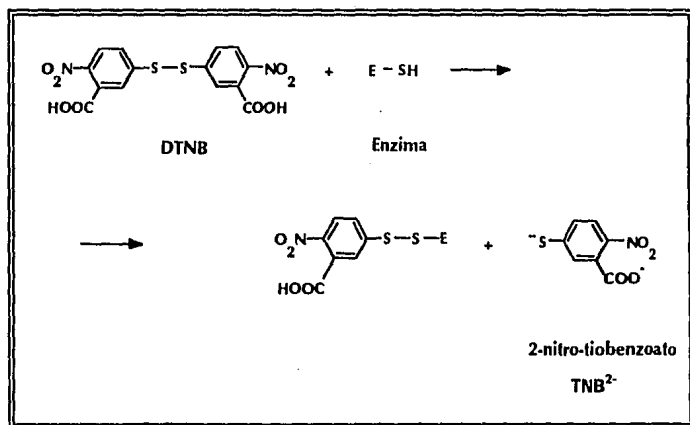


Fig. 1.9. Reacción de titulación de grupos -SH con reactivo de Ellman

El anión p-nitrobenzen-tiol (TNB^{2-}) es un ácido cuyo pK es 5.1, por lo que a pH 7.5 más del 99% se encuentra ionizado y por lo tanto la absorción a 412 nm puede ser utilizada como medida de grupos -SH.

El reactivo de Ellman ofrece una serie de ventajas entre las cuales se encuentra el ser soluble en agua, el poder ser usado a pH neutro, el reaccionar rápidamente con grupos -SH y ser sensible. La sensibilidad del método radica en el elevado coeficiente de absorción del anión TNB^{2-} , el cual es producido junto con la mezcla de disulfuro (Riddles *et al*, 1983). Esta reacción es específica para compuestos que contienen un átomo de azufre capaz de existir como anión a pH 7.5. La reactividad con DTNB que exhiben los grupos sulfhidrilo en proteínas es variable debido a factores estéricos, electrostáticos, de pH y pKa del grupo tiol. Dentro de las interferencias del método se debe de considerar que los metales pesados (Hg, Cu) interfieren en la reacción por formación del enlace Hg-S el cual no da reacción con los disulfuro del DTNB (Ellman, 1958).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

CAPÍTULO II

II. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se dividió en dos etapas: en la primera se determinaron las condiciones de reacción para cuantificar los grupos sulfhidrilo en solución y en la segunda se procedió a seleccionar el soporte y las condiciones adecuadas para cuantificar grupos sulfhidrilo en enzimas inmovilizadas. Todos los reactivos fueron obtenidos de casas comerciales.

2.1. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

Con la finalidad de conocer la longitud de onda de máxima absorción del compuesto colorido producido durante la reacción, se obtuvo un espectro de 300 a 600 nm, antes y después de la reacción (Espectro Beckman DU-65).

Para determinar el tiempo mínimo de reacción se realizaron cinéticas de reacción a 37°C empleando un compuesto rico en grupos -SH como es el ditiotreitól (DTT). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: a 3 ml de DTT 3×10^{-5} se adicionaron 0.02 ml de DTNB (0.1M), la reacción se siguió durante 60 minutos midiendo la absorbancia a 412 nm en intervalos de 2 min

Para conocer la estabilidad del color del anión TNB^{2-} se monitoreó la absorbancia a 412 nm cada 2 min durante 1 hora a partir del desarrollo de color.

Con el fin de conocer el coeficiente de absorción molar del TNB^{2-} a 412 nm se hicieron curvas patrón del TNB^{2-} empleando como solución estándar de

grupos -SH el compuesto ditioneitol (DTT) en un rango de concentraciones entre 10^{-5} y 4×10^{-5} M, los cuales se pusieron a reaccionar con DTNB para producir el anión colorido.

La cuantificación de grupos sulfhidrilo se llevo a cabo de la siguiente manera: A 3 ml de muestra (grupos -SH) se le agregaron 0.02 ml de DTNB 0.1 M, se incubó a 37°C durante 15 minutos. Los grupos sulfhidrilo fueron cuantificados espectrofotométricamente por lectura de absorbancia a 412 nm contra blanco de reactivos. Las condiciones de reacción fueron establecidas previamente.

Con el fin de determinar si el soporte adsorbía el color generado por la reacción se procedió a preparar una solución colorida haciendo reaccionar 3 ml de DTT (4×10^{-5} M) con 0.02 ml de DTNB e incubado a 37°C durante 15 min.

2.2. SELECCIÓN DEL SOPORTE

Una vez establecidas las condiciones de reacción y el coeficiente de extinción se procedió a seleccionar el soporte y las condiciones adecuadas de pH para cuantificar los grupos -SH en enzimas inmovilizadas. Para ello se seleccionó el soporte que permitiera tener la mayor concentración de color en solución y que mantuviera la enzima inmovilizada, tomando como parámetros de selección: la naturaleza del soporte, la concentración de compuestos iónicos en el amortiguador, el pH y la relación enzima/soporte (p/p).

Los soportes empleados fueron:

- a) Dietil-Aminoetil Celulosa (DEAE- Celulosa)
- b) Vidrio Poroso Glicerado (VPG)
- c) Vidrio Poroso no Glicerado (VP no G)

- d) Alúmina
- e) Perlas de Alginato

Estos soportes fueron sometidos a un proceso de lavado previo, con la finalidad de eliminar posibles impurezas presentes. El lavado se realizó colocando aproximadamente 5 g de soporte en un vaso de precipitados y se adicionó buffer de fosfatos (pH 7.5 10^{-3} M), se agitó y se dejó sedimentar. El líquido sobrenadante fue decantado. Se agregó nuevamente solución amortiguadora, se adicionaron unas gotas de HCl 0.1 N, se agitó y se decantó. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento sólo que adicionando unas gotas de NaOH. Finalmente el soporte fue neutralizado con un poco de HCl y lavado con agua destilada hasta tener pH neutro, se seco al vacío y se almacenó para su uso posterior.

2.3 INMOVILIZACIÓN DE ALCOHOL OXIDASA

Con la finalidad de tener una relación conocida entre soporte y la concentración de NaCl, que permitiera tener el color en solución y la enzima inmovilizada, una vez desarrollado el color se procedió a adicionar cantidades conocidas de soporte a la mezcla de reacción y se monitoreó la disminución de absorbancia a 412 nm. La adición de soporte se suspendió cuando prácticamente la absorbancia fue igual a cero. En ese momento se empezaron a adicionar cantidades conocidas de NaCl, con el fin de liberar el color del soporte hasta que prácticamente se alcanzó la absorbancia original. Todas las muestras fueron centrifugadas 2 min a 3000 rpm, para sedimentar las partículas de soporte que pudieran afectar la lectura de absorbancia. Paralelamente, se corrió

un blanco de color sin adición de soporte. Los resultados fueron graficados en una curva de absorbancia vs cantidad de soporte y de NaCl.

Una vez elegido el soporte que permitiera tener la mayor cantidad de color en solución se procedió a verificar si la enzima se podía inmovilizar por adsorción física al soporte seleccionado. Para ello se empleo una solución enzimática de alcohol oxidasa con una concentración de 0.134 mg/ml, a la cual se le adicionaron secuencialmente cantidades conocidas de soporte, y se monitoreó el cambio de absorbancia a 280 nm. Los soportes probados fueron DEAE-Celulosa, vidrio poroso glicerado, vidrio poroso no glicerado y alúmina a pH 6.5, 7.5. y 8.5

Las perlas de alginato fueron preparadas de acuerdo al método descrito por Hlemstra *et al* (1983): 0.5 g de alginato fueron mezclados con 15 ml de buffer Tris (pH 7.5 0.1M), una vez solubilizado se adicionó la proteína (Albúmina Sérica Bovina, Miosina) ó el color, según fuera el caso y se desgasificó la muestra con ayuda de un sonicador. Posteriormente se procedió a gotear la mezcla con una aguja de 0.3 mm y una bomba peristáltica (Masterflex Cole Palmer, Chicago, Ill) sobre una solución en agitación de CaCl_2 (50mM en buffer Tris). Las perlas fueron agitadas durante 2 horas y posteriormente fueron trasvasadas a una solución de CaCl_2 (10mM en buffer Tris) donde se dejaron curtir durante 18 horas a 5°C. Una vez curtidas las perlas fueron lavadas con agua destilada en un embudo Büchner y se almacenaron para su uso posterior. La metodología se muestra en la *Fig. 2.1*.

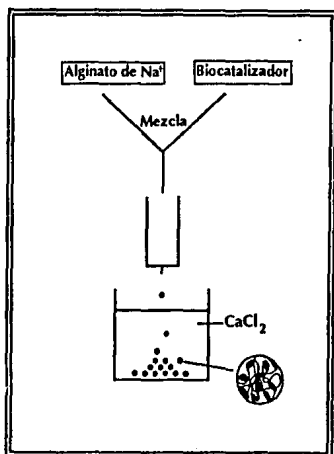


Fig. 2.1. Procedimiento general de atrapamiento en perlas de alginato.

A las perlas de alginato se les realizó el mismo tratamiento que a los demás soportes para demostrar si adsorbían el color o no, es decir, se colocaron en un volumen conocido de color y se monitoreó la absorbancia a 412 nm. En este caso fue necesario considerar el volumen de líquido que contenían las perlas en su interior para evitar errores de dilución. Para ello se empleó una solución más concentrada de DTT.

Para comprobar la libre difusión del color en la matriz de alginato se preparó perlas de alginato con color en su interior empleando 0.5 g de alginato disuelto en 15 ml de color (DTT-DTNB), siguiendo el procedimiento

anteriormente mencionado, y midiendo finalmente el aumento en absorbancia a 412 nm de la solución de CaCl_2 en que se recibieron las perlas.

2.4. INMOVILIZACION DE PROTEÍNAS DE REFERENCIA

Una vez demostrado que el color difundía libremente de las perlas y que no existía adsorción del color se procedió a inmovilizar una proteína en las perlas de alginato. Para ello se eligió albúmina sérica bovina (ASB) por tratarse de una proteína económica y de fácil adquisición en comparación con una enzima; se empleó una concentración igual a 10^{-3}M de ASB.

Para cuantificar los grupos -SH en la proteína inmovilizada, las perlas con alginato conteniendo ASB fueron suspendidas en 15 ml de buffer Tris y se les adicionó 0.1 ml de DTNB, se incubaron en agitación a 37°C y se monitoreó el aumento en absorbancia a 412 nm. Debido a que la cantidad de grupos -SH cuantificados era muy pequeña y la proteína no estaba siendo retenida en el soporte, se procedió a desnaturalizar la proteína con urea para exponer todos los grupos -SH presentes y favorecer la cuantificación de éstos.

Con la finalidad de obtener la concentración de urea óptima que permitiera la mayor titulación de grupos -SH se prepararon soluciones de ASB 10^{-3}M en buffer Tris 0.1 M con diferente concentración de Urea: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 M.

Una vez desnaturalizada la ASB, se procedió a cuantificar los grupos -SH expuestos con ayuda del reactivo de Ellman. Para ello se tomó una muestra de 3 ml de cada una de las soluciones y se les adicionó 0.02 ml de DTNB a cada una, se incubaron a 37°C durante 15 min y se leyó la absorbancia a 412 nm contra

un blanco de reactivos. Se trazó una curva de A vs concentración de urea, eligiéndose la concentración que permitiera cuantificar mayor contenido de -SH.

Para investigar si la urea afectaba la formación de las perlas, se intentó inmovilizar ASB desnaturalizada con urea a concentraciones de 4 a 5 M. Para ello se disolvieron 0.99 g de ASB y 0.5 g de alginato de sodio en 15 ml de buffer Tris-Urea. Se siguió el mismo procedimiento que para las perlas con color y las perlas se recibieron en 1) solución de CaCl_2 50 mM-Urea y 2) solución de CaCl_2 50 mM-Urea con ASB a la misma concentración que en las perlas (10^{-3} M), para evitar la difusión de la ASB hacia la solución de CaCl_2 . Se dejaron curtir a 5 °C durante 18 horas.

Una vez curtidas las perlas se filtraron y se resuspendieron en 15 ml Tris-Urea para la cuantificación de los grupos -SH presentes. En forma paralela se monitoreó la absorbancia a 280 nm para determinar si existía fuga de proteína.

Con la finalidad de tener una mayor respuesta con el reactivo de Ellman y a su vez evitar la fuga de proteína, se trabajó con la enzima miosina por ser una fuente considerable de grupos sulfhidrilo (40 -SH libres) y presentar además un peso molecular de 500,000 g/mol, es decir, prácticamente 5 veces mayor que la albúmina sérica bovina.

Para el atrapamiento de miosina en perlas de alginato se disolvieron 0.26 g de alginato en 8 ml de miosina (4.6 mg/ml), se desgasificó con un sonicador y se goteo con ayuda de una bomba peristáltica sobre 8 ml de CaCl_2 200 mM con miosina; las perlas se curtieron a 5°C durante 48 horas, se filtraron y se lavaron con agua destilada.

Las perlas se resuspendieron en 5 ml de buffer Tris y se les adicionó DTNB para cuantificar los grupos -SH. Se monitoreo la absorbancia a 280 y 412 nm para determinar si se podían cuantificar los grupos -SH presentes y si existía fuga de proteína.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO III

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ANIÓN COLORIDO

Como puede observarse en la *Fig. 3.1.*, el DTNB y el anión colorido TNB^{2-} presentan diferentes máximos de absorción sin sobreponerse. Lo anterior nos permite evaluar el TNB^{2-} sin tener interferencia por parte del DTNB.

Reportes bibliográficos indican que el anión absorbe en un intervalo de longitud de onda de 410 a 420 nm. Considerando nuestros resultados se seleccionó la longitud de 412 nm por ser la de máxima absorción para las condiciones experimentales de trabajo y la de mínima interferencia por parte del reactivo que le da origen.

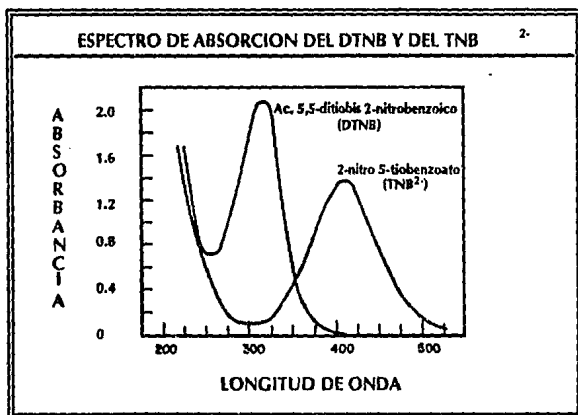


Fig. 3.1. Espectro de absorción del DTNB y del anión TNB^{2-} .

3.2. TIEMPO DE REACCIÓN Y ESTABILIDAD DEL COLOR .

Con el propósito de conocer el tiempo mínimo necesario para llevar a cabo la reacción de cuantificación de grupos -SH a 37°C , se realizó el seguimiento de desarrollo de color durante 60 minutos. En la *Figura 3.2.* se observa que a los 15 minutos de incubación de la muestra con DTNB, prácticamente todo el DTT ha reaccionado formando el anión TNB^{2-} . Una vez formado, el compuesto colorido es estable en un intervalo de 60 minutos.

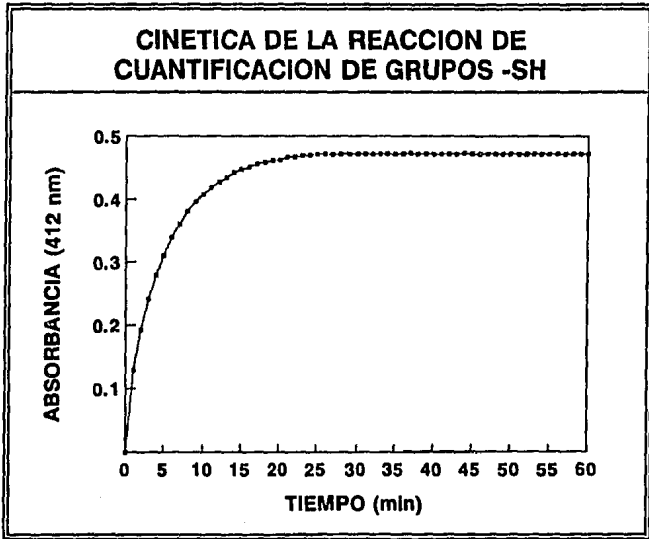


Fig. 3.2. Cinética de reacción del DTT con DTNB

3.3. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR DEL TNB²⁻.

Con el objeto de cuantificar los grupos sulfhidrilo presentes en una enzima dada, se determinó el coeficiente de absorción molar del TNB²⁻ con ayuda de curvas patrón, empleando estándares de DTT en un rango de concentración de 10^{-5} a 10^{-4} M y utilizando una celda de un centímetro de paso. En la *Figura 3.3.* y *3.4.* se observa que la curva tiene un comportamiento lineal en ese rango de concentraciones, por lo que sigue la ley de Lambert y Beer en ese intervalo. Los

ensayos se realizaron bajo dos condiciones diferentes, con urea y sin urea. El coeficiente de extinción calculado con base en dicha ley es de $20,758 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bajo condiciones no desnaturizantes, y de $15,323 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bajo condiciones desnaturizantes (Urea 4M).

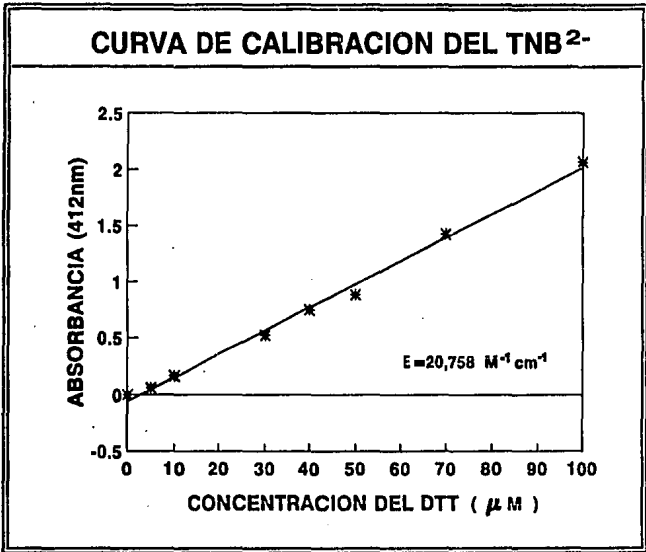


Fig. 3.3. Curva de calibración de TNB²⁻.

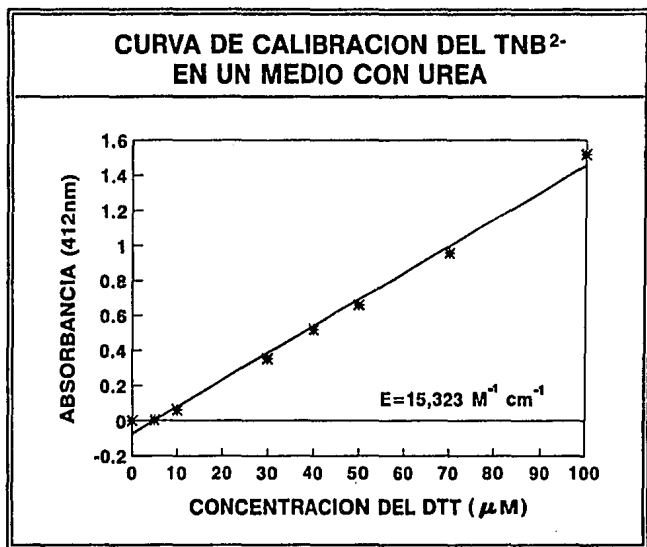


Fig. 3.4. Curva de calibración del TNB²⁻ en un medio con urea.

3.4. SELECCIÓN DEL SOPORTE

Una vez establecidas las condiciones de reacción y el coeficiente de absorción del TNB²⁻ se procedió a seleccionar el soporte que permitiera tener la mayor concentración de color en solución y que mantuviera la enzima inmovilizada. Para ello se procedió a preparar una solución de color con DTT y DTNB a la cual se le fue agregando cantidades conocidas de los diferentes soportes, buscando establecer si el color permanecía en solución o bien era adsorbido al soporte.

3.4.1. DEAE-CELULOSA

En la Fig. 3.5., se muestran dos curvas, la primera corresponde a la absorbancia de una solución de color, la cual es considerada como control; la segunda corresponde a una solución de color a la cual se le adicionó cantidades conocidas crecientes del soporte DEAE-Celulosa.

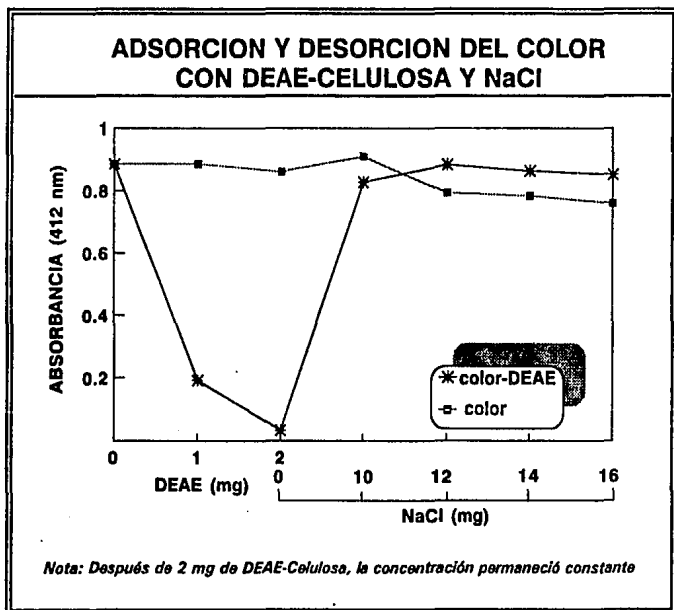


Fig. 3.5. Adsorción del color del anión TNB²⁻ con DEAE-Celulosa y NaCl respectivamente.

Se observa que la absorbancia del color se ve disminuída al aumentar la concentración de soporte adicionado, y al llegar a 2 mg de DEAE-Celulosa, prácticamente todo el color es adsorbido por el soporte.

Con el objeto de ir liberando el color, se decidió adicionar cantidades conocidas de cloruro de sodio.

Se observa que para tener la mayor cantidad de color en solución en presencia del soporte es necesario adicionar 12 mg de NaCl a 3 ml de solución, lo cual representa una limitante debido a que en estudios anteriores se había demostrado que la enzima es liberada del soporte con una concentración de cloruro de sodio igual a 0.1 M. Es decir, bajo las condiciones probadas es imposible cuantificar los grupos sulfhidrilo de la enzima inmovilizada en DEAE-Celulosa sin desorberla del soporte. Por lo anterior se procedió a buscar un soporte que no adsorbiera el color de la reacción o bien un soporte cuya relación gramos de soporte/ gramos de NaCl permitiera mantener la enzima inmovilizada y el color de la reacción en solución.

3.4.2. ALÚMINA

La alúmina es un soporte sin carga neta, el cual se probó agregando cantidades conocidas del soporte a soluciones coloridas (*Fig.3.6.*).

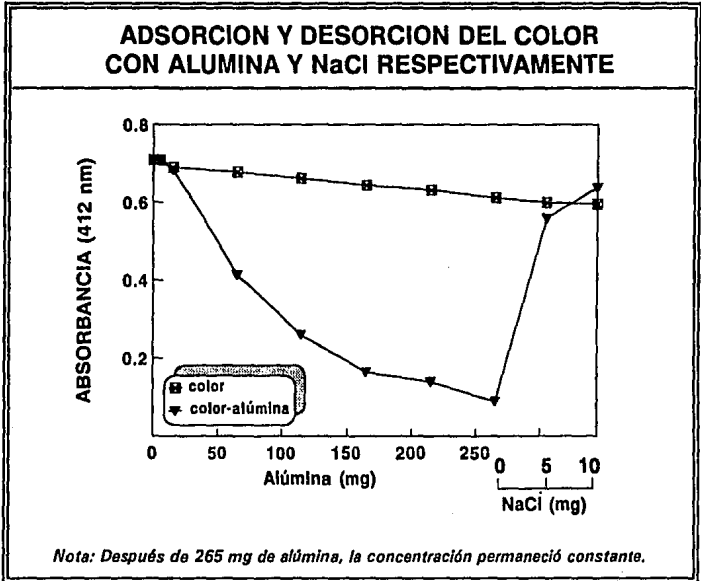


Fig. 3.6. Adsorción del color del anión TNB^{2-} con el soporte alúmina

En la *Fig. 3.6.* se observa que con 0.24 g de alúmina, más del 85% de color es adsorbido por el soporte y para desorberlo se requieren de 5 mg de NaCl; lo anterior nos indica que la alúmina adsorbe en menor proporción el color en comparación con el DEAE-Celulosa. Sin embargo, debido a su menor densidad de cargas positivas sigue siendo una limitante la adsorción del color para poder cuantificar los grupos sulfhidrilo de la enzima inmovilizada.

3.4.3. VIDRIO POROSO GLICERADO

El siguiente soporte estudiado fue el vidrio poroso glicerado (VPG), el cual es también un soporte al cual se le han eliminado cargas residuales; en este caso, menos del 10% de color es adsorbido al agregar 0.13g de soporte por lo que aparentemente resultaba ser el adecuado al no adsorber color (*Fig. 3.7.*).

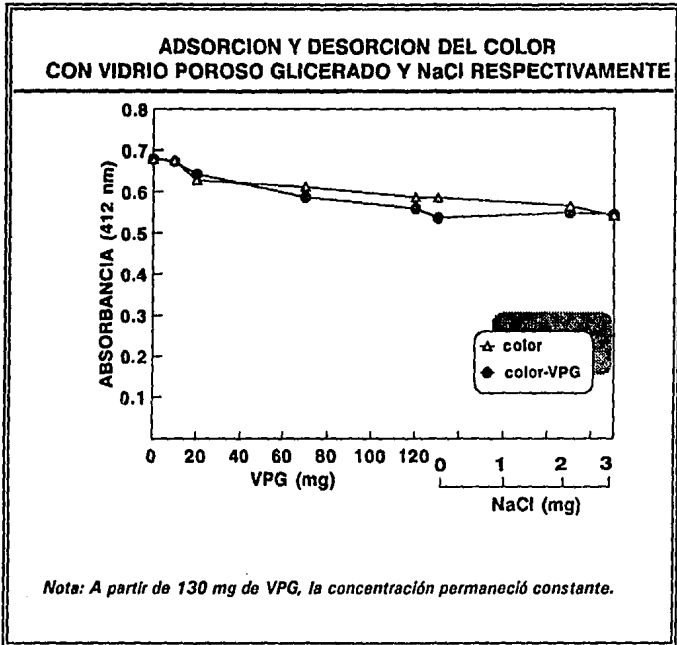


Fig. 3.7. Adsorción y desorción del color del anión TNB^{2-} con el soporte vidrio poroso glicerado.

Sin embargo, al intentar inmovilizar la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* se observó que, al monitorear la absorbancia dada por la enzima en solución a la longitud de 280 nm, ésta no era inmovilizada por simple adsorción física. (Fig. 3.8). El registro marcado como A.O. se refiere a una solución de enzima, cuya absorbancia a 280 nm era determinada al mismo tiempo que la

muestra con soporte. Esta fungió como control, debido a que se había observado que la enzima tiende a coagular conforme transcurre el tiempo

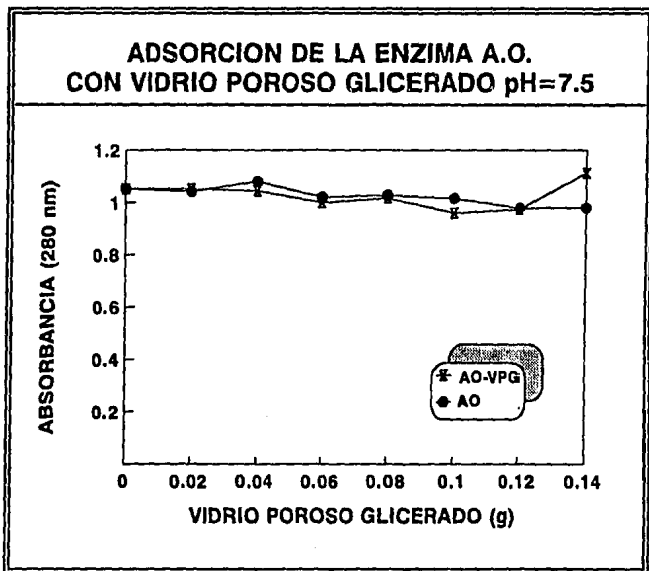


Fig. 3.8. Adsorción de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* con vidrio poroso glicerado.

3.4.4. VIDRIO POROSO NO GLICERADO

Con el fin de evaluar si al variar el pH se modificaban las cargas de la enzima de tal manera que favorecieran su adsorción, se probó el soporte vidrio poroso no glicerado a diferentes valores de pH. Los valores de pH estudiados fueron 6.5, 7.5 y 8.5. Así mismo, se evaluó la adsorción del color a los mismos valores de pH. En este caso el experimento consistió en adicionar una cantidad constante (0.1 g) de vidrio poroso no glicerado tratado (lavado y acondicionado a los diferentes valores de pH) a 3 ml de la mezcla de reacción o a una solución de enzima (0.67 mg/ml). La absorbancia fue monitoreada en intervalos de 15 minutos. En el caso de la enzima, la absorbancia fue medida a la longitud de onda de 280 nm y para el color la longitud de onda fue de 412 nm (*Fig. 3.9, 3.10. y 3.11.*).

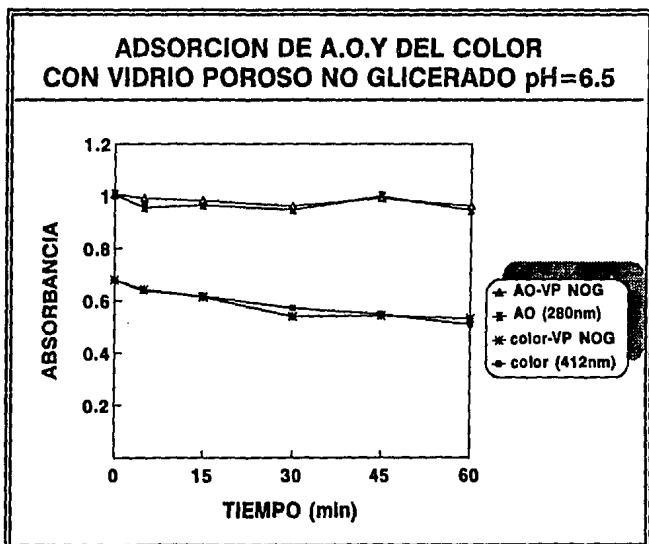


Fig. 3.9. Adsorción de la enzima alcohol oxidasa y el color del anión TNB^{2-} con vidrio poroso no glicerado a $\text{pH} = 6.5$.

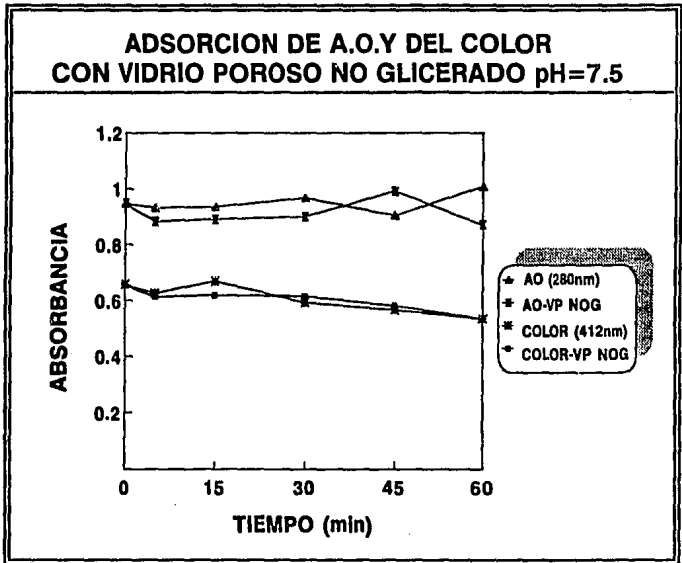


Fig. 3.10. Adsorción de la enzima alcohol oxidasa y el color del anión TNB^{2-} con vidrio poroso no glicerado a $pH = 7.5$.

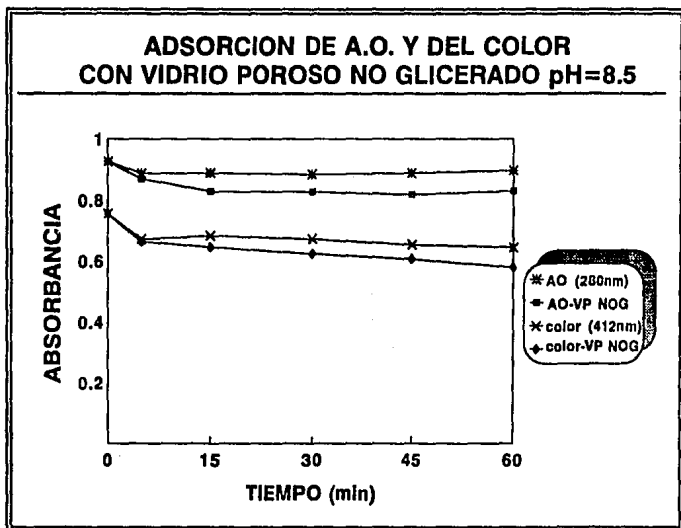


Fig. 3.11. Adsorción de la enzima alcohol oxidasa y el color del anión TNB^{2-} con vidrio poroso no glicerado a $\text{pH} = 8.5$.

En las graficas anteriores el registro marcado como A.O. se refiere a una solución de enzima cuya absorbancia a 280 nm era determinada al mismo tiempo que la muestra con soporte; con respecto al registro marcado como color, se refiere a una solución de color preparada de igual manera que aquella empleada para adicionar el soporte y fue analizada en forma similar.

Bajo estas condiciones se encontró que ni la enzima ni el color fueron adsorbidos en el soporte a los diferentes valores de pH estudiados.

3.4.5. INMOVILIZACIÓN EN PERLAS DE ALGINATO.

Dado que ninguno de los soportes probados para adsorción ó interacción iónica analizados permitió cuantificar los grupos sulfhidrilo por el método de Ellman para la enzima inmovilizada, se procedió a emplear el método de atrapamiento en perlas de alginato.

Para determinar la libre difusión del color del TNB²⁻ dentro y fuera de las perlas, y así garantizar la validez de la determinación se prepararon perlas de alginato con color en su interior a manera de poder visualizar si éste difundía libremente. Las perlas fueron recibidas en una solución de CaCl₂ de manera que se monitoreó el incremento de absorbancia a 412 nm en esta solución. Los resultados son mostrados en la *Fig. 3.12.* en donde claramente se observa que a partir de los 15 minutos de haber recibido las perlas, practicamente todo el color se difunde fuera de las mismas. Esto fue evaluado comparando la absorbancia de la solución en que se recibieron las perlas con la de un control, el cual estaba integrado por una solución de color (DTT-DTNB) y CaCl₂.

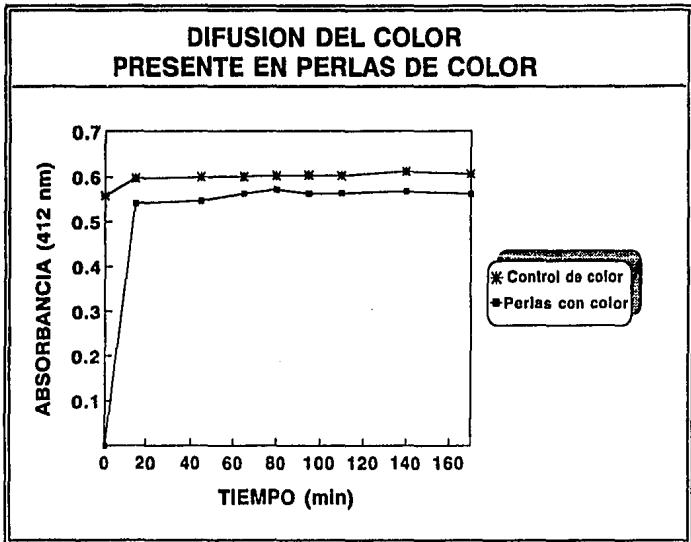


Fig. 3.12. Libre difusión del color del anión TNB^{2-} de las perlas de alginato.

Una vez comprobado que el color de reacción no era adsorbido por las perlas de alginato, se procedió a cuantificar los grupos $-\text{SH}$ de una proteína inmovilizada en perlas. Para ello se empleó albúmina sérica bovina (ASB) como modelo por tratarse de una proteína de fácil adquisición y de precio accesible.

Al finalizar la formación de perlas se cuantificó la absorbancia a 280 nm en la solución de CaCl_2 en que se recibieron para evaluar la liberación de la proteína y se observó que existía una gran cantidad de proteína en solución. Se

procedió a lavar las perlas hasta que prácticamente la absorbancia a 280 nm fue despreciable, buscando eliminar la proteína ubicada en la parte exterior de las mismas. Las perlas fueron resuspendidas en buffer Tris, se les adicionó DTNB y se incubaron a 37°C para cuantificar así los grupos -SH presentes.

Sin embargo, la lectura de absorbancia a 412 nm fue mínima lo cual indicaba total fuga de proteína durante el lavado, lo que provocaba una baja cantidad de proteína en el interior de las perlas y con ello una baja cantidad de grupos -SH cuantificables. Por otro lado, era posible que la exposición limitada de los grupos -SH de la proteína nativa estuviera impidiendo la entrada del reactivo de Ellman y con ello limitando su cuantificación.

Por lo anterior se realizó un balance de proteína dentro y fuera de las perlas partiendo de la solución de ASB empleada para la fabricación de las mismas. De ahí se observó que más del 60 % de la proteína era liberada de las perlas, es decir, aproximadamente sólo el 40% de ASB permanecía dentro de ellas, con lo que se limitaba la detección espectrofotométrica del color. Si se considera que la albúmina sérica bovina contiene un solo grupo sulfhidrilo por mol y la cantidad que quedaba dentro correspondía a 4.9×10^{-6} M de proteína y por lo tanto 4.9×10^{-6} M de grupos -SH, la determinación se encontraba en la parte menos sensible de la curva de calibración y por lo tanto inoperante para los objetivos del estudio.

Con la finalidad de exponer mayor número de grupos -SH de la proteína y a su vez tratar de disminuir la salida de la proteína de las redes del gel, se empleó urea como agente desnaturizante, que modifica la estructura terciaria de la proteína.

Se probaron diferentes concentraciones de urea para conocer cuál de ellas permitía tener el mayor número de grupos -SH titulables. La proteína fue disuelta en buffer con diferentes concentraciones de urea, de tal manera que la concentración final de ASB fue 10^{-3} M. El tiempo de acción de la urea fue de una hora. Posteriormente se adicionó DTNB a cada una de las muestras, se incubaron a 37°C durante 15 minutos y se leyó la absorbancia al término del período de incubación. Los resultados son mostrados en la *Fig. 3.13.* en donde se observa que la concentración de urea que permite tener el mayor número de grupos -SH titulables con el método de Ellman bajo las condiciones de estudio es 5M. Claramente, la desnaturalización expone los grupos -SH para su interacción con el reactivo de Ellman.

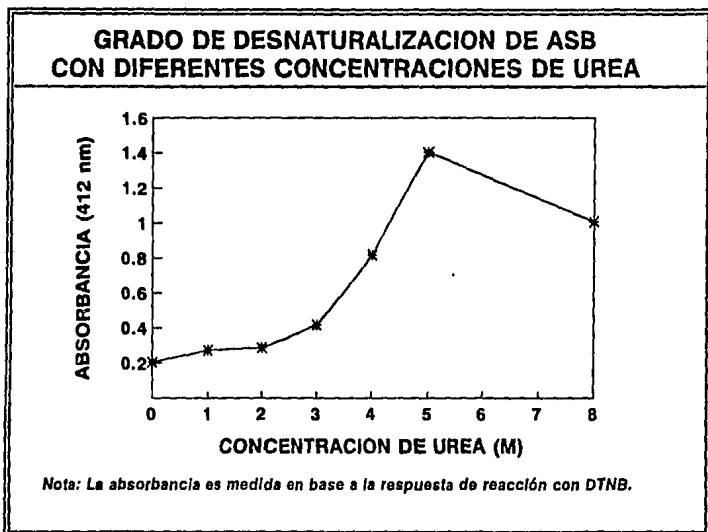


Fig. 3.13. Grado de desnaturalización de la Albúmina Sérica Bovina (10^{-3} M) con diferentes concentraciones de Urea, en base a la respuesta con el reactivo de Ellman.

Se intentó preparar perlas de alginato con ASB desnaturalizada goteando la mezcla alginato-ASB-Urea sobre una solución de CaCl_2 50 mM-Urea 5M. Sin embargo, la mezcla alginato-ASB-Urea gelatinizaba antes de ser goteada en el CaCl_2 , por lo que se redujó la concentración de urea empleada hasta que la pre-gelatinización fue evitada. La concentración de urea necesaria para evitar la gelatinización fue 4 M.

Las perlas de alginato fueron preparadas con ASB desnaturalizada y se monitoreó la salida de proteína a 280 nm. Los resultados se muestran en la Fig. 3.14.

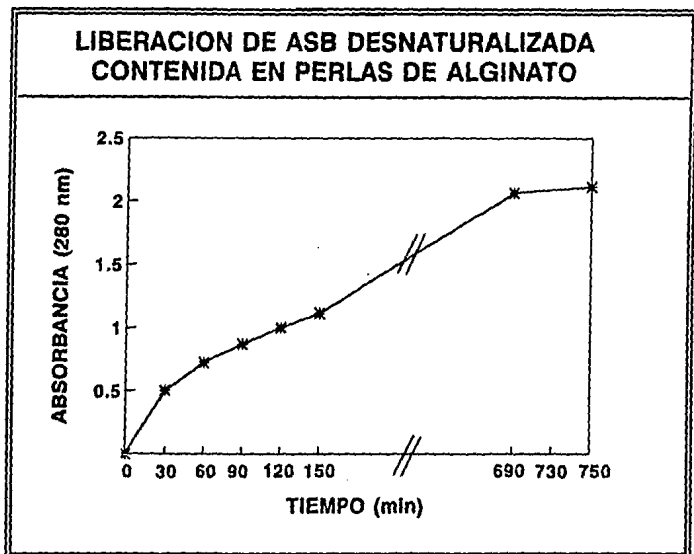


Fig. 3.14. Liberación de Albúmina Sérica Bovina desnaturalizada de las perlas de alginato.

En la Fig. 3.14. se observa que a pesar de inmovilizar Albúmina Sérica Bovina en forma desnaturalizada sigue existiendo fuga de proteína aunque ciertamente más lenta.

Se procedió a preparar perlas con ASB-Urea 4M sólo que a diferencia de las anteriores fueron recibidas en una solución de CaCl_2 (200 mM) que contenía ASB desnaturalizada con urea 4M, intentando reducir la difusión de la ASB. Las perlas se dejaron curtir durante 48 horas a 5°C ; una vez curtidas fueron lavadas con una pequeña cantidad de solución buffer en un embudo Büchner para eliminar el exceso de ASB presente en la pared externa de las perlas y por otro lado descartar la proteína superficial fugada al tener contacto con el buffer. Posteriormente fueron resuspendidas en buffer Tris-urea, se les adicionó DTNB y se incubó a 37°C . La absorbancia a 280 y 412 nm fue monitoreada con la finalidad de comprobar, primero si existía fuga de proteína, y segundo, si realmente se podían cuantificar los grupos -SH de la proteína inmovilizada.

La *Fig. 3.15.* muestra que sigue existiendo fuga de proteína aun después de haber incrementado el tiempo de curtido y la concentración de CaCl_2 en que se recibieron las perlas. Lo anterior puede explicarse a partir del tamaño molecular de la proteína empleada. Es decir, la ASB tiene un peso molecular de 66,000 Dal., por lo que es considerada una proteína pequeña. En este caso prácticamente es imposible inmovilizarla por atrapamiento en perlas de alginato.

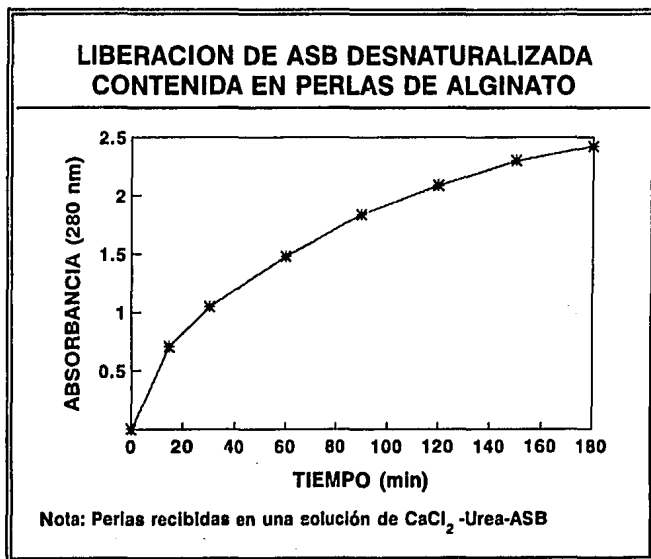


Fig. 3.15. Liberación de Albúmina Sérica Bovina de las perlas de alginato recibidas en una solución de CaCl_2 -Urea-ASB.

La Fig. 3.16. muestra la cuantificación de los grupos -SH presentes en ASB desnaturalizada e inmovilizada en perlas de alginato. En ella se compara el color esperado para la concentración de ASB teórica presente en las perlas (control) y el color que desarrollan las perlas al tener contacto con el DTNB. Ambas curvas están realizadas empleando albúmina sérica bovina desnaturalizada con urea 4M. Se observa que las perlas con ASB no llegan a producir la señal de absorbancia que se esperaría; lo anterior pueden ser debido

a que existe fuga de proteína como se muestra en la Fig. 3.15; sin embargo, puede apreciarse que realmente el color producido durante la reacción puede ser detectado en solución sin necesidad de liberar la enzima del soporte.

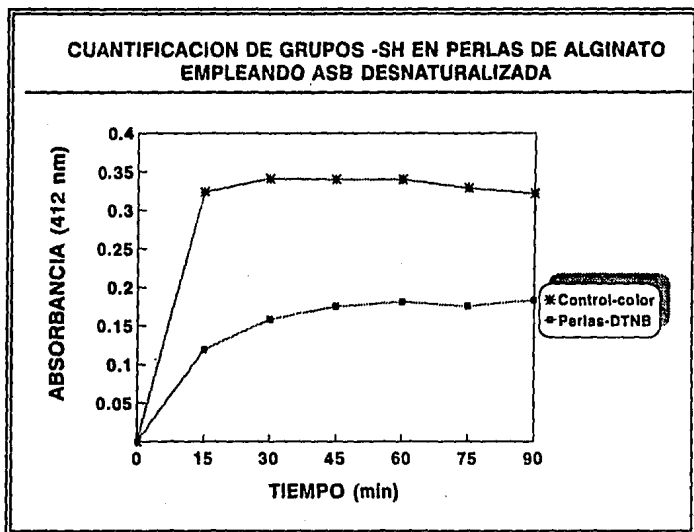


Fig. 3.16. Cuantificación de grupos sulfhidrilo de ASB desnaturalizada e inmovilizada en perlas de alginato. Las perlas fueron recibidas en una solución de CaCl_2 que contenía ASB desnaturalizada.

Los resultados anteriores dieron la pauta para probar una enzima que presentara un peso molecular mayor y a su vez un mayor número de grupos -SH

expuestos, buscando con ello, evitar la fuga de enzima y aumentar la señal de absorbancia.

Se empleó la enzima miosina cuyo peso molecular es de 500,000 Dal. y presenta 44 grupos sulfhidrilo fácilmente titulables.

La miosina fue inmovilizada en perlas de alginato las cuales fueron recibidas en una solución de CaCl_2 con miosina para evitar así la difusión libre. Se dejaron curtir durante 48 horas a 5°C . Una vez curtidas, las perlas fueron lavadas con una pequeña cantidad de buffer Tris y filtradas al vacío, para evitar al máximo la posible fuga de enzima.

Las perlas fueron suspendidas en buffer Tris, se les adicionó DTNB y fueron incubadas a 37°C . Se tomaron lecturas de absorbancia a 280 y 412 nm para monitorear la fuga de enzima y el desarrollo de color respectivamente. Los resultados son mostrados en la *Fig. 3.17. , 3.18. y 3.19.*

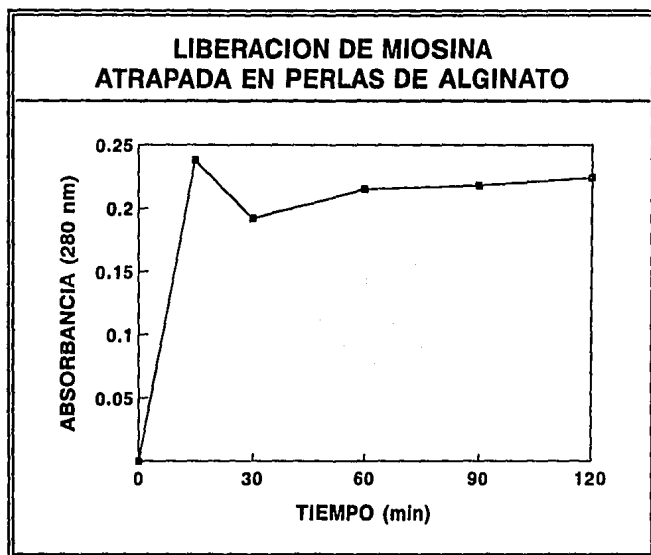


Fig. 3.17. Liberación de miosina Inmovilizada en perlas de alginato

En la *Fig. 3.17.* se observa que una vez colocadas las perlas en la solución amortiguadora de Tris, se tiene un ligero aumento de absorbancia a 280 nm de 0 a 0.24 unidades, esto puede explicarse como resultado de la presencia de una pequeña cantidad de enzima existente en la superficie de las perlas la cual no fue inmovilizada, y al estar en contacto con la solución amortiguadora pasa a solución inmediatamente; posteriormente no se observa fuga de proteína debido a que la absorbancia se mantiene prácticamente constante en el intervalo de 120

min , lo cual nos permite asegurar que la enzima fue atrapada por las redes de alginato, impidiendo con ello la libre difusión de la enzima hacia la solución. Este aspecto fue imposible de controlar en el caso de la Albúmina Sérica Bovina, la cual por tratarse de una proteína de peso molecular inferior difundía con mayor facilidad a través de las redes de alginato, ocasionando con ello una excesiva concentración de proteína en la solución amortiguadora (Fig. 3.15).

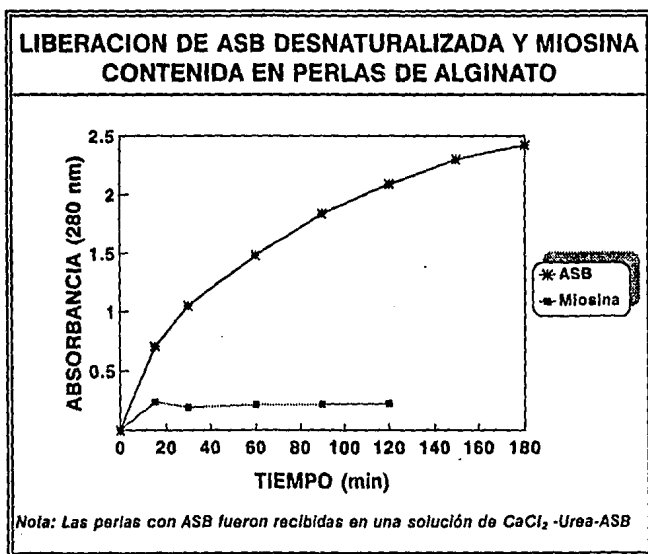


Fig. 3.18. Comparación de la liberación de proteínas de diferente peso molecular inmovilizadas atrapadas en perlas de alginato.

La Fig. 3.18. nos muestra en forma comparativa las diferencias existentes entre la liberación de Albúmina Sérica Bovina y la de Miosina, a través de las redes de alginato, demostrándose con ello que el tamaño de la proteína es determinante para la inmovilización de enzimas por la técnica de atrapamiento.

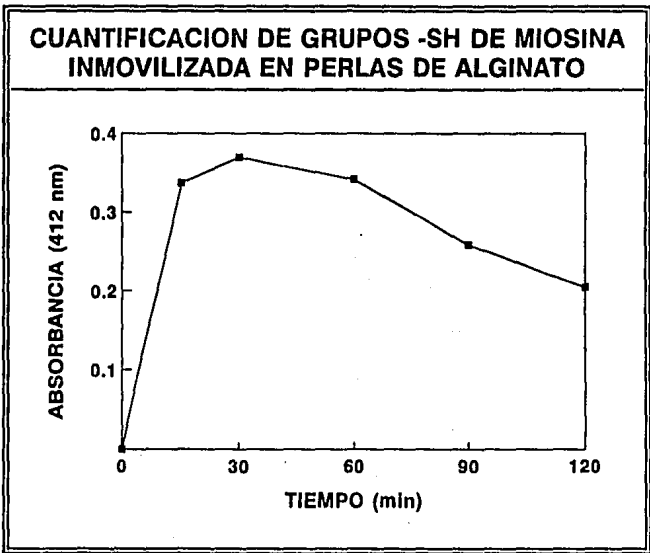


Fig. 3.19. Cuantificación de grupos -SH presentes en miosina inmovilizada en perlas de alginato.

Con respecto a la cuantificación de los grupos sulfhidrilo presentes en la enzima miosina inmovilizada, se puede observar en la *Fig. 3.19.* que al transcurrir 15 minutos de incubación del reactivo de Ellman con las perlas conteniendo miosina, prácticamente la reacción alcanza su máxima respuesta, es decir, las perlas han reaccionado con el DTNB, generando con ello el compuesto colorido TNB²⁻. A su vez, éste difunde al medio circundante en donde es cuantificado espectrofotométricamente teniéndose una respuesta de 0.3 unidades de absorbancia, lo cual nos indica que es posible cuantificar los grupos -SH de la enzima inmovilizada siempre y cuando se encuentren libres y accesibles al reactivo analítico, además de encontrarse en una proporción elevada.

Por otro lado, se observa que a partir de los 60 minutos de incubación, el color de la reacción comienza a disminuir de manera notable, posiblemente como resultado de una reoxidación del anión TNB²⁻. Sin embargo, dicho proceso no se manifiesta tan evidentemente en el caso de la Albúmina Sérica Bovina.

Es importante considerar que el método de Ellman presenta una elevada sensibilidad para cuantificar grupos sulfhidrilo de enzimas en solución. Sin embargo, dicha sensibilidad se ve disminuida significativamente en el caso de enzimas inmovilizadas debido a un efecto de dilución como es el caso del método por atrapamiento en geles de alginato. Esto representa una limitante en el uso de este método, ya que sólo sería aplicable a enzimas o proteínas con un elevado número de grupos sulfhidrilo fácilmente titulables (expuestos).

Por último, cabe señalar que este estudio confirma la posibilidad de cuantificar por el método de Ellman los grupos sulfhidrilo presentes en una enzima inmovilizada sin necesidad de liberarla del soporte; siendo necesario

considerar para tal efecto las características de la enzima como son su punto isoeléctrico, el número de grupos sulfhidrilo disponibles así como la sensibilidad del método, que pudiera afectar la estructura básica de la forma inmovilizada. Sin embargo, para esto es indispensable garantizar la libre difusión del compuesto colorido sin afectar las interacciones de la enzima con el soporte. En principio esta metodología resulta muy conveniente y de menor complejidad para enzimas inmovilizadas covalentemente

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Los soportes DEAE-Celulosa y Alúmina permiten la inmovilización por adsorción de la alcohol oxidasa, sin embargo también adsorben el color del anión TNB²⁻. En ambos casos, para desorberlo se requiere de NaCl en concentraciones que producen la liberación de la enzima, por lo que su uso no es recomendable para determinar cuantitativamente (por el método de Ellman), el número de grupos sulfhidrilo presentes en una enzima inmovilizada.

La enzima alcohol oxidasa no se inmoviliza sobre los soportes Vidrio Poroso Glicerado (VPG) y Vidrio Poroso no Glicerado (VP no G) en el intervalo de pH de 6.5 a 8.5.

En la inmovilización por atrapamiento en geles de alginato, el tamaño de la proteína parece ser determinante en el rendimiento de proteína inmovilizada, sobre todo en aquellas de P.M. bajo, como en el caso de Albúmina Sérica Bovina (ASB) de 66,000 Dal.

La difusión de ASB a través de la matriz de alginato fue poco modificada por el incremento en el entrecruzamiento del gel al aumentar la concentración de CaCl_2 .

El problema de difusión de las perlas de alginato se reduce notablemente en proteínas de P.M. mayor (Miosina 500,000 Dal.)

El método más adecuado para inmovilizar una enzima por métodos físicos, resulto ser el atrapamiento en geles de alginato, debido a que el TNB^{2-} generado en el seno de las perlas difunde libremente hacia la solución exterior.

El método empleado es poco sensible para proteínas con pocos grupos -SH expuestos y solo parece ser aplicable a proteínas con un alto contenido en cisteínas.

El método es potencialmente aplicable para enzimas inmovilizadas químicamente en soportes de baja carga iónica.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Bernstein, H. G.; Yang, V. C.; Langer, R. (1987) Distribution of Heparinase Covalently Immobilized to Agarose: Experimental and Theoretical Studies *Biotechnol. Bioeng.* 30 : 196
- Bernstein, H. G.; Yang, V. C.; Langer, R. (1987) Immobilized Heparinase: In Vitro Reactor Model *Biotechnol. Bioeng.* 30 : 239
- Broun, G. B. (1976) Chemically Agregated Enzymes *Methods in Enzymology* Vol.44 Academic Press N.Y.
- Buchholz, K., Gödelmann, B. (1978) Macrokinetics and Operational Stability of Immobilized Glucose Oxidase and Catalase *Biotechnol. Bioeng.* 20 : 1201
- Bucke, C. (1981) Enzymes in Fructose Manufacture *Enzymes and Food Processing*. Ed. Birch, G.G.; Blakebrough N. y Parker K.J. Applied Science Pub. Ltd.
- Bucke, C. (1987) Cell Immobilization in Calcium Alginate *Methods in Enzymology* 135 : 175
- Campbell, D. H.; Luescher, E. y Lerman, L. S. (1951) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 37 : 375. (Citado por Chibata, I. *Immobilized Enzymes Research and Development* John Wiley and Sons, Japón 1978)
- Chang T., M. S. (1964) Semipermeable Microcapsules *Science* 146 : 524
- Chibata I. (1978) *Immobilized Enzymes Research and Development* John Wiley and Sons, Japón
- Couderc, R. y Baratti, J. (1980) Oxidation of Methanol by the Yeast *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase *Agric. Biol. Chem.* 44 [10] : 2279

- Cromartie, T. H. (1981) Sulfhydryl and Histidyl Residues in the Flavoenzyme Alcohol Oxidase from *Candida boidinii* *Biochemistry* 20 : 5416
- Cromartie, T. H. (1982) Suicide Inactivation of the Flavoenzyme Alcohol Oxidase by Cyclopropanone *Flavins and Flavoproteins* (Massey, V. & Williams, C. H., Eds) Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- Curiel, P. (1989) *Desarrollo y Tecnología Nacional para la sustitución de tiras reactivas para el diagnóstico rápido de diabetes mellitus* Tesis Facultad de Química, UNAM
- Ellman, G. (1958) A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74 : 443
- García, G. M. y López-Munguía, C.A. (1984) Enzimas Inmovilizadas y su aplicación en la Industria Alimentaria. *Ciencia y Desarrollo* N° 58 Año X Sept-Oct.
- Gould, B. J. (1978) *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. Vol.2, Ellis Horwood Limited, N.Y.
- Grubhofer, N.; Schleith, L. (1953) Modifizierte Ionenaustauscher als Spezifische Adsorbentien *Naturwissenschaften* 40 : 508
- Habeeb, A. F. S. A. (1972) Reaction of Protein Sulfhydryl Group with Ellman's Reagent *Methods in Enzymology* Vol. 25 [37] : 457
- Hiemstra, H. ; Dijkhuizen, L. y Harder, W. (1983) Diffusion of Oxygen in Alginate Gels Related to the Kinetics of Methanol Oxidation by Immobilized *Hansenula Polymorpha* Cells *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18 : 189
- Katchalski, E.; Bar-Eli, A. (1960) A Water-insoluble Trypsin Derivative and its Use as a Trypsin Column *Nature* 188 : 856
- Katchalski, E. (1962) *Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins* The Univ. of Wisconsin Press.
- Kolot, B. F. (1981) Microbial carriers-strategy for selection *Process Biochem.*, (Aug/Sept.) pp 2-9
- Kolot, B. F. (1988) *Immobilized Microbial Systems* Robert E. Krieger Publishing Company

Manecke, G.; Ehrenthal, E. y Schlüsen, J. (1979) **Characterization of Immobilized Biocatalysts Monographs N° 1724-1731 Vol. 84 DECHEMA** Edited by K. Buchholz, Frankfurt am Main.

Martinsen, A.; Skjåk-Bræk, G. y Smidsrød, O. (1989) **Alginate as Immobilization Material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate gel Beads Biotechnol. Bioeng. 33 : 79**

Mattiasson, B.; Mosbach, K. (1971) **Studies on a matrix-bound three-enzyme system Blochim. et Biophys. Acta 235 : 253**

Mc. Laren, A. D. y Estermann, E. F. (1956) **Arch. Biochem. Biophys. 61 : 158**

Messing, R. A. (1975) **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors Academic Press**

Micheel, F.; Ewers, J. (1949) **Makromol. Chem., 3 : 200 (Citado por Chibata, I. Immobilized Enzymes Research and Development John Wiley and Sons, Japón 1978)**

Monsan, P. (1987) **Métodos de inmovilización de enzimas Tecnología Enzimática UNAM Compilación: López-Munguía, C.A., Quintero, R.R.**

Nelson, J. M.; Griffin, E. G. (1916) **Adsorption of invertase J. Am. Chem. Soc. 38 : 1109**

Olson, N. F. y Richardson, T. (1974) **Immobilized Enzymes in Food Processing and Analysis J. Food Sci. 39 : 653**

Padilla, C. M. (1985) **Desarrollo de un método de inmovilización por atrapamiento de células completas de *E. coli* con actividad de penicilino amidasa, empleando como soporte agar. Tesis Fac. Química, UNAM.**

Quintero, R. R. (1987) **Introducción a la tecnología enzimática Tecnología enzimática UNAM, México**

Riddles, P. W.; Blakeley, R.L. y Zerner, B. (1983) **Reassessment of Ellman's Reagent Methods in Enzymology 91 : 49 Academic Press, Inc.**

Riordan, J. F. y Valle B. L. (1972) **Reactions with N-Ethylmaleimide and p-Mercuribenzoate Methods in Enzymology 25 : 449.**

- Sahm, H., Schütte, H. y Kula M. R. (1982) Alcohol Oxidase from *Candida boidinii* *Methods in Enzymology* 89 : 424 Academic Press., Inc.
- Scott, R. (1979) Rennets and Cheese *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* 3^a Ed. Wiseman A. Ellis Horwood Limited
- Smidsrød, O y Skjåk-Bræk, G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells *Trends in Biotechnol.* Vol. 8 N° 3 (71)
- Summer, J. B. (1948) *Science* 108 : 410 (Citado por Chibata, I. *Immobilized Enzymes Research and Development* John Wiley and Sons, Japón 1978)
- Todd, C. J.; Sanford, H. A. y Wells, B. B. (1991) *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* W.B. Saunders Company
- Tosa, T.; Mori, T. y Chibata, I. (1969) Studies on continuous enzyme reactions. IV. Enzymatic properties of the DEAE-Sephadex-aminoacilase complex *Agric. Biol. Chem.* 33 : 1053
- Tramper, J.; Müller, F. y Van der Plas, H. C. I. (1978) *Eur. Congr. Biotechnol. preprints part 1*, p. 114
- Tsao, T. y Bailey, K. (1953) *Biochim. et Biophys. Acta* 11 : 102
- Van der Klei, I. D., Bystrykh, L. V. y Harder, W. (1990) Alcohol Oxidase from *Hansenula polymorpha* CBS 4732 *Methods in Enzymology* 188 : 420
- Van der Klei, I. D., Lawson, C. L., Rozeboom, H., Dijkstra, B. W., Veenhuis, M., Hol, W.G.L. (1989) Use of electron microscopy in the examination of lattice defects in crystals of alcohol oxidase *FEBS LETTERS* 244 [1] : 213
- Wandrey, C. (1984) Bioreaktoren für den Einsatz von Enzymen *Forum Mikrobiol (Sonderh Biotechnol)* 7 : 33
- Weetall, H. H. (1975) Immobilized Enzymes and their Application in the Food and Beverage Industry Process. *Biochem.* (Jul/Aug) pp 3-30
- Whitesides, G. M. (1978) Organic Synthesis using cofactor requiring enzymes *Enzymes the Interface Between Technology and Economics* Edited by James P. Sanely and B. Wolnak. Chicago

Winfried, H. (1988) **Immobilized Biocatalysts** Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.

Zittle, C. A. (1953) Adsorption studies of Enzymes and other proteins. **Adv. Enzymol.** 14 : 319