



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología y Ciencias Ambientales
Ingeniería Ambiental

**Inmovilización de la β -Glucosidasa en Microesferas
Magnéticas de Quitosano-Fierro para optimizar el proceso de
Hidrólisis en la producción de Bioetanol**

TRABAJO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL

AUTORES:

Marcela González Belmar

Blanquita Acevedo Dote

PROFESOR GUÍA:

Dr. Joao Ricardo Cerqueira Pinto

Valparaíso, Noviembre del 2013

*Dedicado a todos aquellos
que nos apoyaron y nos ayudaron
en alcanzar este gran logro*

AGRADECIMIENTOS

Por sobre todo agradezco a Dios, porque sé que solo su misericordia y su infinito amor me han permitido llegar hasta el final de este camino, por ayudarme en los momentos más difíciles y nunca apartarse de mí. “*Porque Jehová da la sabiduría y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia*” (Proverbios 2: 6).

A mi madre y mi padre por su incondicional apoyo a lo largo de todo este camino, por quererme y darme todo lo necesario para llegar hasta aquí. Sin ustedes no lo habría conseguido nunca.

A mi hermano, Hugo, porque desde la distancia en todo momento me dio su apoyo, desde el primer día supo que llegaría hasta el final

A mi profesor guía, Joao Cerqueira, por su paciencia y gran dedicación, por confiar en que lograríamos terminar este largo trabajo.

A mi compañera de carrera y tesis, Marcela González, por su amistad durante estos años, porque junto a ella terminé este camino.

A mi querida abuela por su constante preocupación, su gran cariño y por darme ánimo en todo momento.

A mi tía Lucy, que aunque ya dejó este mundo, desde donde esta sé que me observa orgullosa por este logro.

A los profesores Ociel Cofré y Jairo Valencia.

Y a todos los que de alguna forma pusieron de su parte para permitirme llegar hasta aquí y me ayudaron a hacer realidad todo esto; familiares, amigos, compañeros de curso, auxiliares de la facultad...

... a todos muchas gracias.

Blanquita Acevedo Dote

Para finalizar este largo proceso no me queda más que agradecer a todos los que me apoyaron para poder alcanzar esta gran meta.

Primero agradezco a Diosito por brindarme una linda familia, por guiar mis pasos y permitirme salir adelante con Fe y Esperanza.

A mis padres por darme su cariño y amor, por su gran esfuerzo y dedicación durante toda mi vida, por entregarme su apoyo incondicional y ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis hermanos que me apoyaron, sobre todo a Juan Pablito por brindarme su apoyo, alegría y cariño.

A mis abuelos que ya no están, porque sé que estarían felices con este logro y a mi abuela Olga por su cariño.

A mi profesor de tesis Joao Cerqueira, que con sus conocimientos, gran disposición y paciencia, nos apoyó en todo momento en que lo requerimos, por guiarnos y corregir nuestros errores y permitirnos ahora llegar a ser profesionales.

A mi compañera Blanquita Acevedo, que compartió conmigo durante toda la carrera y me apoyo en esta gran tarea.

A los profesores Ociel Cofré y Jairo Valencia.

A la gente que trabaja en la Universidad, los tíos del aseo que estuvieron allí y nos dieron agüita caliente en los días de frío.

Finalmente agradecer a todos los que aportaron un granito de arena en la trayectoria de mi carrera: amigos, compañeros, profesores, familiares y a todos los que en algún momento me dieron su ayuda...

Muchas gracias a todos.

Marcela González Belmar

RESUMEN

La biomasa de origen lignocelulósico es la más abundante en la tierra, por este motivo este material resulta atractivo para la generación de biocombustibles entre los que se destaca el bioetanol, cuya obtención consta de tres etapas principales: pretratamiento, sacarificación y fermentación. En la última parte de la sacarificación se utiliza β -Glucosidasa para degradar celobiosa a glucosa, un proceso que es costoso y poco rentable por la cantidad de enzima que se requiere. Debido a esto una técnica que permite el ahorro del biocatalizador se basa en el uso de enzimas inmovilizadas para intervenir en las reacciones necesarias para la producción de bioetanol.

El propósito de este estudio es la obtención de un catalizador activo y estable que permita un proceso de conversión eficaz de la celobiosa en glucosa. El plan de trabajo incluye la caracterización de la enzima β -Glucosidasa libre e inmovilizada, el estudio de perfiles de pH y temperatura, el estudio de las condiciones de inmovilización de la enzima al soporte con los enlazadores EDC-NHS y Glutaraldehído, la cuantificación de los ciclos de reutilización y, finalmente, la determinación de su estabilidad en el tiempo.

Los resultados mostraron que el mejor *linker* para la inmovilización fue el Glutaraldehído. Con respecto a los perfiles de temperatura y pH, la enzima inmovilizada frente a la libre, sufrió un desplazamiento hacia temperaturas más altas y pH más ácidos. En cuanto a los resultados de reutilizaciones, se mostró que en 30 ciclos utilizando *linker* EDC la actividad alcanzó un 18,5% de la actividad que produce la enzima libre. En cambio, con Glutaraldehído se obtuvo un 65,3%, lo que indica que con este *linker* se obtuvo mejores resultados. En relación a la estabilidad de la enzima inmovilizada con respecto al tiempo, se determinó que con Glutaraldehído es mucho más estable que con EDC, manteniendo su actividad hasta la cuarta semana de almacenamiento, en cambio con el EDC, en la segunda semana de almacenamiento, perdió más del 70% de su actividad máxima.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2 – PROBLEMA	4
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS	5
3.1.- Objetivo General	5
3.2.- Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO 4 – REVISIÓN BIBIOGRÁFICA.....	6
4.1.- Materiales Lignocelulósicos.....	6
4.2.- Enzimas	9
4.3.- Celulasas	10
4.4.- Cinética Enzimática.....	14
4.5.- Actividad Enzimática	18
4.6.- Inmovilización Enzimática	21
4.6.1.- Inmovilización por unión a un soporte.....	24
4.6.2.- Efectos de la inmovilización	27
4.7.- Enlazadores o <i>Linkers</i>	29
4.7.1.- Glutaraldehído	29
4.7.2.- EDC (1-Etil- 3-(dimetilaminopropil) carbodiimida)	32
4.8.- Soportes sólidos para inmovilización.....	33
4.8.1.- Quitosano	34
4.8.2.- Microesferas Magnéticas de quitosano fierro.....	37
CAPÍTULO 5 – MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1.- Materiales y Equipos	40
5.1.1.- Enzima	40
5.1.2.- Reactivos.....	40
5.1.3.- Equipos	41
5.1.4.- Materiales	41
5.2.- Metodología Analítica.....	42
5.2.1.- Curvas de calibración	42
5.2.2.- Cuantificación de la proteína.....	43
5.2.3.- Actividad Enzimática.....	44
5.2.4.- Cinética Enzimática	46

5.2.5.- Inmovilización Enzimática	48
5.3.- Metodología Experimental.....	51
5.3.1.- Caracterización del preparado enzimático	53
5.3.2.- Establecer las condiciones de inmovilización.....	56
5.3.3.- Inmovilización enzimática por diseño factorial 2 ²	58
5.3.4.- Obtener los perfiles de temperatura y pH de la actividad de la enzima inmovilizada.....	59
5.3.5.- Establecer la estabilidad de la enzima inmovilizada.....	60
CAPÍTULO 6 – RESULTADOS	62
6.1.- Caracterización del preparado enzimático Novozyme 188	62
6.1.1.- Cuantificación de la proteína del preparado enzimático Novozyme 188	62
6.1.2.- Actividad específica y cinética enzimática.....	62
6.1.3.- Perfil de temperatura de la actividad de la enzima	67
6.1.4.- Perfil de pH de la actividad de la enzima	67
6.2.- Parámetros para la inmovilización enzimática	68
6.3.- Inmovilización enzimática.....	70
6.3.1.- Proteína adsorbida por las microesferas.....	70
6.3.2.- Actividad resultante después de la inmovilización enzimática.....	71
6.4.- Efecto del <i>linker</i> en la inmovilización enzimática	72
6.4.1.- Estudio del efecto de la cantidad de EDC	73
6.4.2.- Estudio del efecto de la cantidad de Glutaraldehído	73
6.5.- Diseño factorial 2 ² para la inmovilización enzimática.....	74
6.5.1.- Diseño factorial utilizando EDC – NHS	75
6.5.2.- Diseño factorial utilizando Glutaraldehído	79
6.6.- Perfiles de Temperatura y pH para la actividad de la enzima inmovilizada.....	82
6.6.1.- Perfil de Temperatura	82
6.6.2.- Perfil de pH.....	84
6.7.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada	85
6.7.1.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada sin <i>linker</i>	85
6.7.2.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con EDC - NHS	86
6.7.3.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con Glutaraldehído	87
6.7.4.- Comparación de la actividad en las reutilizaciones con ambos <i>linkers</i>	89
6.8.- Estabilidad en el tiempo de la enzima Inmovilizada.....	89

6.8.1.- Estabilidad de la enzima inmovilizada con <i>linker</i> EDC– NHS.....	90
6.8.2.- Estabilidad de la enzima inmovilizada con <i>linker</i> Glutaraldehído	91
CAPÍTULO 7 – DISCUSIÓN.....	92
7.1.- Caracterización del preparado enzimático.....	92
7.1.1.- Proteína del preparado enzimático	92
7.1.2.- Dimensiones de la β -Glucosidasa.....	92
7.1.3.- Actividad específica de la enzima	93
7.1.4.- Cinética enzimática.....	94
7.2.- Inmovilización enzimática.....	95
7.2.1.- Enzima adsorbida y actividad inicial en la inmovilización	95
7.2.2.- Efectos de los <i>linker</i> en la actividad de la enzima inmovilizada.....	97
7.2.3.- Inmovilización de la enzima	99
7.3.- Comparación de perfiles de pH y temperatura para la enzima libre e inmovilizada ...	101
7.4.- Efectos de la reutilización de la enzima inmovilizada	103
7.5.- Efectos de la estabilidad en el tiempo de la enzima inmovilizada	104
CAPÍTULO 8 – CONCLUSIONES.....	106
CAPÍTULO 9 – BIBLIOGRAFÍA.....	108
CAPÍTULO 10 – ANEXOS.....	115
Anexo 1.- Preparación de soluciones Buffer y cálculos asociados	115
Anexo 2.- Curvas de calibración proteína método Bradford.....	117
Anexo 3.- Curvas de calibración glucosa.....	119
Anexo 4.- Proteína del preparado enzimático.....	121
Anexo 5.- Determinación del tiempo de reacción para la enzima libre.....	121
Anexo 6.- Inactivación de la enzima	122
Anexo 7.- Enzima necesaria para la hidrólisis de celobiosa	123
Anexo 8.- Cinética enzimática para los diferentes valores de sustrato	124
Anexo 9.- Determinación de las constantes cinéticas.....	126
Anexo 10.- Cálculos asociados a la determinación de microesferas, enzima y linker a utilizar en la inmovilización	128
Anexo 11.- Determinación del tiempo de reacción para la inmovilización.....	134
Anexo 12.- Cálculos asociados a la determinación de proteína adsorbida por las microesferas.....	135

Anexo 13.- Análisis estadístico para dos muestras de actividad utilizando pretratamiento de ácido glutámico y sin pretratamiento	138
Anexo 14.- Gráficas de los puntos experimentales y residuos para el diseño experimental con cada <i>linker</i>	138
Anexo 15.- Cálculos para la determinación de actividad en las reutilizaciones.....	141
Anexo 16.- Reutilizaciones de la enzima inmovilizada.....	142
Anexo 17.- Análisis estadístico para estabilidad semanal.....	145

Índice de Tablas

Tabla 1.- Comparación entre las diferentes técnicas de inmovilización enzimática	24
Tabla 2.- Orden del Diseño experimental factorial	58
Tabla 3.- Comparación de la proteína adsorbida mediante métodos Bradford, Espectrofotométrico y, con y sin pretratamiento de ácido glutámico.	70
Tabla 4.- Actividad de la enzima inmovilizada en las microesferas sin y con pretratamiento de ácido glutámico.....	71
Tabla 5.- Concentración de <i>linker</i> a utilizar (μM) en la inmovilización	72
Tabla 6.- Orden del diseño factorial para EDC-NHS y Glutaraldehído.	74
Tabla 7.- Datos del diseño factorial con EDC-NHS.	75
Tabla 8.- Efectos y Coeficientes estimados para Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) con <i>linker</i> EDC.....	76
Tabla 9.- Coeficientes estimados para Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) utilizando <i>linker</i> EDC.....	76
Tabla 10.- Datos del diseño factorial con Glutaraldehído.	79
Tabla 11.- Efectos y Coeficientes estimados de Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) con <i>linker</i> Glutaraldehído (unidades codificadas).	80
Tabla 12.- Coeficientes estimados para Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) utilizando <i>linker</i> Glutaraldehído con datos en unidades descodificadas.	80
Tabla 13.- Cantidades de cada compuesto utilizadas para realizar los buffer fosfatos a distintos pH.....	115
Tabla 14.- Cantidades de cada compuesto utilizadas para realizar los buffer acetatos a distintos pH.....	116
Tabla 15.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de proteína diluida.....	117
Tabla 16.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de proteína concentrada....	117
Tabla 17.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de glucosa diluida.....	119
Tabla 18.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de glucosa concentrada. ...	119
Tabla 19.- Concentración de proteína en el preparado enzimático Novozyme 188.....	121
Tabla 20.- Glucosa producida al hacer reaccionar distintas concentraciones de enzima con una concentración fija de sustrato de celobiosa de 1,9 g/L	123
Tabla 21.- Datos de cinética para los diferentes tiempos utilizando distintas concentraciones de sustrato.....	124
Tabla 22.- Linealización de los datos cinéticos obtenidos experimentalmente mediante Lineweaver-Burk.....	126

Tabla 23.- Comparación de los datos cinéticos obtenidos experimentalmente y valores ajustados por Michaelis-Menten.....	128
Tabla 24.- Proteína adsorbida por Método Bradford con pretratamiento con <i>linker</i> EDC-NHS.	136
Tabla 25.- Proteína adsorbida por Método Bradford sin pretratamiento con EDC-NHS.	136
Tabla 26.- Proteína adsorbida por Método Bradford con pretratamiento con <i>linker</i> Glutaraldehído.	136
Tabla 27.- Proteína adsorbida por Método Bradford sin pretratamiento con <i>linker</i> Glutaraldehído	137
Tabla 28.- Proteína adsorbida por Método Espectrofotométrico con pretratamiento de ácido glutámico con <i>linker</i> Glutaraldehído.	137
Tabla 29.- Proteína adsorbida por Método Espectrofotométrico sin pretratamiento de ácido glutámico con <i>linker</i> Glutaraldehído.	137
Tabla 30.- Análisis estadístico <i>t</i> - <i>Student</i> para dos muestras.	138
Tabla 31.- Actividad enzimática en los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada utilizando <i>linker</i> EDC-NHS	143
Tabla 32.- Actividad enzimática en los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada utilizando <i>linker</i> Glutaraldehído.	144
Tabla 33.- Análisis estadístico para la estabilidad semanal con <i>linker</i> EDC-NHS.	145
Tabla 34.- Análisis estadístico para la estabilidad semanal con <i>linker</i> Glutaraldehído.	146

Índice de Figuras

Figura 1.- Estructura primaria de la celulosa.....	7
Figura 2.- Diagrama esquemático de la bioconversión de la biomasa a bioetanol	9
Figura 3.- Las dos posibles configuraciones del carbono anomérico de la glucosa después de la hidrólisis de la celulosa	10
Figura 4.- Representación de la hidrólisis de la celobiosa aglucosa.....	12
Figura 5.- Estructura cristalina de la β -Glucosidasa (3AHY) en complejo con Tris	13
Figura 6.- Cambios de velocidad de la reacción enzimática en el tiempo.....	14
Figura 7.- Curva de Michaelis-Menten	15
Figura 8.- Esquema de la cinética enzimática.....	16
Figura 9.- Gráfica de Lineweaver-Burk	18
Figura 10.- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la β -Glucosidasa.	20
Figura 11.- Efectos de la temperatura en la hidrólisis enzimática de celobiosa, utilizando 75... mM de celobiosa y concentración de enzima de 0,5 g/L	21
Figura 12.- Métodos de Inmovilización Enzimática; Retención física y química	23
Figura 13.- Estructura química del Glutaraldehído	30
Figura 14.- Estrategias de la inmovilización covalente multipuntual a través de la química del Glutaraldehído	32
Figura 15.- Estructura química del EDC.....	33
Figura 16.- Estructura química de la N-hidroxisuccinimida (NHS).....	33
Figura 17.- Estructura de la quitina, quitosano y celulosa	36
Figura 18.- (A) Estructura del quitosano [poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)]. (B) Estructura de quitosano entrecruzado.	37
Figura 19.- Diagrama de síntesis de la metodología experimental.	52
Figura 20.- Curva que indica la cantidad de glucosa producida al hacer reaccionar distintas cantidades de enzima con 1,9 g/L de celobiosa.....	63
Figura 21.- Regresión lineal de la curva que indica la cantidad de glucosa producida al hacer reaccionar distintas cantidades de enzima con 1,9 g/L de celobiosa	64
Figura 22.- Glucosa liberada en función del tiempo al hacer reaccionar una cantidad fija enzima para distintas concentraciones de sustrato de celobiosa.	65
Figura 23.- Cinética experimental de la β -Glucosidasa, ajustada al modelo Michaelis-Menten	66

Figura 24.- Perfiles de actividad de la enzima a diferentes temperaturas.....	67
Figura 25.- Perfiles de actividad de la enzima a diferentes pH.....	68
Figura 26.- Efecto de la concentración del <i>linker</i> EDC-NHS en la Actividad de la enzima inmovilizada.....	73
Figura 27.- Efecto de la concentración del <i>linker</i> Glutaraldehído en la Actividad de la enzima inmovilizada.....	74
Figura 28.- Representación gráfica de la superficie de respuesta de Actividad de la enzima inmovilizada con <i>linker</i> EDC.....	77
Figura 29.- Representación gráfica del contorno de Actividad de la enzima inmovilizada con <i>linker</i> EDC.....	77
Figura 30.- Prolongación del diseño experimental con EDC.....	78
Figura 31.- Representación gráfica de la de superficie de respuesta de Actividad enzimática con <i>linker</i> Glutaraldehído.....	81
Figura 32.- Representación gráfica del contorno de Actividad con <i>linker</i> Glutaraldehído.....	81
Figura 33.- Prolongación de Glutaraldehído.....	82
Figura 34.- Porcentaje de actividad enzimática de la enzima inmovilizada a diferentes temperaturas.....	83
Figura 35.- Comparación de los perfiles de temperaturas en porcentaje de actividad relativa, para la enzima libre e inmovilizada.....	83
Figura 36.- Porcentaje de actividad enzimática de la enzima inmovilizada a diferentes pH..	84
Figura 37.- Comparación de los perfiles de pH en porcentaje de actividad relativa para la enzima libre e inmovilizada a una temperatura.....	84
Figura 38.- Actividad enzimática acumulada en 30 ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada en microesferas sin <i>linker</i>	86
Figura 39.- Actividad enzimática acumulada en 30 ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada en microesferas utilizando EDC-NHS.....	87
Figura 40.- Actividad enzimática acumulada en 30 ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada en microesferas utilizando Glutaraldehído.....	88
Figura 41.- Comparación de la actividad generada por la enzima inmovilizada utilizando ambos <i>linkers</i>	89
Figura 42.- Estabilidad durante el almacenamiento semanal de la enzima inmovilizada con <i>linker</i> EDC-NHS.....	90

Figura 43.- Estabilidad durante el almacenamiento semanal de la enzima inmovilizada con <i>linker</i> Glutaraldehído.....	91
Figura 44.- Curvas de calibración de proteína.....	118
Figura 45.- Curvas de calibración de glucosa	120
Figura 46.- Determinación del tiempo de reacción para enzima libre	121
Figura 47.- Eficiencia del NaOH en la inhibición de la enzima	122
Figura 48.- Gráficos de glucosa producida en función del tiempo utilizando una concentración fija de enzima a distintas concentraciones de celobiosa	125
Figura 49.- Linealización de la curva de velocidad inicial experimental por medio de Lineweaver-Burk que representa la inversa de los resultados.	127
Figura 50.- Determinación del tiempo de reacción para la enzima inmovilizada.....	135
Figura 51.- Gráficas de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) incluyendo interacción con EDC-NHS.....	138
Figura 52.- Gráficas de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) sin interacción, con EDC-NHS.	139
Figura 53.- Puntos experimentales para diseño utilizando EDC-NHS.	139
Figura 54.- Gráficas de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) incluyendo interacción con Glutaraldehído.	140
Figura 55.- Gráficas de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) sin interacción, con Glutaraldehído.	140
Figura 56.- Puntos experimentales para diseño utilizando Glutaraldehído.	141

CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN

La biomasa es la materia orgánica contenida en productos de origen vegetal y animal (incluyendo desechos orgánicos) que puede ser capturada y usada como una fuente de energía química (Manzini *et al.*, 2004), se puede transformar en una amplia variedad de productos líquidos, sólidos o gaseosos, importantes desde el punto de vista energético, industrial y agrícola, más conocidos como biocombustibles (Abril *et al.*, 2012).

El uso de combustibles de base biológica puede reducir de manera importante la acumulación de gases de efecto invernadero y la dependencia a combustibles fósiles (Ríos *et al.*, 2010). Los biocombustibles sólidos pueden sustituir al carbón, los biocombustibles líquidos puede complementar la gasolina y el diésel, y el biogás, así como gas natural sintético a partir de biomasa puede ser alimentado en tuberías de gas natural después de su purificación y mejora. En muchos casos puede ser la sustitución parcial o total, dando lugar a los combustibles puros o mezclados (IEA Bioenergy, 2013¹).

Los biocombustibles que actualmente se producen a escala industrial son fundamentalmente dos: biodiesel y bioetanol. El biodiesel se obtiene a partir de aceites vegetales (colza, soja, girasol o palma) y el bioetanol a partir de cereales, materias primas ricas en azúcar y otros residuos orgánicos (Ancín, 2008).

Específicamente el bioetanol es el biocombustible más usado para el transporte en todo el mundo (Balat, 2010). Su producción a partir de biomasa es una forma de reducir tanto el consumo del petróleo como la contaminación del medio ambiente. Se utiliza en mezclas con gasolina de forma directa o a través de compuestos oxigenados como el ETBE. Su uso aumenta el número de octanos y promueve una mejor combustión, reduciendo las emisiones contaminantes por el tubo de escape, como monóxido de carbono, dióxido de carbono y distintos hidrocarburos (Balat,

¹<http://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2013/10/IEA-Bioenergy-News-251.pdf>

2010). Del mismo modo contribuye al cumplimiento del Protocolo de Kyoto al ser el CO₂ emitido de ciclo cerrado. La materia prima utilizada en la fabricación del bioetanol fija el CO₂ emitido en su combustión al realizar el proceso de la fotosíntesis, básico en el crecimiento de la planta. (IEA Bioenergy, 2013).

La producción de bioetanol ha estado basada de manera habitual en el uso de almidón o azúcares simples cuyas materias primas son: cereales, maíz, caña de azúcar y remolacha para la obtención de los llamados combustibles de primera generación, sin embargo el uso de alimentos para el consumo humano y animal ha sido fuertemente cuestionado desde puntos de vista económicos y éticos. Por este motivo se han buscado alternativas de generación de biocombustibles con materias primas menos convencionales, lo que da origen a los combustibles de segunda generación. Estos se producen empleando materiales lignocelulósicos tales como paja de cereales o residuos de la industria forestal como materia prima. (Hernández *et al.*, 2009)

El uso de materiales lignocelulósicos para obtener bioetanol ha sido ampliamente estudiado (Álvarez *et al.*, 2012). Esta materia prima tiene como ventaja ser el material orgánico más abundante en la tierra. Sus fuentes son los bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas y otros residuos industriales como residuos de la industria de la madera y los tableros, residuos de la industria del papel y el papel reciclado (Hernández *et al.*, 2009). Los materiales lignocelulosíticos están constituidos por tejidos vegetales cuyas células presentan una pared celular constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre las que se deposita la lignina (Barroso, 2010). Sin embargo, la recalcitrancia de los residuos lignocelulósicos, que se debe a la compleja red de heteropolisacáridos y lignina que rodean a la celulosa, impiden la completa hidrólisis o sacarificación de éstos. Por tal motivo deben ser pretratados mediante métodos físicos, químicos o biológicos con el objeto de dejar las cadenas poliméricas más expuestas, ya que de esta forma se aumenta considerablemente la velocidad de hidrólisis al favorecer la hidratación (Ríos *et al.*, 2010; Saval, 2012).

La hidrólisis de los residuos de lignocelulosa debe llevarse a cabo para obtener de manera accesible los azúcares solubles contenidos en sus fibras. Este procedimiento de hidrólisis puede ser realizado por vía química o por vía enzimática (Ríos *et al.*, 2010).

La hidrólisis enzimática, requiere del uso de estos catalizadores biológicos para transformar las cadenas de celulosa a monómeros de glucosa, los que posteriormente serán fermentados para producir bioetanol (Saval, 2012).

CAPÍTULO 2 – PROBLEMA

El bioetanol es un tipo de bioenergía, que aparece como alternativa a los combustibles fósiles, sin embargo el proceso de bioconversión de este biocombustible consta de varias etapas: (1) pretratamiento para remover lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material; (2) sacarificación enzimática para transformar las cadenas de celulosa en glucosa y (3) fermentación de monómeros para la obtención del bioetanol.

La etapa de sacarificación o hidrólisis enzimática de la celulosa, se produce por enzimas con diferentes funciones, ya que la celulosa es un sustrato complejo. Entre ellas, las más importantes son las endoglucanasas, exoglucanasas y β -Glucosidasas. Las primeras rompen las cadenas en el centro, de tal manera que la celulosa pierde su estructura cristalina, y a su vez permite la acción de las exoglucanasas que posibilitan la liberación de celobiosa y finalmente estas moléculas se convierten en glucosa por la acción de β -Glucosidasa.

Específicamente en la hidrólisis enzimática, en su última etapa el uso de los catalizadores a gran escala se ha visto condicionado por el difícil control de los procesos biológicos, esto debido a: la alta cantidad de enzima que se requiere para convertir la celobiosa en glucosa, el alto costo de elaboración que tiene el preparado enzimático, la pérdida de actividad durante las reacciones catalizadas, la contaminación del producto final por la presencia del catalizador en la solución, la dificultad de su eliminación de la mezcla de reacción, y su imposibilidad de volver a reutilizar, todo esto debido a que son catalizadores lábiles, solubles e inestables y se desnaturalizan en el medio de reacción.

Frente a este problema, la inmovilización enzimática aparece como una alternativa frente a las dificultades asociadas a la hidrólisis enzimática en la elaboración de bioetanol, en particular con la enzima β -Glucosidasa, ya que su acción transcurre en el medio líquido libre.

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Verificar el efecto de la inmovilización de la enzima β -Glucosidasa en microesferas magnéticas de quitosano-ferro, utilizando dos agentes enlazantes entre el soporte y la enzima, para su uso en la producción de bioetanol.

3.2.- Objetivos Específicos

1. Caracterizar el preparado comercial Novozyme 188.
2. Determinar las condiciones de inmovilización de la enzima con EDC-NHS y Glutaraldehído.
3. Verificar la estabilidad de la enzima inmovilizada en relación a la temperatura y al pH de hidrólisis.
4. Cuantificar los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada y evaluar el efecto de su estabilidad en el tiempo mediante su almacenamiento.

CAPÍTULO 4 – REVISIÓN BIBIOGRÁFICA

4.1.- Materiales Lignocelulósicos

El material lignocelulósico es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por fotosíntesis, representan la mayor fuente de energía y materia orgánica renovable de la biosfera (Cuervo *et al.*, 2009). Su disponibilidad en forma de residuos agrícolas y forestales asegura sustratos abundantes y baratos. Entre estos materiales derivados de la biomasa se destacan cuatro grupos según el tipo de recurso: (1) los residuos forestales, (2) de residuos sólidos urbanos, (3) los residuos de papel, y (4) los recursos de residuos de cultivos (Balat, 2010).

Estos materiales se emplean directamente para la obtención de productos energéticos secundarios por un proceso de pirolisis, de gasificación o de reformado catalítico con vapor, así como por hidrólisis química o enzimática y fermentación etanólica (Martínez *et al.*, 2008).

La lignocelulosa forma la pared celular de las plantas y está constituida principalmente por tres componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos tres componentes suponen aproximadamente el 90% del material lignocelulósico (Rodríguez, 1991), variando el porcentaje de cada uno de ellos con el tipo de planta (madera dura y suave, olotes de maíz, desechos de pasto, hojas etc.). Generalmente se encuentran en los siguientes porcentajes: microfibrilas de celulosa entre 35 y 50%, matriz de hemicelulosas entre 20 y 40%, lignina entre 18 y 35% (Cuervo *et al.*, 2009). Solo la celulosa y hemicelulosa que corresponden aproximadamente a dos tercios de la masa seca de la madera pueden ser convertidos a etanol y la lignina se puede vender en pellets de madera o para generar energía eléctrica (Correa, 2008).

La lignina es un heteropolímero fenólico sin una composición estereoquímica regular, de alto peso molecular, constituida de unidades fenilpropano, con una función protectora de los otros dos componentes polisacáridos, la celulosa y la hemicelulosa (colectivamente llamados holocelulosa) (Cuervo *et al.*, 2009).

Las cadenas de hemicelulosas son polisacáridos de menor peso molecular, son más fáciles de degradar y más fáciles de disolver que la celulosa. Estas actúan junto con la lignina como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular (Cuervo *et al.*, 2009).

La celulosa es la sustancia natural más importante, tanto por su abundancia como por su aprovechamiento tecnológico (Cuervo *et al.*, 2009). Es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la actualidad es una fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales necesarios para cubrir necesidades humanas tales como el papel, pulpa, maderas, etc. La celulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta de distintas moléculas, tales como pectinas, proteínas, almidón y lípidos, además de hemicelulosa y lignina (Martínez *et al.*, 2008). Su fórmula es $(C_6H_{10}O_5)_n$, homopolímero lineal de elevado peso molecular y grado de polimerización (Figura 1) constituido por monómeros de β -glucosa unidas entre sí por enlaces glicosídico 1-4, los cuales se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas), formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Cuervo *et al.*, 2009).

Su configuración más estable es en forma de silla con los grupos hidroxilos en posición ecuatorial. Los grupos OH que se encuentran en los dos extremos de la cadena muestran un comportamiento diferente. Mientras que el grupo OH del Carbono 1 que se encuentra a uno de los extremos es un grupo aldehído y por tanto con propiedades reductoras, el grupo OH del grupo Carbono 4 que está situado al extremo opuesto de la cadena es un grupo hidroxil alcohol y en consecuencia no reductor (Barroso, 2010).



Figura 1.- Estructura primaria de la celulosa (Barroso, 2010).

Debido al carácter asimétrico del enlace de la celulosa, también puede considerarse como un poliacetal del dímero celobiosa que no existe de forma natural, y solo puede obtenerse por la hidrólisis de la celulosa (Barroso, 2010). El disacárido de celobiosa, que como la maltosa, se encuentra formado por la unión de dos moléculas de glucosa, la única diferencia es que en la celobiosa el enlace es de tipo β 1,4 y en la maltosa α 1,4 (Peña, 1988).

El aprovechamiento los residuos lignocelulósicos para obtener productos energéticos secundarios requiere de métodos de pretratamientos o fraccionamientos que son complejos y otros métodos que están siendo investigados (Cuervo *et al.*, 2009).

El principal impedimento tecnológico es la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia de la lignocelulosa. Se han desarrollado diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa, como pretratamientos fisicoquímicos y biológicos para remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducirla cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa fermentable (Cuervo *et al.*, 2009).

Proceso de obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos

El proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica consiste en; (1) la conversión de la biomasa en azúcares fermentables de las cuales se destacan el pretratamiento termoquímico para remover lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material;(2) sacarificación enzimática para transformar las cadenas de celulosa en glucosa; (3) la fermentación de los azúcares en etanol por microorganismos del monosacárido; y (4) destilación y evaporación (Figura 2) (Balat *et al.*, 2007). Específicamente, la etapa de hidrólisis enzimática tiene como finalidad la transformación de los polisacáridos en azúcares sencillos por medio de una reacción catalítica heterogénea.

La hidrólisis de la celulosa es una reacción caracterizada por un reactivo insoluble (celulosa) y un catalizador complejo soluble (celulasas); la velocidad de

reacción está influenciada tanto por la estructura de la celulosa como por el modo de actuación de las enzimas, pero generalmente es un proceso de baja velocidad (Rodríguez, 1991). El precio de la enzima afecta directamente el costo de producción de bioetanol por lo tanto, varios enfoques se han utilizado para mejorar el rendimiento de las celulasas y disminuir la cantidad de enzima necesaria para sacarificar sustratos de biomasa (Balat *et al.*, 2007).

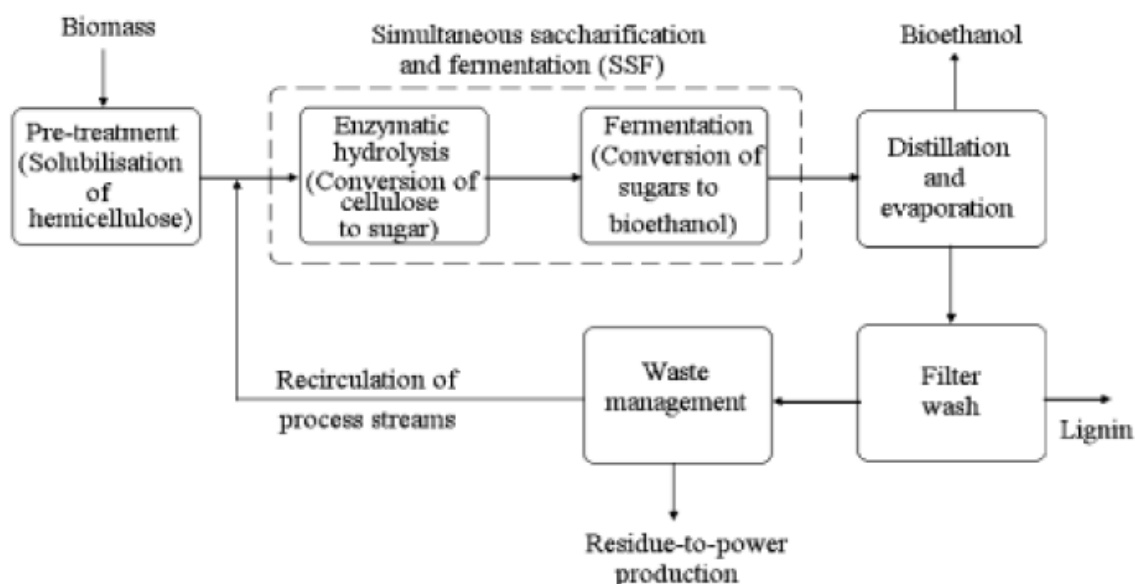


Figura 2.- Diagrama esquemático de la bioconversión de la biomasa a bioetanol (Balat *et al.*, 2007).

4.2.- Enzimas

Las enzimas son proteínas producidas por organismos vivos, responsables de la mayoría de las reacciones y actividades biológicas, esenciales para todos los procesos metabólicos (Krajewska, 2003). Influyen en la rapidez de una reacción química pero no afectan el equilibrio de esta (Silva, 2010). Poseen un alto nivel de eficiencia catalítica, a menudo muy superiores a los catalizadores químicos, y un alto grado de especificidad que les permite discriminar no solo entre las reacciones, sino también entre los sustratos (especificidad de sustrato), partes de moléculas similares

(regioespecificidad) y entre los isómeros ópticos (estereoespecificidad) (Krajewska, 2003).

Además, las enzimas generalmente operan en condiciones suaves de temperatura, presión y pH, con velocidades de reacción del orden de los alcanzados por los catalizadores químicos en condiciones más extremas (Krajewska, 2003), son moléculas relativamente sensibles o inestables y requieren gran cuidado en su uso y cambios de pH pueden modificar su distribución de cargas, provocando cambios en la velocidad de reacción (aumento o disminución), inclusive desnaturalización de la proteína. Se clasifican en oxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Illanes, 2008).

4.3.- Celulasas

Las celulasas son glicosil hidrolasas distribuidas por toda la biosfera de las cuales la mayoría aparecen en organismos de la naturaleza microbiana, tales como hongos y bacterias. Utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales de la glucosa (Figura 3). Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición β (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Withers, 2001).

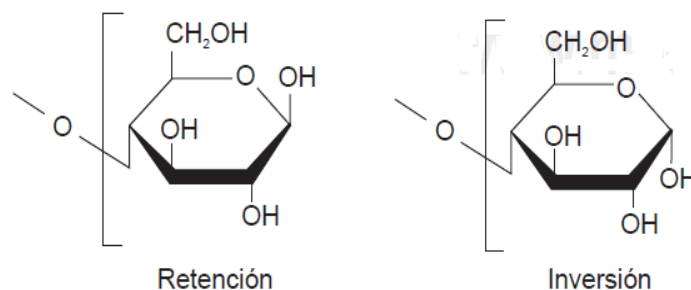


Figura 3.- Las dos posibles configuraciones del carbono anomérico de la glucosa después de la hidrólisis de la celulosa: β (a la izquierda), lo que indica un mecanismo de retención, y α (a la derecha) indica inversión (Martínez *et. al.*, 2008).

Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos. Este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Davies y Herissat, 1995).

De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos: endoglucanasas, exoglucanasas y β -Glucosidasas. En primer lugar las fibras de celulosa se escinden por medio de las endoglucanasas, liberando pequeños fragmentos de celulosa con conexiones reductoras y extremos no reductores que son atacados por las exoglucanasas para liberar pequeños oligosacáridos (celobiosa) y finalmente estos se hidrolizan en monómeros de glucosa por la β -Glucosidasa (Singhania *et al.*, 2012).

Endocelulasas (Endoglucanasas) EC 3.2.1.4: son enzimas β 1,4- glucanohidrolasas que actúan al azar sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales (Martínez *et al.*, 2008).

Exocelulasas (Exoglucanasas) EC 3.2.1.91: son enzimas β 1,4- glucano celobiohidrolasas, actúan en los extremos terminales del polímero dando lugar a unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor de la cadena de celulosa. Su acción es fundamental para la hidrólisis de las zonas cristalinas de la celulosa. Es inhibida competitivamente o no, tanto por la celobiosa formada como por la glucosa existente en el medio (Rodríguez, 1991; Martínez *et al.*, 2008).

β -Glucosidasas (Celobiasas) EC 3.2.1.21: son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces β 1,4- glucosídicos de oligosacáridos, originando como producto final monómeros de glucosa, como se representa en la Figura 4. Presenta una amplia especificidad por el sustrato de celobiosa (Casablanca *et al.*, 2011; Chang y Juang, 2007).

La hidrólisis de la celobiosa con β -Glucosidasa tanto libre como inmovilizada implica efectos de inhibición por sustrato y producto de tipo competitivo (Rodríguez,

1991). Esta reacción está siempre bajo control, ya que la inhibición por su producto glucosa, provoca una inhibición de retroalimentación. Además la glucosa en una concentración elevada puede bloquear el sitio activo para el sustrato o prevenir la hidrólisis del sustrato (Singhania *et al.*, 2012).

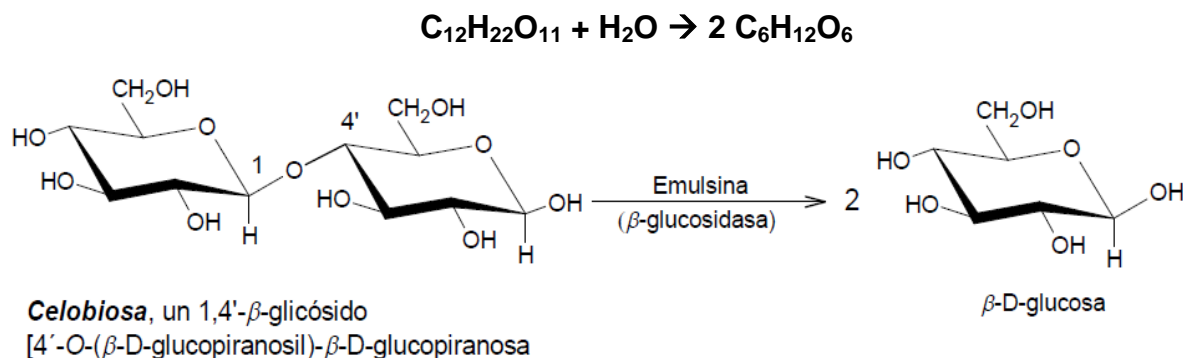


Figura 4.- Representación de la hidrólisis de la celobiosa a monómeros de glucosa (Rodríguez, 1991).

Las β -Glucosidasas provienen de diversas fuentes, incluidas bacterias de animales y plantas (Chang y Juang, 2007). Se puede encontrar en diferentes organismos, entre ellos: *Agrobacterium tumefaciens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cellulomonas biazotea*, *Trichoderma reesei* y en distintas especies de *Aspergillus*, como lo son: *A. niger*, *A. oryzae* y *A. wentii* (Silva, 2010).

No todos los microorganismos celulolíticos poseen los mismos niveles de esta enzima. El hongo *Aspergillus niger* es superior a muchos otros microorganismos, incluido el *Trichoderma reesei*, en lo que se refiere a la producción de β -Glucosidasa extracelular. Además la β -Glucosidasa producida por *Aspergillus niger* es particularmente atractiva por su elevada actividad frente a la celobiosa (Rodríguez, 1991).

Debido a que la estructura espacial de la proteína es muy sensible frente a las condiciones ambientales se hace necesario la utilización de preparados enzimáticos para su conservación. Los niveles presentes de β -Glucosidasa en un preparado enzimático son importantes para lograr una adecuada y completa hidrólisis de la celobiosa a glucosa (Rodríguez, 1991). El preparado enzimático comercial

Novozyme 188 (Brenda²) está compuesto principalmente de la enzima β -Glucosidasa proveniente de la especie *Aspergillus niger*. Dentro de este organismo la ubicación de esta enzima es extracelular, con un peso molecular aproximado de entre los 71.000 a los 330.000 Dalton, formando usualmente dímeros de 91.400 ó 120.000 Da o trímeros de 110.000 Da (Silva, 2010). Watanabe *et al.* (1999) purificó la β -Glucosidasa a partir de una preparación de celulosa cruda de *Aspergillus niger*. Las propiedades fueron determinadas mediante cromatografía de filtración en gel (GPC) y la masa molecular de la enzima purificada se estimó en 240 kDa con un punto isoeléctrico de 4,0, además fue estable en la gama de pH de 4,5 a 7,0 con un pH óptimo de 4,5. La temperatura óptima para la hidrólisis de pNpp- β -glucosido fue de 55 °C pero fue sensible a temperaturas superiores. La K_M para pNpp- β -glucosido y celobiosa fueron de 0,9 mM y 2,3 mM, respectivamente.

La Figura 5 muestra la estructura de la β -Glucosidasa proveniente de un complejo de tres especies.



Figura 5.- Estructura cristalina de la β -Glucosidasa (3AHY) en complejo con Tris desde bacteria *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* y *Neotermes koshunensis* (Jeng *et al.*, 2011).

² BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System: <http://www.brenda-enzymes.org>

4.4.- Cinética Enzimática

El estudio de la velocidad de las reacciones químicas catalizadas por enzimas se denomina cinética enzimática. Se ocupa de la tasa de reacción de la enzima y la forma en que se ve afectada por diversas condiciones químicas y físicas. Los estudios cinéticos de reacciones enzimáticas proporcionan información sobre el mecanismo básico de la reacción de la enzima y otros parámetros que caracterizan sus propiedades. Las ecuaciones de velocidad desarrolladas a partir de los estudios cinéticos se pueden aplicar en el cálculo tiempo de reacción y rendimientos (Dutta, 2008). La reacción tiene lugar en el centro activo de la enzima por lo que es necesario que el sustrato llegue a este punto y se una covalentemente con los grupos activos que existen. También es necesario tener en cuenta que la velocidad de la reacción puede ser modificada dependiendo de sus cantidades (Rodríguez, 1991).

La *tasa de velocidad* "V" se refiere a la rapidez con que un sustrato se convierte por la enzima en producto. Se mide como la cantidad de sustrato consumido o el producto formado por unidad de tiempo por medio de $(d[P]/dt$ o $-d[S]/dt)$ la pendiente de la curva (Acevedo *et al.*, 2002). La velocidad no es necesariamente la misma en todo momento después de iniciada la reacción. El agotamiento de sustrato, la inhibición por el producto, o la inestabilidad de la enzima pueden causar cambios de velocidad con el tiempo como representa la Figura 6.

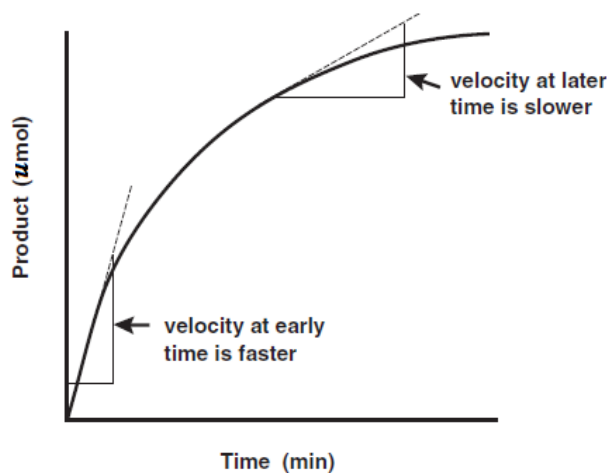


Figura 6.- Cambios de velocidad de la reacción enzimática en el tiempo (Schulz, 1994).

Las reacciones catalizadas por enzimas son saturables, la velocidad de catálisis no muestra un comportamiento lineal en una gráfica al aumentar la concentración de sustrato. Si la velocidad inicial de la reacción se mide a una determinada concentración de sustrato (representado como $[S]$), la velocidad de la reacción (representado como V) aumenta linealmente con el incremento de $[S]$ hasta mantenerse constante, como se puede ver en la Figura 7. Sin embargo, cuando aumentamos $[S]$, la enzima se satura de este y alcanza su velocidad máxima (V_{max}) (Acevedo *et al.*, 2002).

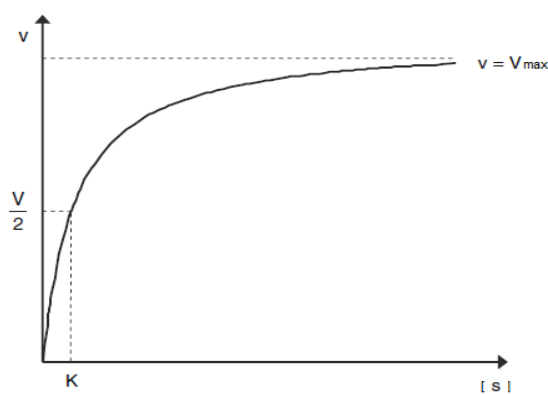


Figura 7.- Curva de Michaelis-Menten. Representa la saturación de la enzima con el aumento de sustrato, se observa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción (Illanes, 2008).

Con el fin de entender la eficacia y las características de una reacción enzimática es importante saber cómo la velocidad de reacción está influenciada por las condiciones de reacción, tales como sustrato, producto y concentración de enzima. Si se mide la velocidad inicial a diferentes niveles de concentraciones de sustrato se obtienen una serie de curvas, a partir de esas curvas se puede concluir lo siguiente (Dutta, 2008):

- La velocidad de reacción es proporcional a la concentración de sustrato, cuando las concentraciones de sustrato son pequeñas y por lo tanto la reacción es de primer orden.
- La velocidad de reacción no depende de la concentración de sustrato cuando la concentración de sustrato es alta, ya que la velocidad de reacción cambia gradualmente de primer orden a orden cero.

El término coeficiente de primer orden es la velocidad inicial, ya que es el valor de la primera derivada al origen. Los datos de mediciones discontinuas con frecuencia se componen de un punto por tiempo determinado, al comienzo de la reacción se asocia a un tiempo muerto que si es muy corto se ignora y la posterior tasa se mide como una relación muy estrecha aproximando a la velocidad inicial. Si el tiempo muerto parece significativo, los datos pueden extrapolarse a tiempo cero, pues la extrapolación a tiempo cero se emplea a veces para determinar la velocidad inicial en presencia de un retraso inexplicable o explosión de la actividad al inicio. Cuando sea posible, los datos iniciales de velocidad deben ser verificados mediante pruebas de linealidad. Si el período inicial de velocidad es tan corto que debe ser determinado por la diferenciación de la curva de progreso, ya sea por medios gráficos o analítica, o también por la demostración de que el valor es proporcional a la concentración de enzima. (Taylor, 2004)

El método utilizado para calcular la velocidad de una reacción propuesto por Leonor Michaelis y Maud Menten relaciona la cantidad de producto formado a distintas concentraciones de sustrato en función del tiempo (Berg *et al.*, 2008), todo bajo la acción catalizadora de una enzima, como se muestra en la Figura 8.

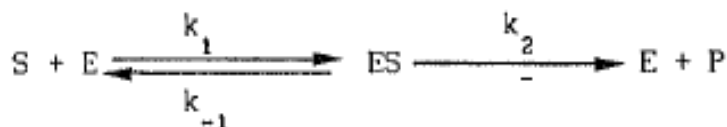


Figura 8.- Esquema de la cinética enzimática (Rodríguez, 1991).

La enzima (E) se combina con un sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES) con una constante de velocidad k_1 . Una vez formado el complejo ES, existen dos posibilidades: (1) ES puede disociarse hasta volver a ser E y S, con una constante de velocidad k_{-1} , (2) o bien, ES puede continuar hasta formar un producto (P) con una constante k_2 (Berg *et al.*, 2008).

La ecuación cinética de Michaelis-Menten (1) asume que la formación complejo enzima-sustrato (ES) es un requisito previo para la reacción enzimática. La

aplicación de esta ecuación permite calcular los parámetros de velocidad máxima de la hidrólisis a saturación (V_{max}) y la constante media de saturación (K_M), proporciona información sobre el mecanismo de hidrólisis. Si la relación (ES) es pequeña y las concentraciones de sustrato están comprendidas entre los límites de saturación, la velocidad de reacción inicial (v) puede expresarse la ecuación descrita a continuación:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

La constante, K_M , se define como la concentración a la que la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la V_{max} . Esto puede verificarse sustituyendo la concentración de sustrato por dicha constante ($[S] = K_M$). Si la etapa limitante de la velocidad de la reacción es lenta comparada con la disociación de sustrato ($k_2 \ll k_1$), la constante de Michaelis, K_M será aproximadamente la constante de disociación del complejo ES (Berg *et al.*, 2008).

El valor K_M de una enzima generalmente es bajo (10^{-1} a 10^{-6} M); cuanto más pequeño es, indica que la enzima tiene mayor afinidad por su sustrato y, por tanto, su unión es más fuerte (Hicks, 2001).

El detalle de los datos se puede ajustar al modelo Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos Sin embargo, es bueno representar los datos por métodos lineales tales como el doble del recíproco de Lineweaver-Burk, con el fin de proporcionar la seguridad de que no hay grandes problemas con los datos (Taylor, 2004).

La gráfica de los dobles recíprocos representada en la Figura 9 fue propuesta por Hans Lineweaver y Dean Burk en 1934. Si se toma el inverso de cada miembro de la ecuación de Michealis-Menten, puede obtenerse la ecuación de Lineweaver-Burk (2) (Bradley y Bennett, 1982).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

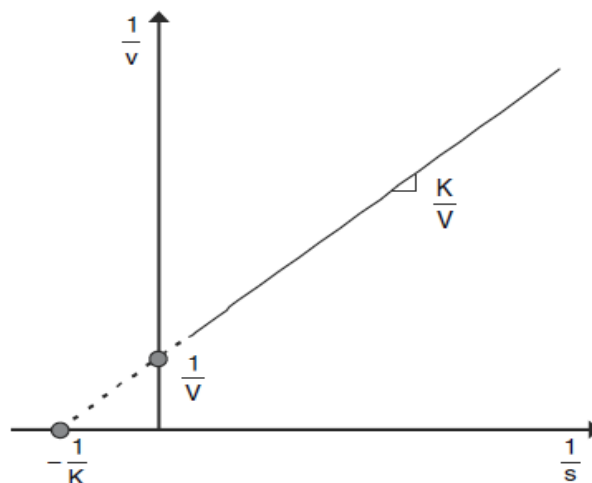


Figura 9.- Gráfica de Lineweaver-Burk (doble recíproco) para la determinación de los parámetros cinéticos (Illanes, 2008)

La ecuación (2) es equivalente a la expresión matemática de una línea recta (ecuación de la recta). Así, idealmente, una representación de Lineweaver-Burk de los datos cinéticos proporcionan una línea recta de pendiente = K_M/V_{max} e intersección de $1/[S]$ y $1/V = -1/K_M$ y $1/V_{max}$, respectivamente. La gráfica tiene la ventaja de que no hay necesidad de medir V a concentraciones extremadamente altas de sustratos (a menudo difíciles de obtener experimentalmente), ya que $[S]$ se puede extrapolar al valor de $1/[S]=0$ (Bradley y Bennett, 1982).

4.5.- Actividad Enzimática

La actividad enzimática corresponde a la capacidad catalítica de la enzima y se traduce en un incremento en la velocidad de la reacción catalizada, dado que en ausencia de la enzima la velocidad es despreciable (Acevedo *et al.*, 2002). La cuantificación de la actividad enzimática se basa en la medición de la velocidad de reacción al pasar de sustrato a producto.

El potencial catalítico es la capacidad que posee una enzima para poder catalizar una reacción química, el cual se puede ver afectado tanto por las concentraciones de sustrato, producto, inhibidor, co-factor, activador e incluso de la

misma enzima, así como también por factores ambientales como lo son el pH y la temperatura. Estas variables no solo interceden disminuyendo o aumentando la actividad de la enzima, sino que también perturban la estabilidad de la misma, es decir, perturban la capacidad de la enzima para mantener su actividad (Illanes, 2008).

Dentro de los métodos analíticos empleados para determinar la actividad enzimática, la espectrofotometría es la más usada debido a su sensibilidad, reproductibilidad y bajo costo. Un aspecto fundamental en el análisis de actividad enzimática es el empleo de un blanco testigo para discriminar la generación de producto causado por la reacción enzimática (Acevedo *et al.*, 2002).

En la reacción enzimática es posible distinguir tres etapas. En la primera la concentración de enzima cae bruscamente debido a que la mayor parte de la misma se combina con el sustrato para formar el complejo enzima- sustrato. En la segunda se alcanza la actividad máxima, una vez transformada la molécula de sustrato, la enzima puede unirse a otra. En la última etapa la concentración de sustrato se ve apreciablemente disminuida, esta etapa es importante en procesos que buscan la conversión total, por lo que la interacción sustrato-producto y las condiciones de reacción son muy importantes. (Rodríguez, 1991)

La actividad catalítica de la enzima depende de: la forma en que se lleve la unión entre enzima y sustrato y la naturaleza polifuncional de su centro activo en el que diferentes grupos funcionales participan (carboxilo, hidroxilo, sulfídrico, amino e imidazol), junto con algunos ligandos metálicos (Silva, 2011).

La actividad enzimática se expresa en términos de unidades de actividad (U.I) que es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto en condiciones ambientales definidas (Acevedo *et al.*, 2002) o también se puede expresar como los micromoles de sustrato convertido o producto generado por minuto, bajo condiciones específicas de ensayo. La actividad específica es una medida de pureza de la proteína que se expresa como el cociente

entre la actividad enzimática y la cantidad de proteínas totales, cuya medición es U/mg proteína o U/mL proteína (Cifuentes y Rojas, 2005).

Estudios de actividad para β -Glucosidasa

Ensayos efectuados a la enzima β -Glucosidasa desde *A. niger* por Watanabe *et al.* (1992) determinaron los efectos del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de esta y se muestran en la Figura 10.

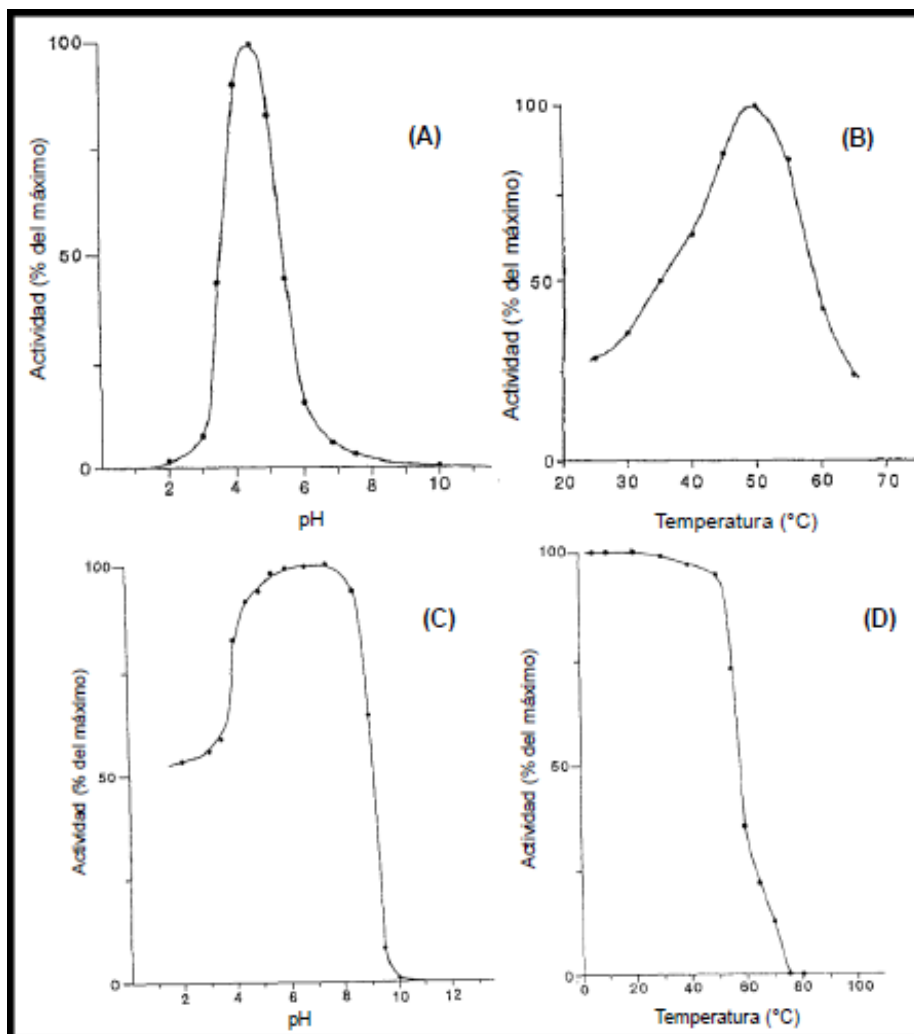


Figura 10.- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la β -Glucosidasa. Donde (A) indica el efecto del pH (rango 3,0 hasta 7,5) sobre la actividad de la enzima (50°C por 5 min) en sustrato pNpp- β -D-glucosido, (B) Temperatura óptima para la hidrólisis de pNpp- β -D-glucosido, (5 min a pH 4,5), (C) Estabilidad frente a cambios de pH sobre la enzima, la cual se incubó a 20 °C (20 horas en buffer pH entre 2,0 y 10). (D) Estabilidad térmica entre (5 a 80°C) (Watanabe *et al.*, 1992).

La Figura 11 muestra el estudio realizado por de Bravo *et al.* (1999) sobre la enzima β -Glucosidasa de *Aspergillus niger*, la cual fue sometida a ensayos de distintas temperaturas.

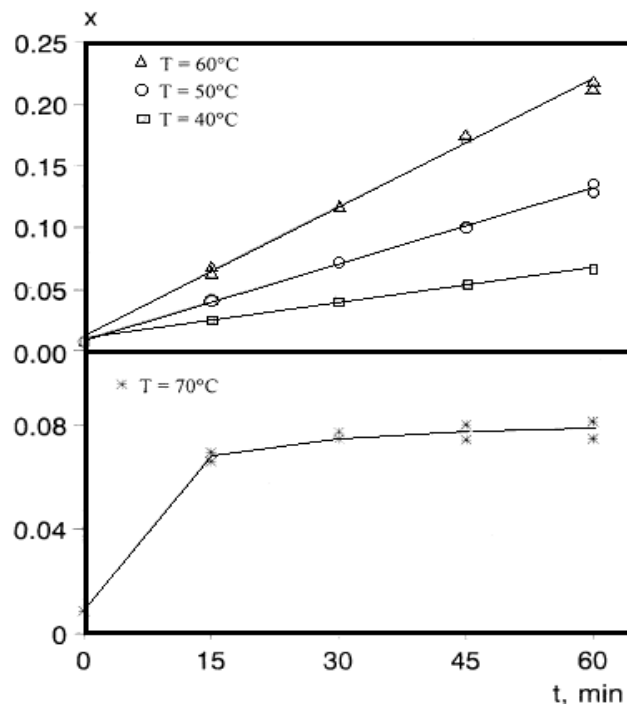


Figura 11.- Efectos de la temperatura en la hidrólisis enzimática de celobiosa, utilizando 75 mM de celobiosa y concentración de enzima de 0,5 g/L (Bravo *et al.*, 1999).

Entre 40 °C a 60 °C a pH 4,9 la enzima no perdió nada de su actividad durante un periodo de 5 horas. Sin embargo, a 70 °C ésta experimento una rápida desactivación.

4.6.- Inmovilización Enzimática

La inmovilización consiste en mantener la enzima confinada físicamente en una determinada región del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica, además le confiere a la enzima la capacidad de separarse con facilidad del sustrato y producto, lo cual permite su reutilización, o bien, el establecimiento de un proceso continuo con el que se logra mejorar su rendimiento (Arroyo, 1998; Illanes, 2008). Las enzimas pueden ser inmovilizadas en soportes

naturales y/o sintéticos por medios químicos (uniéndolas al sustrato mediante enlaces covalentes) o físicos (fuerzas electrostáticas o membranas), y pueden además ser encapsuladas mecánicamente por la adición de agentes que formen una película protectora alrededor de la enzima inmovilizada, permitiendo el paso de reactivos y productos de pequeño tamaño, pero no de proteínas (Fajardo *et al.*, 2011).

Con la inmovilización de las enzimas es posible mejorar la estabilidad y actividad de la enzima en función del pH y la temperatura, además, al ser inmovilizadas quedan protegidas ante enzimas proteolíticas, aumentando así la eficiencia del sistema y aumentando la facilidad de recuperación y purificación de los productos. Sin embargo, la naturaleza heterogénea de un catalizador inmovilizado presenta ciertas desventajas, por ejemplo, la actividad de la enzima puede verse afectada, la velocidad de reacción puede estar limitada por la velocidad de difusión de sustratos y productos hacia dentro y fuera del sistema, el intervalo de pH de trabajo puede ser distinto al del biocatalizador (Fajardo *et al.*, 2011).

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: retención física y retención química, como se muestra en la Figura 12. Desde la perspectiva industrial, la sencillez y la relación costo/eficacia es la clave para la elección de la técnica de inmovilización (Illanes, 2008).

Los mecanismos de inmovilización de la Figura 12 se explican a continuación:

- Retención física: A1) Atrapamiento en gel: retención de la enzima en el interior de los espacios intersticiales durante la formación de un gel de polímero; A2) Atrapamiento en fibra: retención en microcavidades fibrosas sintéticas; B1) Microencapsulación: Las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto; B2) Reactores de membrana: las enzimas quedan atrapadas en un reactor de membrana permeable al producto final e impermeable a la enzima.

- Unión a un Soporte: C1) Adsorción: la enzima se une al soporte mediante interacción iónica, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno; C2) Unión covalente: las enzimas se unen covalentemente a soportes insolubles. C3) Reactivo bifuncional: Activación de los grupos químicos del soporte con un agente bifuncional para que reaccionen con los nucleófilos de las enzimas que no sean esenciales para la acción catalítica; Entrecruzamiento D1) Uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares irreversibles entre las enzimas D2) Co-reticulado: permite eliminar las pérdidas de actividad debidas a efectos difusionales mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina.

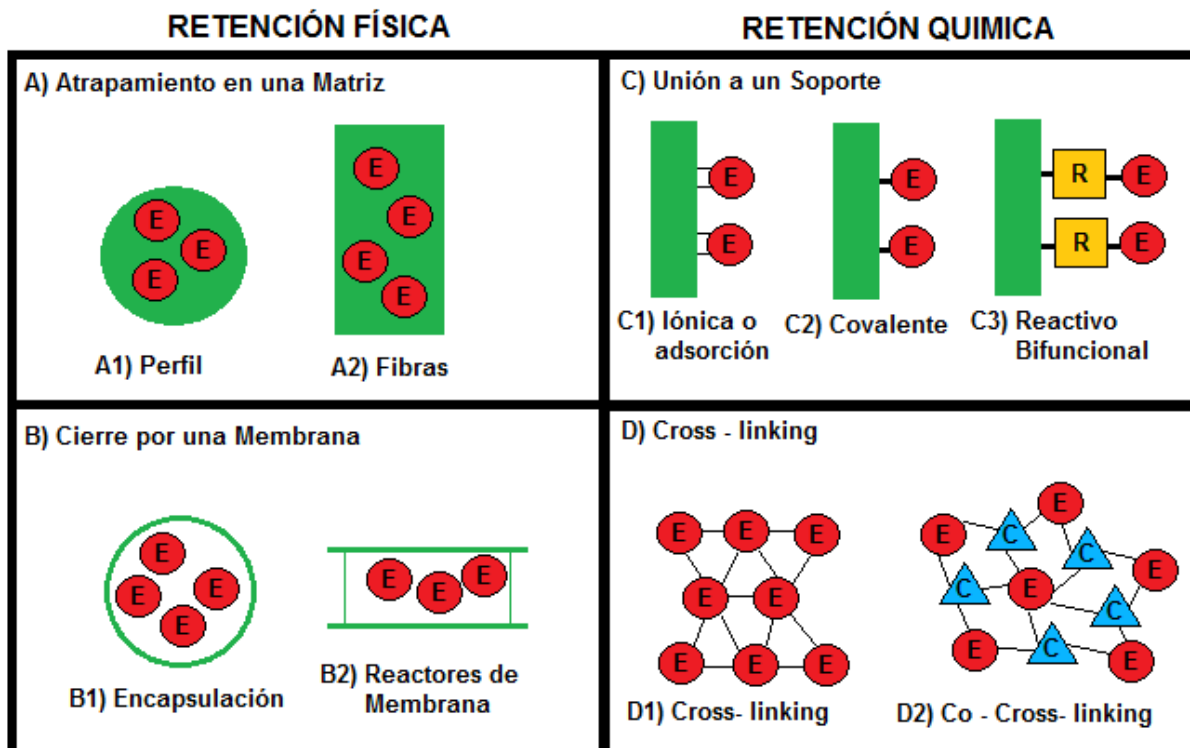


Figura 12.- Métodos de Inmovilización Enzimática; Retención física y química (Fuente: elaboración propia).

Un resumen de algunas propiedades para las diferentes clases de Inmovilización se muestra en la Tabla 1, en la cual se diferencian distintas características entre las principales técnicas de inmovilización (Cifuentes y Rojas, 2005). La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción

biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores.

Tabla 1.- Comparación entre las diferentes técnicas de inmovilización enzimática (Cifuentes y Rojas, 2005).

Características	Entrecruzamiento	Adsorción	Enlace Iónico	Quelación	Enlace Covalente	Atrapamiento
Preparación	Intermedia	Simple	Simple	Simple	Difícil	Difícil
Fuerza Enlace	Fuerte	Débil	Intermedio	Intermedia	fuerte	Intermedia
Actividad Enzimática	Baja	Intermedia	Alta	Alta	Alta	Baja
Regenerabilidad Soporte	Imposible	Posible	Posible	Posible	Rara	Imposible
Costo Inmovilización	Intermedio	Bajo	Bajo	Intermedio	Alto	Intermedia
Estabilidad	Alta	Baja	Intermedia	Intermedia	Alta	Alta
Aplicabilidad	No	Si	Sí	No	No	Sí

En general, los métodos de preparación difícil y de mayor costo proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos; en cambio aquellos métodos más sencillos como la adsorción, donde la unión de la enzima con el soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que deben ser repuestos continuamente (Arroyo, 1998; Cifuentes y Rojas, 2005).

A continuación se detalla el método de inmovilización por unión a un soporte por medio de un enlace covalente y utilizando un reactivo bifuncional.

4.6.1.- Inmovilización por unión a un soporte

La inmovilización de proteínas por métodos basados en la formación de enlaces covalentes están entre los más usados. La ventaja de estos métodos reside en la naturaleza estable de los enlaces formados entre las enzimas y el soporte. De igual manera, las enzimas en este método no son liberadas en la solución en uso (Fajardo *et al.*, 2011). El enlace normalmente se forma entre el grupo funcional presente sobre la superficie del soporte y el grupo funcional perteneciente al aminoácido residual

sobre la superficie de la enzima, pero la mayoría de los soportes no poseen grupos funcionales que reaccionen directamente con las enzimas, sino que tienen grupos hidroxilo, amino, amido o carboxilo que necesitan ser activados para poder proceder a el proceso de inmovilización (Silva, 2010).

La metodología de la unión covalente en soportes sólidos se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas (Cifuentes y Rojas, 2005). Los aminoácidos de las enzimas más involucrados son los del grupo amino (NH_2) de la lisina o arginina, el grupo carboxilo (COOH) del ácido aspártico o el ácido glutámico, el grupo hidroxilo (OH) de la serina o treonina, y el grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína, el resto de los aminoácidos, debido a su carácter hidrofobo, no se encuentran expuestos al exterior y no pueden intervenir con la unión covalente. Los grupos reactivos en orden de mayor a menor reactividad son: $(-\text{S}-) > (-\text{SH}) > (-\text{O}-) > (-\text{NH}_2) > (-\text{COO}-) > (-\text{OH}) \gg (-\text{NH}_3^+)$ (Silva, 2010). Estos aminoácidos no deben ser esenciales en la acción catalítica, además no se pueden utilizar agentes que puedan afectar a su unión con el sustrato o con los centros activos de la enzima. Con respecto a esto existen varios métodos para alcanzar mejores actividades de la enzima inmovilizada evitando las reacciones de inactivación con los aminoácidos de los centros activos: enlaces covalentes de enzima en presencia de un sustrato o un inhibidor competitivo, enlace de un complejo enzima-inhibidor formado mediante un enlace covalente reversible, uso de enzima soluble modificada químicamente de forma que el enlace covalente a la matriz se lleve a cabo mediante los residuos nuevos incorporados o el uso del zimógeno precursor (Cifuentes y Rojas, 2005).

En este método se enlaza covalentemente la enzima con un soporte insoluble natural o sintético. El enlace se da entre algún grupo funcional reactivo de la enzima y el soporte previamente activado, generalmente recubierto con grupos funcionales orgánicos en la superficie. El seguimiento de la inmovilización se realiza cuantificando la concentración de proteína libre, y de la proteína unida covalentemente al soporte (generalmente por el método de Bradford). Las ventajas que presenta el método son que la carga permanece constante después de la

inmovilización, los derivados pueden utilizarse en reactores continuos o de lecho fluidizado y una mayor resistencia a la desactivación por efecto de la temperatura y pH al estabilizar la estructura terciaria. Las desventajas de este método radican en el sitio del enlace, ya que puede modificarse el sitio activo o pueden ocurrir impedimentos estéricos que reduzcan la actividad. Sin embargo, esto es poco probable y puede verse reducido al dirigir el enlace a sitios específicos y/o con una orientación molecular definida. Además, la unión por enlace covalente confiere a la enzima una inmovilización más estable a cambios de pH y temperatura en el medio (Fajardo *et al.*, 2011).

Otra técnica de inmovilización muy parecida a la anteriormente descrita es la que se basa en la inclusión de agentes bi o multifuncionales (*linker*) o agentes enlazantes, que actúan entre la enzima y el soporte, y entre las enzimas, generando agregados entrecruzados (ver Figura 12). Este método implica la adición de una cantidad adecuada de *linker* a una disolución de enzima en las condiciones que conduzcan a la formación del mayor número de enlaces covalentes múltiples del soporte al *linker* y de este a la enzima.

El agente utilizado en el entrecruzamiento debe poseer dos grupos funcionales idénticos (agente homobifuncional) o dos o más grupos funcionales diferentes (agente heterobifuncional o heteromultifuncional) siendo los segundos más frecuentes en la unión de enzimas a soportes insolubles que en las reacciones de entrecruzamiento intermolecular (Rodríguez, 1991). Entre los *linkers* de entrecruzamiento se utilizan reactivos como: dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del entrecruzamiento son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Arroyo, 1998).

Los *linkers* se seleccionan según sus reactividades químicas, es decir, especificidad especial con grupos funcionales. Algunas características a considerar en la elección de un *linker* son: especificidad química, rango molecular (longitud) de

un agente de enlazante, solubilidad en agua y permeabilidad de la membrana celular, iguales o diferente grupos funcionales, reactividad espontanea o fotorreactividad, y capacidad de disociación (Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook, 2009³).

Las principales desventajas de este método, que limitan de forma importante su utilización, son: los problemas para controlar la reacción, la necesidad de grandes cantidades de enzima, gran parte de la cual pierde su actividad por reacciones que tienen lugar en su centro activo y la naturaleza gelatinosa del producto final (Rodríguez, 1991).

La mayor parte de los soportes no poseen grupos reactivos pero tienen grupos hidroxilo, amino, amida o carboxilo que requieren una activación tras la cual pueden ser utilizados en la inmovilización (Rodríguez, 1991).

4.6.2.- Efectos de la inmovilización

El proceso de inmovilización puede modificar tanto la cinética como las propiedades de las enzimas provocando una disminución de la actividad específica. Además se pueden producir cambios en la estabilidad de la enzima y siendo que está en un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.), la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno (Rodríguez, 1991).

Efectos en la estabilidad de la enzima

Se producen cambios conformacionales en las moléculas de enzima debido a modificaciones de los aminoácidos que constituyen el centro activo de la misma. Los cambios en la estructura proteica de la enzima y/o cambios en su cargase deben a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte (Rodríguez, 1991), que hacen

³ http://www.piercenet.com/files/1601673_Crosslink_HB_Intl.pdf

que la estructura terciaria de la enzima adquiriera una mayor rigidez y se haga más resistente a la desactivación térmica o química. Esto se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados (Arroyo, 1998).

Efectos en la actividad de la enzima

Tras la inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que: (1) la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido (2) los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima (3) la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva (4) las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima. Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del micro entorno los que se detallan a continuación (Arroyo, 1998; Cifuentes y Rojas, 2005):

- a) Efectos difusionales: Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.
- b) Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte: de tal manera que, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción. Cuando el sustrato y el soporte tienen cargas opuestas, el valor de K_M aparente puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución.
- c) Efectos estéricos o de tamaño de sustrato: Cuando el tamaño del sustrato y la enzima puede afectar a la interacción entre ellos. Cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero

si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Por ejemplo, muchas hidrolasas unidas covalentemente a soportes sólidos, a pesar de que son muy activas frente a sustratos pequeños, muestran una actividad muy baja hacia proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos.

- d) Efectos en el micro entorno: La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar.

4.7.- Enlazadores o Linkers

4.7.1.- Glutaraldehído

Compuesto químico de la familia de los aldehídos (Figura 13), que normalmente se presenta como un líquido transparente que se encuentra en solución acuosa y en estado puro forma cristales transparentes. Las soluciones de Glutaraldehído se usan en la esterilización en frío de equipo médico y dental, en el curtido de cuero y en sistemas para tratamiento de aguas, y como preservativo químico. (Hoja informativa sobre sustancias peligrosas, 2000⁴)

Presenta una gran reactividad en soluciones acuosas y es el agente más utilizado debido a su eficiencia en la estabilización de biomateriales, además es fácilmente disponible y económico (Pasini *et al.*, 2010). El Glutaraldehído es un *linker* indiscriminado y agresivo que se utiliza comúnmente para preparar conjugados anticuerpo-enzima (Hayworth, 2013).

En soluciones acuosas ligeramente ácidas es relativamente estable. En medio alcalino, en cambio, la reactividad es más alta, pudiendo llegar a ser violenta a pH

⁴<http://www2.udec.cl/matpel/sustanciaspdf/g/GLUTARALDEHIDO.pdf>

elevados. En este medio con las condiciones recientemente mencionadas y a temperatura ambiente, los extremos aldehídos reaccionan rápidamente con los grupos amino de las proteínas, desnaturalizándolas, razón por la cual se utiliza como antiséptico (Foresti y Ferreira, 2007; Silva 2010).



Figura 13.- Estructura química del Glutaraldehído (Sigma Aldrich⁵)

El Glutaraldehído es reactivo, susceptible de polimerizar y oxidar, que reacciona con compuestos que contienen oxígeno activo y nitrógeno. Entre los aldehídos conocidos, es uno de los mejores agentes de entrecruzamiento de proteínas. Además el Glutaraldehído es uno de los compuestos más frecuentemente utilizados para la inmovilización de enzimas pues se proporciona una unión más estable entre los grupos amino de la enzima y los grupos carbonilo del Glutaraldehído (Verma *et al.*, 2013).

Usando baja fuerza iónica, la naturaleza catiónica de la superficie permite la inmovilización rápida de las proteínas con dos posibilidades diferentes (Figura 14): (1) Activar el soporte e inmovilizar la enzima en un soporte Glutaraldehído-activado (en este caso, la inmovilización se promueve mediante intercambio iónico) o (2) Adsorber las proteínas en los soportes aminados y tratar la preparación inmovilizada con Glutaraldehído para reticular tanto la enzima y el soporte (Chang y Juang, 2007). En ambos procedimientos la enzima primero se adsorbe iónicamente y posteriormente reacciona con el Glutaraldehído quedando inmovilizada covalentemente al soporte. Sin embargo hay una diferencia importante entre estas dos estrategias; la modificación química de la enzima usando soportes preactivados es mucho menor que cuando el enzima es previamente inmovilizada tratada con Glutaraldehído (López, 2006).

⁵<http://www.sigmaaldrich.com/chile.html>

La estructura resultante de la reacción entre el Glutaraldehído y los grupos amino está todavía bajo discusión. Sin embargo controlando las condiciones de activación se pueden obtener soportes con una o con dos moléculas de Glutaraldehído por grupo amino. Esto es importante puesto que estos soportes tienen diferentes propiedades a la hora de inmovilizar y estabilizar proteínas (Betancor *et al.*, 2006). Por otro lado, el pH usado para llevar a cabo la inmovilización en soportes preactivados es de entre 7,0 - 8,5 debido a la baja estabilidad del Glutaraldehído a valores más altos de pH. En estas condiciones de inmovilización los grupos amino de las lisinas son muy poco reactivos, entorpeciendo una interacción entre la enzima y el soporte. Por el contrario, cuando la enzima primero se adsorbe a un soporte con aminos primarios, generalmente mediante un mecanismo de intercambio aniónico, y es tratado con Glutaraldehído en condiciones suaves de reacción, todos los grupos amino de la enzima y del soporte son modificados con una molécula de Glutaraldehído. Esto puede favorecer la reactividad entre dos moléculas de Glutaraldehído, una del soporte y otra de la enzima, bajo un rango más amplio de condiciones de reacción. De esta manera, los grupos amino de las lisinas de la enzima quedarán unidos covalentemente a los grupos amino primario del soporte a través de dos moléculas de Glutaraldehído estableciendo una unión covalente multipuntual entre la enzima y el soporte (López, 2006).

El uso de Glutaraldehído como reactivo para activar la superficie de soportes y enlazar covalentemente enzimas a los mismos es una estrategia para la inmovilización en fase sólida ampliamente utilizada. Matrices como agarosa, nylon y quitosano, se han utilizado con buenos resultados para inmovilizar enzimas después de ser activadas con Glutaraldehído (Romo, 2011).

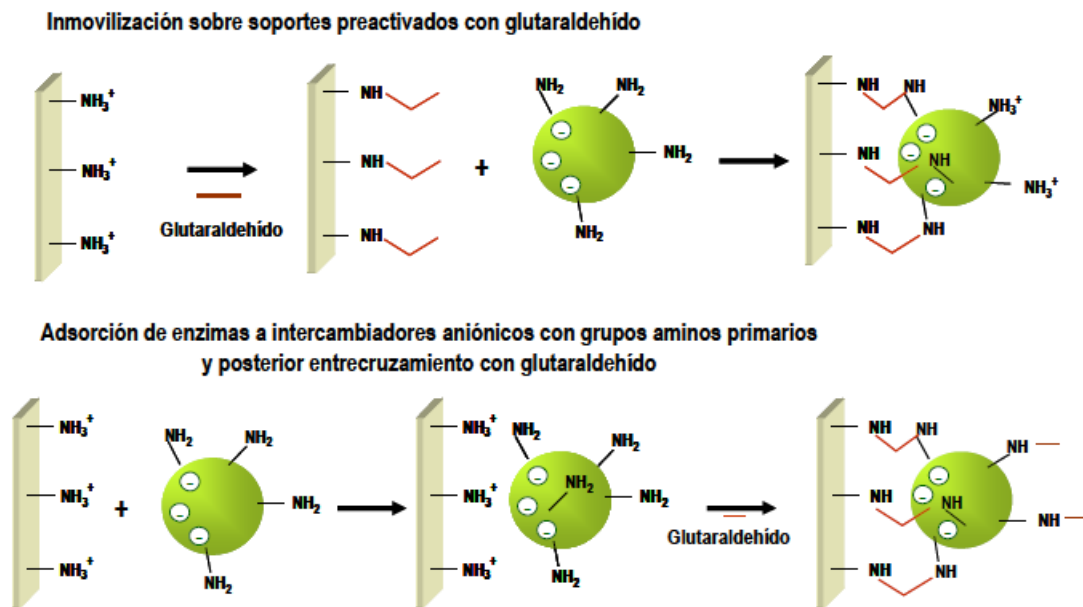


Figura 14.- Estrategias de la inmovilización covalente multipuntual a través de la química del Glutaraldehído (López, 2006).

4.7.2.- EDC (1-Etil- 3-(dimetilaminopropil) carbodiimida)

Las carbodiimidas son compuestos orgánicos caracterizados por el grupo funcional $RN=C=NR$, especialmente atractivo en aplicaciones biológicas. El más popular es el EDC (Figura 15), agente enlazador de longitud cero, soluble en agua y se utiliza comúnmente en la formación de enlaces amina en síntesis de péptidos, unión de haptenos a proteínas transportadoras para formar inmunógenos, en marcar ácidos nucleicos y crear aminas reactivas (Thermo Scientific: Pierce Protein Biology Products⁶).

El EDC es un agente activante de grupos carboxilos de residuos de ácido glutámico o aspártico para reaccionar con grupos amino de otra cadena, formando enlaces amida (Powell y Boyce, 2006).

⁶<http://www.piercenet.com>

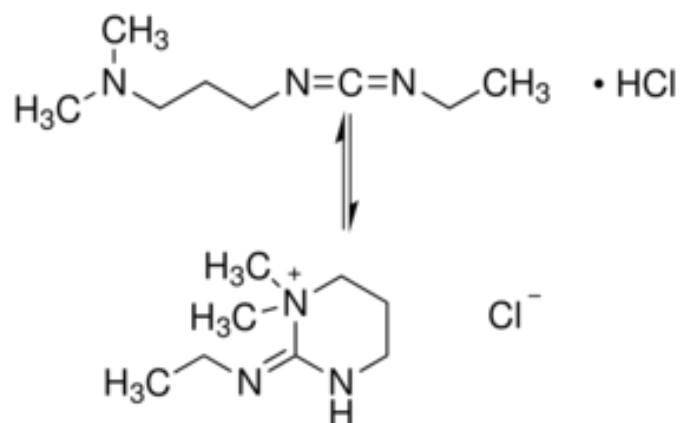


Figura 15.- Estructura química del EDC. La molécula de HCl (Acido clorhídrico) es necesaria para que el H de la molecula se una al electron libre de la amina, dejando Cl en el medio. De esta forma el EDC deja de ser reactivo en el medio (Sigma-Aldrich).

El EDC se utiliza comúnmente como agente entrecruzador de fibras de colágeno, reaccionando con los grupos ácido carboxílico del polímero, disminuyendo su tasa de degradación y aumentando su temperatura de desnaturalización (Powell, 2006). En presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Figura 16) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), el EDC actúa como catalizador (Keogh *et al.*, 2010) y a menudo se utilizan para mejorar la eficiencia o para crear un intermediario más estable (Hayworth, 2013).

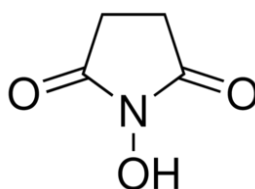


Figura 16.- Estructura química de la N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich).

4.8.- Soportes sólidos para inmovilización

Las características de las matrices o soportes son de gran importancia en la determinación de la eficiencia del sistema de inmovilización de enzimas. Las propiedades ideales de un soporte incluyen: la resistencia física a la compresión, hidrofobicidad, inertes entre las enzimas y sus derivados, alta afinidad por las

proteínas o biocompatibilidad, disponibilidad de grupos funcionales reactivos, alta capacidad de carga enzimática, resistencia al ataque microbiano y bajo costo (Foresti y Ferreira, 2007; Fajardo *et al.*, 2011). Asimismo, los soportes pueden clasificarse en inorgánicos (arcillas, óxidos de metales y vidrio poroso, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.) y orgánicos (celulosa, almidón, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, colágeno, queratina, poliestireno, polímeros acrílicos, alcohol polivinílico, poliamidas, etc.), en función de su composición química. Específicamente los soportes orgánicos pueden dividirse en polímeros naturales y sintéticos (Fajardo *et al.*, 2011).

El soporte debe ser capaz de facilitar la formación del complejo enzima-sustrato, disminuir la inhibición por producto, modificar el pH óptimo al valor deseado, aumentar la estabilidad térmica de la enzima y permitir que la enzima inmovilizada sea fácilmente recuperable para su reutilización. Algunos soportes pueden ser activados para la unión directa a un agente enlazante, otros se apoyan en grupos nucleófilos u otros grupos funcionales que pueden estar vinculados a las proteínas que utilizan *linkers* (Rodríguez, 1991).

Dentro de una gran gama de materiales de soportes de inmovilización una buena opción es el quitosano. Este material es biocompatible, no-toxico y de remarcada afinidad con las proteínas (Cifuentes y Rojas, 2005).

4.8.1.- Quitosano

Entre los materiales naturales más usados en la actualidad una pareja de polisacáridos ha tomado mucho auge por la infinidad de aplicaciones que ha logrado encontrarseles y, especialmente por su poco impacto ambiental; la quitina y el quitosano (Silva, 2010). La quitina es un componente importante de las conchas de los crustáceos y de los exoesqueletos de los insectos, mientras que el quitosano se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y

hongos, por ejemplo: *Mucorrouxii*, en donde llega a representar hasta un tercio de su peso (Krajewska, 2003).

El grupo acetamido de la quitina se puede convertir en grupo amino del quitosano tratando la quitina con una solución alcalina concentrada. Si la desacetilación de la quitina (poli (β -N-acetil-glucosamina)), elimina al menos un 50% de sus grupos acetilo, y se convierte en quitosano (poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)), cuando el grado de desacetilación alcanza el 100% el polímero se conoce como quitano (Lárez, 2006). Sin embargo, las aplicaciones de la quitina son limitadas en comparación a las del quitosano debido a que es químicamente inerte (Agnihotri *et al.*, 2004).

El quitosano es un biopolímero biodegradable que posee características antimicrobianas, absorbe metales pesados como el mercurio, cadmio, plomo, etc., ya que su grupo amino puede servir como sitio de quelación (Chang y Juang, 2007). Además, presenta una alta afinidad hacia proteínas y ha sido utilizado para la inmovilización de enzimas, tales como: lipasa, α -amilasa, β -Glucosidasa e invertasa. Es un soporte barato, no tóxico y no perjudicial para las enzimas, posee muchas ventajas como una excelente hidrofiliidad, carga positiva que atrae todo elemento que tenga iones de carga negativa, alta porosidad, y gran área de adherencia que dan lugar a un bajo obstáculo estérico de las enzimas y por lo tanto una baja resistencia de transferencia de masa (Chang y Juang, 2007). Posee una estructura básicamente similar a la de la celulosa en donde el hidroxilo del Carbono 2 se ha reemplazado por un grupo amino acetilado formando unidades repetitivas de N-acetil-glucosamina en enlaces β 1-4 (Figura 17) (Krajewka, 2003).

Además, al ser un polisacárido catiónico en condiciones de pH neutro o básico, contiene grupos amino libre y, por tanto, es insoluble en agua. A pH ácido, los grupos amino pueden sufrir protonación, haciéndolo soluble en agua bajo dichas condiciones. La solubilidad del quitosano depende de la distribución de las aminas libres y de los grupos N-acetil. Normalmente soluciones acuosas de ácido acético 1-3% se utilizan para solubilizar el quitosano (Agnihotri *et al.*, 2004).

La inmovilización enzimática en este polímero insoluble en agua, ha sido una alternativa bastante estudiada en el último tiempo (Silva, 2010). Los grupos hidroxilo (-OH) y amino (-NH₂), que posee facilitan el vínculo con las enzimas y puede ser entrecruzados con Glutaraldehído para evitar la disolución en soluciones ácidas (pH <2) (Chang y Juang, 2007) permitiendo su ligación covalente con la enzima. En este proceso, la enzima exhibe una considerable inmovilización en el quitosano, presentando buenos rendimientos (Silva, 2010).

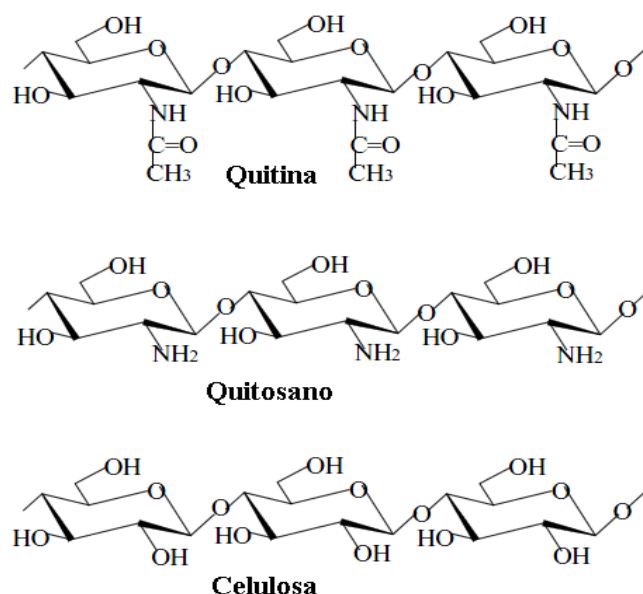


Figura 17.- Estructura de la quitina, quitosano y celulosa (Krajewska, 2003).

La emulsión por entrecruzamiento del quitosano es un método en el que el grupo reactivo de la amina del quitosano se entrecruza con un agente enlazante como grupos aldehído del Glutaraldehído, este método de emulsión agua de quitosano con aceite se realiza para endurecer las gotas en la preparación de microesferas, el tamaño de las esferas puede ser controlado. Al tener la solución en emulsión se garantiza que la solidificación se realice en forma de microesferas (Figura 18), (Agnihotri *et al.*, 2004).

La inmovilización de enzimas en el quitosano se puede lograr por medio de la reacción de Glutaraldehído entre los grupos amino libres de quitosano y la molécula de enzima formando enlaces covalentes. Los grupos amino del quitosano se ponen en contacto con la enzima y se producen enlaces covalentes entre aminoácidos

libres y los grupos carbonilo del Glutaraldehído y la posibilidad de adsorción iónica del Glutaraldehído en el caso de soportes aminados (Foresti y Ferreira, 2007).

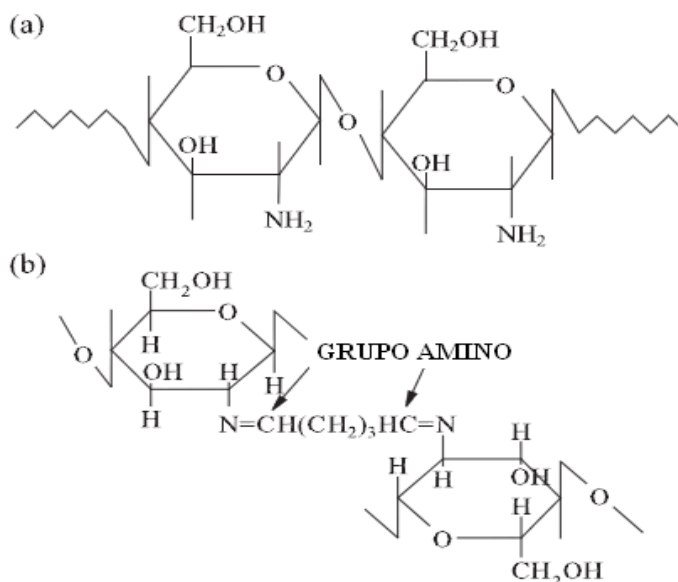


Figura 18.- (A) Estructura del quitosano [poli (β-N-acetil-glucosamina-co-β-glucosamina)]. (B) Estructura de quitosano entrecruzado (Agnihotri *et al.*, 2004).

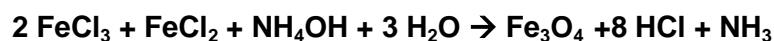
Las microesferas de quitosano entrelazadas son más aplicables a la ingeniería bioquímica debido a su mayor resistencia mecánica, sin embargo, todavía hay defectos de funcionamiento, por ejemplo, la densidad es demasiado cerca a la del agua (lo que provoca que flote fácilmente) y la textura sea demasiado blanda. Esto limita en gran manera las aplicaciones industriales del quitosano, sin embargo este problema puede ser resuelto cuando el quitosano se mezcla con algunos polvos sólidos como: arcillas y carbones activados para aumentar su densidad y resistencia mecánica (Chang y Juang, 2007).

4.8.2.- Microesferas Magnéticas de quitosano fierro

Las nanopartículas magnéticas de fierro, son partículas superparamagnéticas que responden a un campo magnético, pero no son imanes entre sí y no conservan magnetismo residual después de ser separadas del imán, tienen una baja toxicidad y fuertes propiedades magnéticas (Aguayo, 2011). Se les pueden acoplar ligandos o

grupos funcionales que les confieren las propiedades efectivas para el acoplamiento específico, permitiendo de esta forma una rápida, simple y eficiente separación de objetos biológicos, incluso a escala industrial (Peniche *et al.*, 2002). El magnetismo viene dado por el óxido ferroso-férrico, también conocido como magnetita (Fe_3O_4).

Se obtiene tras la co-precipitación de óxido férrico y ferroso por medio de una solución de hidróxido de amonio bajo condiciones determinadas de temperatura (Aguayo, 2011). La siguiente ecuación química muestra la reacción del proceso de formación de la magnetita:



Las microesferas superparamagnéticas resultan de gran utilidad en la separación y aislamiento de células y otros productos biológicos, ya que pueden disminuir considerablemente el tiempo de separación y a su vez ser aislados fácilmente aplicando un campo magnético externo. Cabe destacar que tanto células animales como vegetales pueden ser separadas mediante el uso de microesferas magnéticas (Aguayo, 2011).

En los procedimientos tales como, separación, purificación y en las diversas unidades de operación (centrifugación, precipitación, mezcla, aplicación de altas presiones, entre otras) de los procesos bioquímicos, se han observado que las biomoléculas pueden ser afectadas, de tal forma que estas se pueden inactivar, descomponer o deformar. Es por ello que la inmovilización de enzimas sobre microesferas magnéticas puede ser una alternativa para solucionar esta serie de inconvenientes (Silva, 2010).

La característica magnética de las microesferas facilita en gran medida la separación de la enzima inmovilizada desde el sistema de suspensiones sólido de la hidrólisis por lo tanto puede simplificar el proceso de reciclaje (Zheng *et al.*, 2013).

Las microesferas magnéticas de quitosano-ferro poseen propiedades paramagnéticas y además tienen aminas libres en su superficie lo cual indica que

son excelentes para procesos de inmovilización al tener grupos amino expuestos en su superficie, lo que permite una unión covalente con los *linker*, que a su vez se acopla a la enzima β -Glucosidasa por medio de este mismo tipo de unión (Silva, 2010). Los grupos reactivos amino e hidroxilo del quitosano son susceptibles de modificaciones químicas y tratamientos de activación, tales como el pretratamiento con Glutaraldehído. Entonces, quitosano pretratado se pone en contacto con la solución de enzima, y se producen enlaces covalentes entre los aminoácidos libres y grupos carbonilo del dialdehído, la metodología es muy simple y permite mejorar la estabilidad de la enzima (Foresti y Ferreira, 2007).

Las microesferas magnéticas elaboradas por Silva (2010) se obtuvieron a partir de nanopartículas magnéticas de óxido ferroso-férrico (Fe_3O_4) las cuales fueron sumergidas en una solución de quitosano con ácido acético, y luego emulsionadas con aceite de maravilla, n-hexano y Tween 80, y posteriormente estabilizadas por entrecruzamiento con Glutaraldehído para la solidificación del quitosano lo cual estabilizó la estructura generando un tamaño de las microesferas de aproximadamente de 707 μm . Los polímeros de quitosano le aportaron con una variedad de grupos funcionales que se ubican en la superficie, lo cual permite adaptarse a aplicaciones específicas.

CAPÍTULO 5 – MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Materiales y Equipos

5.1.1.- Enzima

- β -Glucosidasa (Novozyme 188, Sigma-Aldrich)

5.1.2.- Reactivos

- Celobiosa (D-(+)-cellobiose, Sigma-Aldrich)
- Microesferas magnéticas de quitosano fierro (soporte)elaboradas por Silva (2010)
- Glutaraldehído (C₅H₈O₂) 25%D(+)
- Glucosa Anhidra (C₆H₁₂O₆)
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimide hydrochloride (EDC)(C₈H₁₇N₃HCl) Sigma-Aldrich purum, $\geq 98.0\%$ (AT)
- N-Hidroxisuccinimida (NHS) (C₄H₅NO₃) 98%
- Ácido acético (C₂H₄O₂)
- Acetato de sódio (CH₃COONa)
- Fosfato sódico monobásico heptahidratado (NaH₂PO₄•7H₂O)
- Fosfato sódico dibásico (Na₂HPO₄)
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Ácido clorhídrico (HCl) 97%- 95%
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃)
- Carbonato de sódio (Na₂HCO₃)
- Acido L- glutámico (C₅ H₇ O₄)
- Kit de Cuantificación de Glucosa (Liquicolor, Human)
- Kit Bradford (Bio-Rad Quick Start Bradford Protein Assay)
- Agua destilada
- Soluciones de calibrado pH metro

5.1.3.- Equipos

- Vortex Mixerter (KMC-1300V)
- Agitador Magnético termorregulado (LMS-1003)
- Balanza de precisión digital (AFA 120LC)
- pH metro (pH 510 Series)
- Espectrofotómetro (Spectrophotometer, 6505 UV/Vis.)
- Baño termorregulado (Thermo-Circulator, LCB-RIZ)
- Estufa (LDO-150N)
- Refrigerador (Samsung)
- Agitador (VS-201D)

5.1.4.- Materiales

- Matraces Aforados 50 a 1000 mL
- Matraces Erlenmeyer 25 a 2000 mL
- Tubos de vidrio de 10 cm con tapa rosca
- Vasos precipitados, Pipetas
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Micropipetas 200, 1000 y 5000 μ L (Eppendorf Research)
- Puntas para micropipeta 200, 1000 y 5000 μ L
- Cubeta de cuarzo (lectura UV) y cubeta de poliuretano (lectura visible)
- Gradillas

5.2.- Metodología Analítica

5.2.1.- Curvas de calibración

A) Protocolo curva de calibración de proteína método Bradford

- Realizar curvas de calibración a partir de una muestra de proteínas BSA (albúmina de suero bovino), con distintas concentraciones conocidas.
- Preparar buffer fosfato 50 mM, (pH 7,0) (Anexo 1A).
- Preparar una solución patrón de BSA (proteína) 1,0 g/L, en buffer fosfato 50 mM (pH 7,0).
- Hacer diluciones (0,1 a 1,0 g/L o 1,25 a 25 mg/L) desde la solución patrón, en buffer fosfato 50 mM (pH 7,0).
- Tomar 20 μ L (o 200 μ L) respectivamente de cada dilución y depositarla en un tubo eppendorf de 1,5 mL.
- Realizar un blanco 20 μ L (o 200 μ L) de buffer fosfato (pH 7,0).
- Adicionar 1mL de Bradford y mezclar por inversión.
- Medir absorbancia a 595 nm.
- Cuantificar la proteína.
- Realizar regresión polinómica de orden 2, en donde el eje “y” corresponde a la absorbancia y el eje “x” a las concentraciones de proteína.

B) Protocolo curva de calibración de proteína para método espectrofotométrico 280 nm

- Hacer diferentes diluciones del preparado enzimático (Novozyme 188) en buffer acetato 50 mM (pH 7,0).
- Medir absorbancia a 280 nm.
- Para las muestras que superan el valor de 1,200 unidades de absorbancia se debe realizar diluciones de la muestra con el mismo buffer. Los valores de absorbancia obtenidos deben ser multiplicados por el factor de dilución de cada

muestra y luego calcular el promedio de estos para determinar la concentración de proteínas presentes en el preparado.

C) Protocolo curva de calibración de la glucosa

- Preparar una solución de buffer acetato 50 mM (pH 4,0) (Anexo 1B).
- Preparar una solución de glucosa 2,0 g/L con buffer acetato 50 mM (pH 4,0).
- Realizar la curva de calibración desde 0,1 a 2,0 g/L desde la solución anterior.
- Tomar 20 μ L (curva normal) o 40 μ L (curva sensible) de cada dilución y depositarla en tubo eppendorf 1,5 mL duplicado y realizar blanco con 20 μ L o 40 μ L de buffer acetato a pH 4,0, depositar en tubo eppendorf en duplicado.
- Adicionar 20 μ L o 40 μ L de NaOH 1 M para inactiva la enzima.
- Medir la glucosa producida, adicionando 1 mL RGT kit glucosa agitar e incubar a 37 °C por 5 minutos.
- Medir absorbancia en espectrofotómetro a 500 nm con un paso de luz de 1cm
- Realizar regresión lineal, en donde el eje “y” corresponde a la absorbancia y el eje “x” a las concentraciones de glucosa.

5.2.2.- Cuantificación de la proteína

A) Método Bradford

Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford, descrito por Bradford (Bradford, 1976) usando el kit de proteínas Bio-Rad, ensayo con BSA (albúmina de suero bovino) como proteína estándar y un agente llamado reactivo de Bradford (Bio-Rad), que al entrar en contacto con proteínas se reduce, cambiando su color del café amarillento al azul intenso.

- Hacer diluciones (0,1 a 1 g/L o 1,25 a 25 mg/L) desde la solución patrón, en buffer fosfato 50 mM (pH 7,0).
- Tomar 20 μ L o 200 μ L, según la dilución con la que se esté trabajando.
- Adicionar 1 mL del kit de Bradford.

- Mezclar por inversión.
- Medir absorbancia a 595 nm.

B) Método espectrofotométrico 280 nm

La mayoría de las proteínas presentan un máximo de absorbancia a 280 nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, con una sensibilidad de 0,05 - 2 mg/L de proteína, por lo tanto al medir la cantidad de proteína mediante el método de absorbancia no fue posible establecer posteriormente una concentración de proteína presente en la muestra, debido a que el método no era 100% exacto (el preparado puede contener otras proteínas que introducirían un error en el valor calculado como concentración). Por esta razón el parámetro sirvió para verificar si había un descenso de la cantidad de enzima y así estimar un porcentaje aproximado de inmovilización.

- Hacer diluciones de la enzima en buffer acetato 50 mM a pH 7,0.
- Medir absorbancia a 280 nm.

5.2.3.- Actividad Enzimática

Fundamento

La actividad enzimática se cuantifica por medio de la glucosa producida en tiempo determinado. Para la cuantificación de glucosa se utilizó al método GLUCOSE (GOD- POD Method and Point). Se usó el reactivo RGT, Reagent del Kit de Glucosa (Liquicolor), compuesto de buffer fosfato (pH 7,5), 4-aminofenazona, fenol, glucosa oxidasa, peroxidasa, mutarotasa y estabilizantes.

La glucosa es oxidada en presencia de glucosa oxidasa (GOD), el peróxido de hidrogeno formado, reacciona bajo la influencia de peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminoantipirina para formar un complejo rojo-violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.



La glucosa se determinó después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrogeno formado reacciona bajo la catálisis de peroxidasa con fenol y 4 aminofenazona formando un complejo rojo- violeta usando la quinoneimina como indicador.

Protocolo general para la medición de actividad enzimática

- Diluir la enzima en buffer acetato 50 mM (pH 4,0).
- Preparar diluciones de celobiosa en buffer acetato 50 mM (pH 4,0).
- Dejar estabilizar ambas diluciones a 40 °C por 10 minutos.
- Tomar 400 µL de la solución de celobiosa y depositarla en un tubo eppendorf de 1,5 mL y adicionar 100 µL de la solución de enzima, mezclando por inversión.
- Depositar inmediatamente la muestra en baño termorregulador a 40 °C y dejar reaccionar por exactamente 10 minutos.
- Tomar 20 µL de cada muestra y depositarla en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y adicionar inmediatamente 20 µL de solución NaOH 1 M a cada muestra para inactivar la enzima por cambio brusco de pH.
- Tomar 20 µL de esta mezcla y adicionar 1 mL del RGT del kit de glucosa y mezclar en vortex.
- Incubar a 37 °C durante 5 minutos.
- Medir absorbancia a 500 nm.
- Medir la glucosa obtenida utilizando la curva de calibrado de glucosa 5.2.1. El valor de absorbancia se transformó a cantidad de glucosa (µM) al dividirlo por su peso molecular.

- Para calcular la actividad dividir la glucosa obtenida por el tiempo de reacción entre la enzima y el sustrato que en este caso es de 10 minutos.

Nota: Al hacer los cálculos de actividad se debe tener en cuenta la cantidad de sustrato y de enzima con la que se realizaron cada uno de los ensayos, para estos estudios fue de 100 μL de enzima por cada 400 μL de celobiosa, por lo que en los cálculos se debe considerar que la enzima esta diluida en 1/5 de reacción, y el sustrato en 4/5 de reacción, por lo tanto el valor elegido de sustrato en la reacción se multiplicara por 5/4.

Corregir la absorbancia por medio de blancos. El valor del blanco debe ser restado de la medición de los ensayos de inmovilización.

Blanco Novozyme: 400 μL de buffer de acetato más 100 μL de Novozyme 188 de la más alta concentración realizada para descartar la presencia de glucosa.

Blanco de buffer acetato: 400 μL de buffer de acetato en tubo eppendorf, más 100 μL de buffer acetato.

Blanco celobiosa: 400 μL de celobiosa más 100 μL de buffer acetato.

5.2.4.- Cinética Enzimática

Fundamento

Se entiende por cinética enzimática, al análisis cuantitativo del efecto de cada uno de los factores que intervienen en la expresión de la actividad enzimática, evaluada a través de la velocidad de reacción catalítica. Las principales variables son: la concentración de enzima, la concentración de sustrato, la concentración de producto, la concentración de inhibidores y activadores como el pH y la temperatura. Otro parámetro importante de evaluar es el tiempo de reacción de la enzima (Acevedo *et al.*, 2002).

Para el caso de enzimas ligadas a soportes (enzimas inmovilizadas) se debe considerar las variables propias de un sistema catalítico en fase heterogénea, que dicen relación con los fenómenos de transporte (Acevedo *et al.*, 2002).

Un principio fundamental de la cinética enzimática es que la velocidad de la reacción catalizada es proporcional a la concentración de proteína enzimática activa en la zona de linealidad de la reacción producto-tiempo (Acevedo *et al.*, 2002).

A) Protocolo de actividad específica de la enzima

- Diluir la enzima en buffer acetato, a concentraciones desde 20×10^{-5} hasta 20×10^{-1} ($\text{mL}_{\text{Novozyme 188}}/\text{mL}_{\text{Solución Buffer Acetato}}$), 50 mM (pH 4,0).
- Utilizar sustrato de celobiosa 1,90 g/L en buffer acetato 50 mM (pH 4,0), cantidad necesaria para producir 2,0 g/L de glucosa, asumiendo un 100% de conversión en la reacción).
- Realizar protocolo general de actividad enzimática enzima libre (punto 5.2.3).
- Graficar glucosa producida versus cantidad de enzima utilizada en la reacción.
- Medir actividad específica mediante los datos de absorbancia.
- Introducir los datos de absorbancia en la ecuación de la recta obtenida a través de la curva de calibrado normal. La concentración de glucosa liberada se obtienen en g/L la cual se transforma en μmol al dividirlo por su masa molar y multiplicarlo por el volumen de la muestra en un tiempo determinado, el cual se representa en $\mu\text{mol}_{\text{glucosa}}/\text{mg}_{\text{enzima}}/\text{min}$.

B) Protocolo de la cinética enzimática

- Preparar una dilución $3,0 \times 10^{-3}$ $\text{mL}_{\text{Novozyme 188}}/\text{mL}_{\text{Solución Buffer Acetato}}$ 50 mM de pH 4,0.
- Preparar diluciones de celobiosa a concentraciones de 0,19 g/L a 3,8 g/L, en buffer acetato 50 mM (pH 4,0).

- Dejar estabilizar las soluciones de enzima y celobiosa en baño termostático por 10 minutos aproximadamente.
- Depositar 400 μL de las soluciones de celobiosa en tubos eppendorf de 1,5 mL y adicionar 100 μL de la enzima, mezclar rápidamente por inversión.
- Dejar reaccionar la muestra en baño termostático a 40 °C, e ir retirando una muestra de 20 μL a los diferentes tiempos preestablecidos (0, 1, 2, 5, 10, 15, y 20 minutos) y depositarla en tubo eppendorf.
- Adicionar 20 μL de una solución de NaOH 1 M para inactivar la enzima.
- Adicionar 1 mL de RGT del Kit de Glucosa y agitar.
- Incubar a 37 °C durante 5 minutos.
- Medir la absorbancia a 500 nm.
- Determinar V_{max} y K_M de la enzima con el sustrato.

5.2.5.- Inmovilización Enzimática

Fundamento

Las microesferas presentan en su superficie los grupos amino del quitosano, los cuales reaccionan con los extremos reactivos del enlazante (*linker*). El complejo formado por el soporte polimérico con el *linker* es mezclado con una solución que contiene la enzima, donde el extremo reactivo libre del enlazante reacciona con el grupo amino de la enzima (Silva, 2010). La enzima para la inmovilización es la β -Glucosidasa proveniente del fungus *Aspergillus niger*.

A) Protocolo general para inmovilización

- Tomar 250 μL de microesferas medidas volumétricamente con tubos eppendorf 1,5 mL y adicionarlas a tubos de ensayo de 10 cm con tapa rosca.
- Lavar las microesferas con buffer de fosfato 50 mM de pH 7,0 y quitar todo el líquido sobrenadante.

- Realizar un previo tratamiento adicionando 2,0 mL de ácido Glutámico, 50 mM en buffer carbonato a pH 10 por 60 minutos bajo agitación mecánica (shaker) a 320 rpm.
- Quitar todo el sobrenadante de ácido glutámico, y lavar 3 veces las microesferas con buffer fosfato pH 7,0 a 50 mM.
- Adicionar el *linker* y dejar reaccionar por 10 minutos.
- Añadir 1 mL de enzima diluida en buffer fosfato pH 7,0 de una concentración conocida. Dejar reaccionar durante 60 minutos bajo agitación mecánica (320 rpm).

Nota: Cada ensayo de inmovilización debe contar con una prueba control. Ésta debe poseer todos los reactivos excepto la enzima y debe ser sometido a las mismas condiciones que los ensayos. El valor del control debe ser restado de la medición de los ensayos de inmovilización.

B) Medición de proteína adsorbida por las microesferas

- Quitar el líquido sobrenadante de las microesferas de tal manera que estas queden secas
- Medir la proteína adsorbida por las microesferas, utilizando el líquido sobrenadante, por método Bradford o método espectrofotométrico directamente a 280 nm (punto 5.2.2).

Nota: Se debe medir las proteínas antes y después de la inmovilización para determinar cuanta es adsorbida en las microesferas.

C) Actividad de la enzima inmovilizada en las microesferas

- Lavar la enzima que quedo inmovilizada en las microesferas, con buffer acetato 50 mM a pH 4,0 y quitar el buffer.
- Preparar dilución de celobiosa en buffer 50 mM a pH 4,0.

- Dejar estabilizar la enzima inmovilizada en las microesferas secas y el sustrato en baño termorregulador a 40 °C por 10 minutos.
- Adicionar 2 mL del sustrato a cada tubo con las microesferas y colocarlos en la estufa a 40 °C bajo agitación mecánica (shaker) a 320 rpm
- Dejar reaccionar por un tiempo de 10, 20 y 30 minutos consecutivos.
- Tomar 40 µL de la reacción y adicionar inmediatamente 40 µL de NaOH. Mezclar en vortex.
- Adicionar 1 mL de kit de glucosa.
- Dejar en estufa a 37 °C por 5 minutos y luego medir absorbancia a 500 nm.
- Determinar la actividad calculando la pendiente de la glucosa obtenida entre los 10, 20 y 30 minutos.

5.3.- Metodología Experimental

Se caracterizó el preparado enzimático Novozyme 188 (β -Glucosidasa) con el fin de obtener la cinética, actividad específica y los perfiles de temperatura y pH. Una vez obtenidos los datos de la enzima libre se procedió a establecer todas las condiciones necesarias para la inmovilización.

A continuación se inmovilizó la enzima en microesferas, utilizando dos tipos de enlazadores, con el fin de determinar cuanta es la máxima glucosa y bajo qué condiciones se produce. Para ello se utilizó un diseño factorial 2^2 .

Posteriormente, se obtuvieron los perfiles de temperatura y pH para la enzima inmovilizada y se realizarán ensayos para verificar su estabilidad en términos de funcionamiento continuo. Además, se calculó el número de operaciones que se pueden realizar por catalizador.

Todo el procedimiento anteriormente descrito se muestra en el diagrama de bloques de la Figura 19.

Nota: La actividad enzimática se midió mediante la mezcla de la enzima (ya sea soluble o inmovilizado) con el sustrato de celobiosa, a pH 4,0 y 40 °C y su unidad fue μmol de glucosa producida por β -Glucosidasa en minutos.

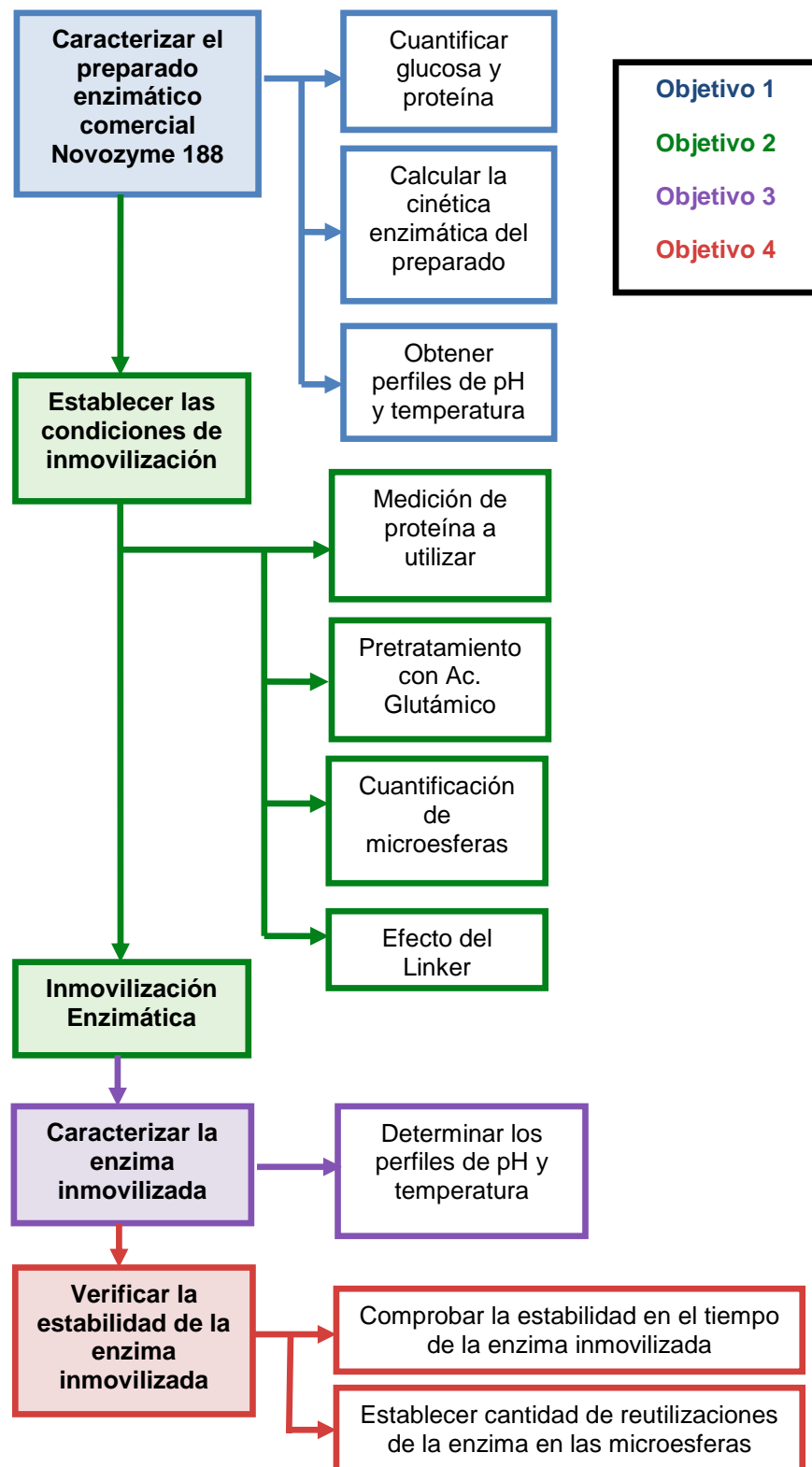


Figura 19.- Diagrama de síntesis de la metodología experimental.

5.3.1.- Caracterización del preparado enzimático

A) Cuantificar la proteína del preparado enzimático comercial Novozyme 188

El preparado enzimático Novozyme 188 es un conglomerado de proteínas de las cuales la mayoría es β -Glucosidasa, sin embargo, para efectos de este estudio, se asumió que todo el preparado contiene solo la enzima β -Glucosidasa. Para determinar la cantidad de proteína que contiene se prepararon distintas diluciones a pH 7,0 en solución de buffer fosfato 50 mM. De esas diluciones se tomó 20 μ L y se depositaron en un tubo eppendorf de 1,5 mL en triplicado, se aplicó el procedimiento del método Bradford (protocolo 5.2.2 A) para luego medir la cantidad de proteína contenida, en la cual los datos de absorbancia obtenidos se introdujeron a la ecuación polinómica de orden 2 obtenida de la curva de calibración de Bradford con BSA y dividiendo por el factor de dilución de la enzima se pudo obtener la concentración de proteínas que contiene el preparado enzimático.

B) Obtener la actividad específica del preparado enzimático

El protocolo utilizado para estimar la actividad específica de la enzima libre se encuentra en el punto 5.2.4 A, en donde se hizo reaccionar distintas concentraciones de enzima con una concentración fija de sustrato de 1,9 g/L, en un tiempo de reacción de 10 minutos.

Se determinó el rango de linealidad de la glucosa producida con una concentración fija de sustrato a distintas concentraciones de enzima. Este rango permite asegurar que desde una cierta concentración del biocatalizador el sustrato se tornara limitante.

Con el rango de linealidad se determinó la glucosa liberada por la enzima la cual se dividió por el tiempo de reacción en minutos para obtener la actividad específica de la enzima, que es la actividad que presenta el preparado enzimático y se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica de la enzima} = \frac{C_g}{(CE \cdot t)} \quad (3)$$

Dónde:

- C_g : Cantidad de glucosa liberada (μmol)
- CE : Cantidad de enzima utilizada (μg ó mg)
- t : tiempo en minutos

C) Obtener la cinética del preparado enzimático

La obtención de la cinética de la β -Glucosidasa se realizó en base a la cantidad de glucosa liberada en el tiempo durante la hidrólisis de la enzima con el sustrato, por medio del protocolo general de actividad punto 5.2.4 B, en donde se hizo reaccionar distintas concentraciones de celobiosa con una concentración fija de enzima a tiempos de reacción de 0 a 20 minutos.

Para cada concentración de sustrato utilizada (0,19; 0,38; 0,76; 1,0; 1,52; 1,9; 3,0 y 3,8 mM) se graficaron las curvas de glucosa producida versus el tiempo de reacción, para así poder determinar la velocidad inicial ($\text{mM}_{\text{glucosa}}/\text{min}$) de cada nivel de sustrato.

La velocidad inicial fue determinada mediante la correlación lineal de cada gráfico en periodos de tiempo que tienden al inicio, debido a que a mayor tiempo la liberación de glucosa es constante y de esta forma se evitan posibles desnaturalizaciones, inactivaciones y competencias de sustrato producto.

Por medio de la elaboración de un gráfico de glucosa liberada el tiempo versus la concentración de celobiosa, se obtuvo los datos necesarios para calcular la V_{max} y K_M , por medio de la ecuación de Michaelis-Menten.

La determinación del K_M y V_{max} se realizó mediante cálculos en base a transformaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando la representación de Lineweaver-Burk con la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración.

D) Cuantificar la actividad de la enzima

La actividad se midió al hacer reaccionar la β -Glucosidasa con la celobiosa cuantificando la glucosa liberada en un tiempo determinado de 10 minutos (ver protocolo de actividad en el punto 5.2.3). La ecuación para obtener la actividad enzimática fue:

$$\text{Actividad enzima libre} = \frac{Cg}{t} \quad (4)$$

Donde:

- AE: Actividad de la enzima libre en ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
- Cg: Cantidad de glucosa liberada determinada en (μmol)
- t: tiempo en (min)

E) Perfiles de Temperatura de la enzima libre

Se determinó la estabilidad térmica de la enzima libre siguiendo el protocolo 5.2.3. Para ello se utilizó una concentración de 1,9 g/L sustrato de celobiosa en la reacción y una concentración de proteína de $3,0 \times 10^{-3}$ (mL_{Novozyme 188}) en la reacción a pH 4,0 y 50 mM.

Estas soluciones se dejaron estabilizar y reaccionar por un tiempo de 10 minutos a las temperaturas de: 20, 30, 40, 45, 50, 60, 65 y 70 °C. Finalmente se graficó la glucosa liberada para cada temperatura en donde eje X es la temperatura y eje Y el porcentaje de glucosa obtenida.

F) Perfiles de pH de la enzima libre

El efecto del pH en la hidrólisis enzimática se determinó siguiendo el protocolo 5.2.3, utilizando diluciones de celobiosa y enzima en buffers de acetato, fosfato y carbonato a pH de 2,0; 3,0; 3,6; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0.

Estas soluciones se dejaron estabilizar a 40 °C por 10 minutos en baño termostático. Posteriormente se graficó la glucosa liberada por cada pH, en donde eje X es el pH y el eje Y porcentaje de glucosa obtenido.

5.3.2.- Establecer las condiciones de inmovilización

La inmovilización enzimática se realizó en microesferas de quitosano fierro utilizando el protocolo 5.2.5 A, para determinar la eficiencia de la inmovilización mediante medición de proteína adsorbida en las microesferas y actividad obtenida después de la inmovilización.

Las dimensiones de la β -Glucosidasa para determinar la concentración de enzimas necesarias para cubrir el total de microesferas para cada ensayo, fueron obtenidas de la enzima derivada de la especie *Trichoderma reesei* porque, por un lado, no se encuentra determinada la estructura tridimensional de la enzima ocupada en este trabajo y, por otro, presenta una estructura similar a la β -Glucosidasa de la especie *Aspergillus niger*, según Jeng *et al.* (2010) y Protein Data Bank⁷ (PDB).

Para determinar si existe mejora en la actividad de la enzima inmovilizada se realizó un previo tratamiento con las microesferas, utilizando un aminoácido (ácido glutámico) para inactivar los grupos aldehídos presentes en la superficie de estas, para así dejar los grupos amino del quitosano libres para la inmovilización, de modo que no interfieran en la unión de la enzima con el *linker*. La adición del ácido glutámico debió ser en un medio básico, puesto que a estos pH las aminos que están libres son protonadas a NH_3 y dejan de ser reactivas.

Mediante una prueba estadística de *t-Student* de dos muestras independientes, se determinó la significancia de los valores de respuesta, entre muestras con pretratamiento y sin pretratamiento.

Con el fin de aumentar la retención activa de la enzima, se estudió la utilización de dos *linkers*, Glutaraldehído y EDC, capaces de unirse al soporte y a las moléculas de enzima. Por lo tanto se determinaron las concentraciones del enlazante a utilizar en la inmovilización en relación a los moles de enzima de cada ensayo. El procedimiento específico para cada *linker* se detalla a continuación:

⁷<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/3ahy/jmol>

- Glutaraldehído: adicionar 1 mL *linker* diluido en buffer fosfato (pH 7,0), dejar reaccionar por 10 minutos bajo agitación mecánica (320 rpm), luego añadir 1 mL de la enzima y dejar durante 60 minutos bajo agitación mecánica (320 rpm).
- EDC: adicionar 1 mL de enzima a las microesferas por 10 minutos y después añadir 0,5 mL de NHS y 0,5 mL EDC diluidos en buffer fosfato 50 mM (pH 7,0). Dejar reaccionar durante 60 minutos bajo agitación mecánica (320 rpm).

Luego se midió la proteína adsorbida por las microesferas y la actividad producida mediante los siguientes cálculos:

Medición de proteína adsorbida

Se determinó la proteína adsorbida en las microesferas utilizando el protocolo 5.2.5 B y fue medida utilizando la ecuación 5:

$$\text{Proteína adsorbida (\%)} = \frac{(C_i - C_s)}{C_i} \cdot 100\% \quad (5)$$

Donde:

- C_i : concentración de enzima inicial (mg/L) para la reacción.
- C_s : concentración de la enzima (mg/L) no unida a las microesferas o la que quedo en el sobrenadante. Para este procedimiento se utilizó blanco buffer fosfato.

Medición de actividad de la enzima inmovilizada

Esta se determinó mediante la pendiente de glucosa liberada en el tiempo utilizando el protocolo 5.2.5 C y su ecuación es la siguiente:

$$\text{Actividad enzima inmovilizada: } \frac{C_g}{t} \quad (6)$$

Donde:

- C_g : Cantidad de glucosa obtenida (μmol) o concentración (μM)
- T : tiempo de reacción 10, 20 y 30 minutos

5.3.3.- Inmovilización enzimática por diseño factorial 2²

Luego de estudiar las condiciones de la inmovilización (pretratamiento, enzima y *linker* a utilizar), se realizó un diseño factorial 2², en donde las variables estudiadas fueron la concentración de enzima y concentración del *linker* (Glutaraldehído y EDC-NHS). Ambas variables se analizaron tanto estadísticamente (análisis de varianza), como experimentalmente (observación en laboratorio).

El diseño permitió evaluar el efecto de todos y cada uno de los factores de manera independiente por medio de un análisis de varianza, evaluando los efectos de interacción. La realización del diseño involucró 11 observaciones experimentales por combinación de tratamientos aleatorios (Tabla 2). Al extender la notación anterior se interpretaron las cuatro combinaciones posibles: constante, enzima, *linker* y enzima-*linker*.

El fin del diseño factorial fue analizar las variables establecidas determinando su grado de significancia (valor-*P*) sobre la respuesta expresada en actividad enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$). Para determinar si los efectos son estadísticamente significativos el valor-*P* debe ser menor o igual a 0,05.

Tabla 2.- Orden del Diseño experimental factorial.

Nº de ensayo	[Novozyme 188]	[Linker]
1	-1	-1
2	0	0
3	1	1
4	-1	1
5	1	1
6	0	0
7	-1	1
8	1	-1
10	1	1
11	0	0

El orden de los datos del diseño se estableció mediante el uso del método de números aleatorios. Los valores son representativos y su interpretación es la siguiente: (-1) corresponde al valor mínimo, (1) corresponde al valor máximo, (0) es

el valor promedio entre -1 y 1. Se utilizó el mismo orden para los *linker* de Glutaraldehído y EDC.

La ecuación para el diseño se representa a continuación (ecuación 7) y relaciona las variables *linkers* y enzima, para dar como resultado actividad enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$).

$$\text{Actividad} = C + a_1 \cdot [\text{Novozyme 188}] + a_2 \cdot [\text{Linker}] + (a_3 \cdot [\text{Novozyme 188}] \cdot [\text{Linker}]) \quad (7)$$

Donde:

- C: constante dada por las unidades decodificadas obtenidas en cada diseño
- a_x : coeficientes obtenidos del diseño que representan a cada variable.
- Novozyme 188 ($\frac{\text{mg}}{\text{L}}$) y *Linker* (μM)

5.3.4.- Obtener los perfiles de temperatura y pH de la actividad de la enzima inmovilizada

A) Perfiles de Temperatura de la enzima inmovilizada

Se determinó la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada en las microesferas utilizando 1,9 g/L de celobiosa en buffer a pH 4,0 (ver protocolo 5.2.5 A), modificando las temperaturas de estabilidad y de reacción a: 20, 30, 40, 45, 50, 60, 65 y 70 °C. Posteriormente se graficó la glucosa liberada por cada temperatura en donde eje X es la temperatura y eje Y el porcentaje de glucosa obtenido.

B) Perfiles de pH de la enzima inmovilizada

Se determinó el efecto del pH en la enzima inmovilizada en las microesferas (ver protocolo 5.2.5 A), utilizando 1,9 g/L de celobiosa en buffer de acetato y fosfato a los siguientes pH: 2,0; 3,0; 3,6; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0, a 40 °C. Luego se graficó la glucosa liberada por cada pH utilizado en donde eje X es el pH y el eje Y porcentaje de glucosa obtenido.

5.3.5.- Establecer la estabilidad de la enzima inmovilizada

A) Cuantificar los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada

Luego de la inmovilización de la enzima en las microesferas, se realizaron ensayos para determinar la actividad obtenida en cada reutilización. La medición se llevó a cabo mediante la cuantificación de la actividad de la enzima inmovilizada en cada ciclo (ver procedimiento en punto 5.2.5 A).

Para cada ciclo a la enzima inmovilizada se le adicionó sustrato sucesivamente. Las microesferas se van separando de esta solución lavando con buffer pH 4,0, y se vuelven a suspender en otra solución de celobiosa fresca, proceso que se va repitiendo

En periodos donde no se pudo medir actividad, se almaceno la enzima a 4 °C en buffer pH 4,0. Estos ensayos fueron realizados tanto para EDC como para Glutaraldehído.

Para determinar la eficiencia de la inmovilización se requirió medir la actividad que produce la enzima libre por medio de la actividad específica y la cantidad de enzima utilizada, como se muestra en la ecuación 8.

$$\text{Actividad enzima libre} = AEE \cdot CE \quad (8)$$

Donde:

- AEE: Actividad específica de la enzima determinada anteriormente en $\frac{\mu\text{mol glucosa}}{\mu\text{g enzima} \cdot \text{min}}$
- CE: Cantidad de enzima utilizada (μg)

Esta medición de la actividad de la enzima libre es proporcional a la cantidad de enzima utilizada, por ende si aumenta la cantidad de enzima se aumenta la actividad.

Con este resultado se puede comparar la actividad de la enzima libre a cierta concentración con el de la enzima inmovilizada utilizando la misma cantidad de enzima con la enzima inmovilizada

Para la evaluación del rendimiento de la actividad en las reutilizaciones se midió mediante la ecuación 9.

$$\text{Rendimiento actividad enzima inmovilizada (\%)} = \frac{\sum AEI}{AEL} \cdot 100 \quad (9)$$

Donde:

- AEI: Actividad producida en las reutilizaciones de la enzima inmovilizada ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
- AEL: Actividad producida por la enzima libre la cual se determina mediante la actividad específica por la cantidad de enzima utilizada ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

B) Determinar la estabilidad en el tiempo de la enzima inmovilizada

Después de la inmovilización de la enzima en las microesferas se realizaron ensayos de almacenamiento para determinar la estabilidad en el tiempo. Para ello se midió la actividad enzimática del inmovilizado semanalmente, almacenando la enzima inmovilizada en las microesferas a 4 °C en buffer acetato a pH 4,0. Estos ensayos fueron realizados tanto para EDC como para Glutaraldehído.

Para determinar la significancia de las muestras semanales se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Además con un test de comparación de Bonferroni, se evaluó las diferencias significativas entre pares de columnas (datos de actividad enzimática de una semana a otra).

CAPÍTULO 6 – RESULTADOS

6.1.- Caracterización del preparado enzimático Novozyme 188

6.1.1.- Cuantificación de la proteína del preparado enzimático Novozyme 188

Al no contar con β -Glucosidasa pura se trabajó con el preparado enzimático Novozyme 188, cuya concentración de proteínas no estaba indicada por el proveedor, por lo tanto se le determinó la concentración de proteína total utilizando el método de Bradford mediante la curva de calibrado de proteínas BSA (punto 5.2.1 A), para ello se usaron los datos de absorbancia obtenidos y se ingresaron en la ecuación polinómica de la curva para cada medición, dividiendo por la dilución de la enzima para cada ensayo.

Los resultados obtenidos mediante ensayos realizados a distintas diluciones del preparado enzimático en buffer fosfato (pH 7,0) a 50 mM indicaron que la concentración de proteínas del preparado enzimático Novozyme 188 (Sigma Aldrich) fue de $35,0 \pm 0,9$ g/L, (ver tabla 19, Anexo 4).

6.1.2.- Actividad específica y cinética enzimática

Para entender la eficacia y las características de la reacción enzimática, se evaluó cómo la cinética está influenciada por la concentración de sustrato y de enzima.

Se realizaron ensayos para determinar la cantidad de enzima suficiente a reaccionar con el sustrato. Para ello fue necesario realizar varias diluciones del preparado enzimático Novozyme 188 en buffer acetato 50 mM (pH 4,0) con una concentración fija de sustrato de celobiosa de 1,9 g/L, en un tiempo de reacción de 10 minutos. Este tiempo de reacción fue establecido para la hidrólisis puesto que hasta este periodo se mantiene una correlación lineal de la glucosa liberada (ver

Anexo 5). Los datos obtenidos de absorbancia para cada ensayo se introdujeron en la ecuación de la recta de la curva de calibrado de glucosa para la enzima libre (Anexo 3, Figura 45), de esta forma se determinó la glucosa liberada en g/L la cual se transformó en μmol al dividirlo por su masa molar y multiplicarlo por el volumen de la muestra.

La Figura 20 muestra el gráfico de la cantidad de glucosa liberada en μmol versus la cantidad de Novozyme 188 utilizado en μg . Los resultados indicaron que utilizando una cantidad de enzima de $10,6 \mu\text{g}$ aproximadamente ($0,00061 \text{ mL}_{\text{enzima}} / \text{mL}_{\text{Buffer Acetato pH 4,0}}$) con $1,9 \text{ g/L}$ de celobiosa, la reacción todavía no alcanzaba la etapa estacionaria (momento donde el sustrato se torna limitante para la hidrólisis con la enzima), por lo tanto con este valor se podrían medir de mejor forma los puntos de la cinética (Anexo 7, Tabla 20).

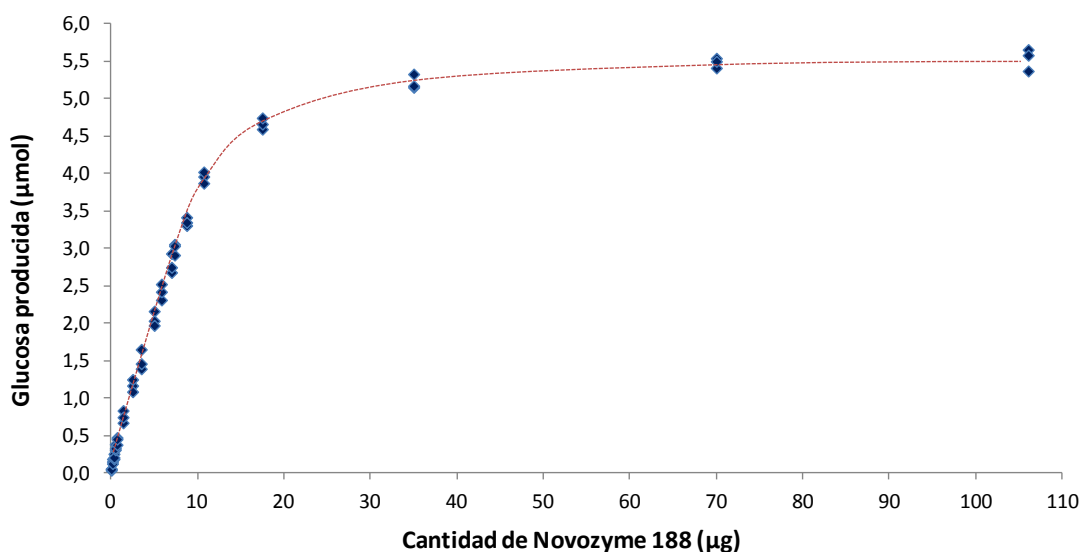


Figura 20.- Curva que indica la cantidad de glucosa producida al hacer reaccionar distintas cantidades de enzima con $1,9 \text{ g/L}$ de celobiosa, bajo un tiempo de reacción de 10 minutos.

Con los datos del comienzo de la curva de la Figura 20, se confeccionó el gráfico de la Figura 21, en donde a los puntos seleccionados se le aplicó una regresión lineal, la cual entregó una ecuación de la recta con la que, por medio de su pendiente y dividiendo ésta por el tiempo de reacción de 10 minutos, se obtuvo la

actividad específica de la enzima, la que fue de $0,03896 \mu\text{mol}_{\text{glucosa}}/\mu\text{g}_{\text{Novozyme 188}}/\text{minuto}$ ($38,96 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$).

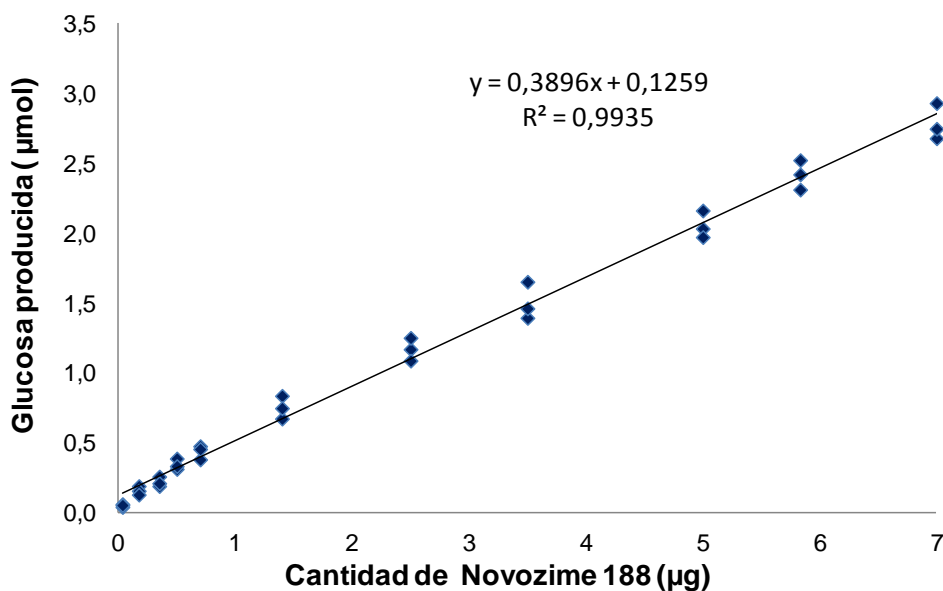


Figura 21.- Regresión lineal de la curva que indica la cantidad de glucosa producida al hacer reaccionar distintas cantidades de enzima con 1,9 g/L de celobiosa

Para detener la liberación de glucosa en todos los ensayos relacionados con actividad se utilizó el método de cambio brusco de pH, de modo tal de inactivar la enzima. Se utilizó una proporción de 1:1 entre NaOH y la reacción. Los resultados arrojaron que la liberación de glucosa no cambia a partir de la concentración de 1M de NaOH, por lo tanto este valor fue elegido para la realización de todos los ensayos que involucraron medición de actividad (ver gráfico en Anexo 6).

Para determinar la cinética de la enzima se hidrolizaron distintas concentraciones de sustrato de celobiosa con una cantidad fija de enzima determinada anteriormente de $10,6 \mu\text{g}$, con tiempos de reacción que van desde los 0 hasta los 20 minutos.

Las cantidades de celobiosa a utilizar fueron determinadas a través de la relación estequiométrica de que con 1 molécula de celobiosa de PM $342,3 \text{ g/mol}$ se forman 2 moléculas de glucosa de PM 180 g/mol , en donde se estableció que para obtener una concentración de glucosa entre los $0,2 \text{ g/L}$ y $4,0 \text{ g/L}$, se necesitaban concentraciones de $0,19 \text{ g/L}$ a $3,8 \text{ g/L}$ de celobiosa respectivamente, por lo tanto

para los ensayos se realizaron diluciones del sustrato de 0,19 g/L, 0,38 g/L, 0,76 g/L, 1,0 g/L, 1,52 g/L, 1,9 g/L, 3,0 g/L y 3,8 g/L en buffer acetato pH 4,0, 50 mM. Para la determinación de los parámetros cinéticos estas concentraciones se transformaron en mM al dividir las por su masa molar y multiplicándolas por 1000.

En la Figura 22 se muestra una comparación de cada uno de los niveles de sustrato utilizado mediante la concentración de glucosa liberada versus el tiempo de reacción (ver gráficos individuales Anexo 8).

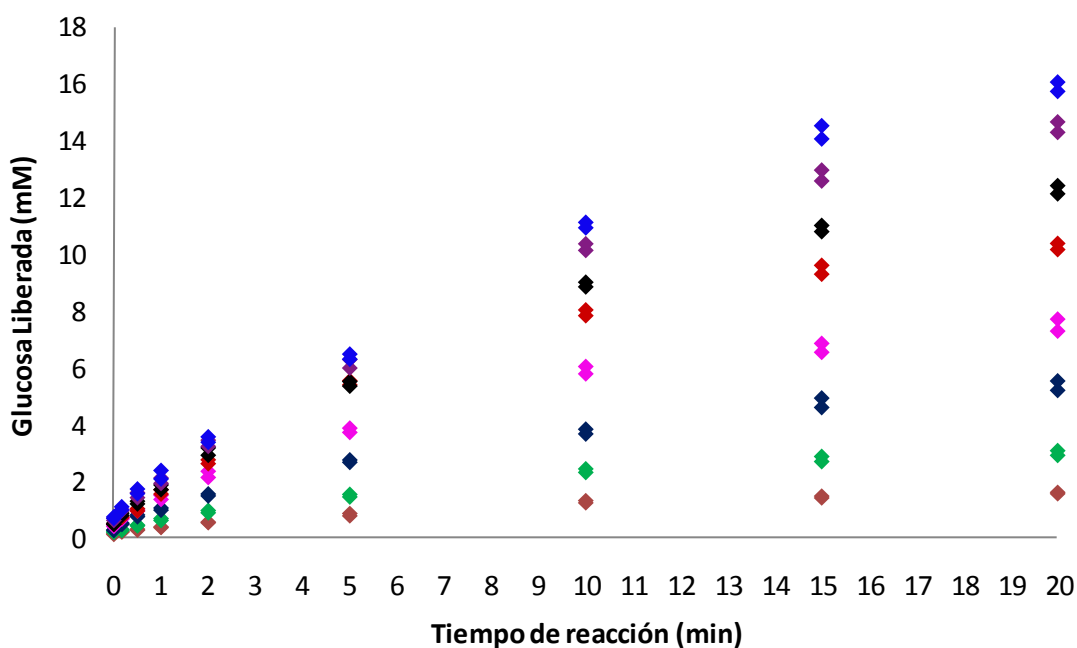


Figura 22.- Glucosa liberada en función del tiempo al hacer reaccionar una cantidad fija enzima de 10,6µg para distintas concentraciones de sustrato de celobiosa de: ◆0,19 g/L; ◆ 0,38 g/L; ◆0,76 g/L; ◆1,0 g/L; ◆1,52 g/L; ◆1,9 g/L; ◆3,0 g/L y ◆3,8 g/L.

Los resultados obtenidos indicaron que la liberación de glucosa fue aumentando linealmente hasta llegar a una etapa estacionaria en donde la producción de glucosa se mantiene constante con el tiempo.

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima, K_M (constante de afinidad de la enzima con el sustrato) y V_{max} (velocidad máxima de reacción), se midió la velocidad inicial de la glucosa producida en el tiempo para los diferentes niveles de concentraciones de sustrato representados en la Figura 22, mediante

correlación lineal en periodos que tienden al inicio, debido a que a medida que avanza la reacción en el tiempo la velocidad va disminuyendo por la transformación del sustrato en producto, pues el sustrato se va agotando.

La Figura 23 muestra la cinética enzimática representada por la velocidad inicial para los diferentes niveles de sustrato utilizado, la cual se obtuvo experimentalmente mediante el cálculo de la derivada del producto obtenido en el tiempo y se comparó con la velocidad del modelo de Michaelis-Menten.

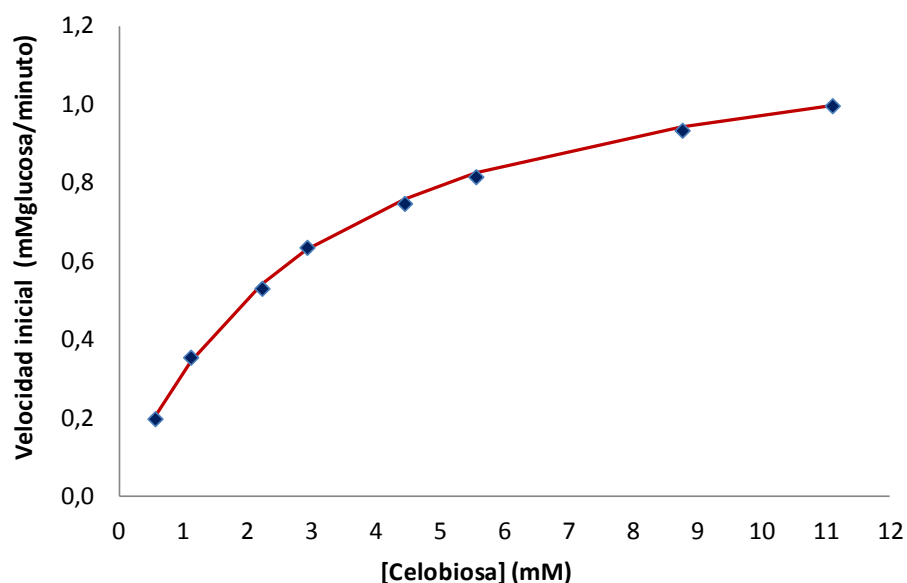


Figura 23.- Cinética experimental de la β -Glucosidasa, ajustada al modelo Michaelis- Menten. Donde: \blacklozenge Datos obtenidos experimentalmente, —Modelo de Michaelis-Menten de parámetros cinéticos.

La velocidad inicial experimental se representó en $\text{mM}_{\text{glucosa}}/\text{minuto}$ para las distintas concentraciones de sustrato utilizada. Los datos obtenidos experimentalmente se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,9991. La V_{max} y el K_{M} se determinaron por medio de la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando la representación de la inversa mediante Lineweaver-Burk, con esta linealización se determinó la V_{max} y la K_{M} (ver Anexo 9, constantes cinéticas). Por lo tanto la V_{max} alcanzada fue de 1,26 mM/min y el K_{M} de 2,94 mM .

6.1.3.- Perfil de temperatura de la actividad de la enzima

Se determinaron los perfiles de actividad a diferentes temperaturas para la hidrólisis enzimática de la celobiosa a glucosa, mediante el protocolo general para la medición de actividad (punto 5.2.3) y se graficó el porcentaje de actividad relativa obtenido a las diferentes temperaturas dando los resultados de la Figura 24.

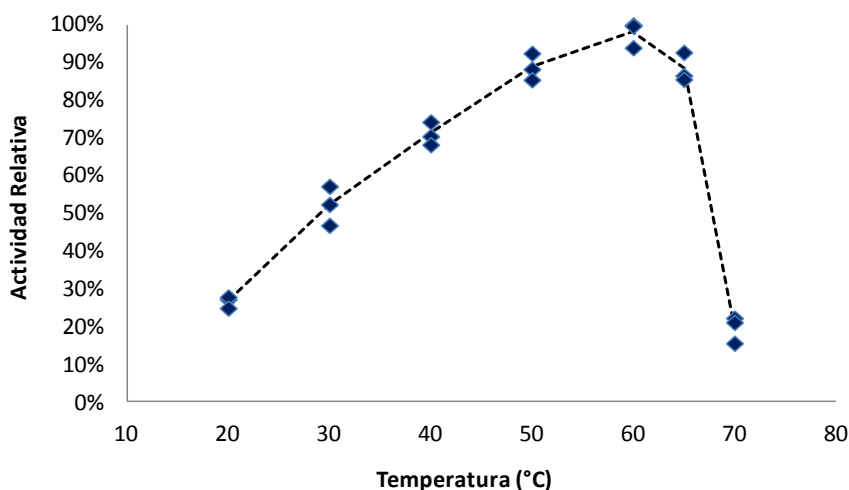


Figura 24.- Perfil de actividad de la enzima a diferentes temperaturas.

Los resultados indicaron que la actividad va aumentando linealmente a medida que aumenta la temperatura, alcanzando un óptimo a los 60 °C, y después de los 65 °C cae abruptamente. Sin embargo se definió que la temperatura de trabajo para los ensayos de actividad de la enzima libre sería de 40 °C, debido a que a esta temperatura mantiene la actividad por más tiempo y es una buena opción para lograr que la enzima se mantenga más estable.

6.1.4.- Perfil de pH de la actividad de la enzima

Se determinaron los perfiles de actividad a diferentes pH para la hidrólisis enzimática, mediante el protocolo general para la medición de actividad enzimática (punto 5.2.3). Se graficó la actividad producida por la enzima libre en porcentaje de actividad a diferentes pH dando los resultados de la Figura 25.

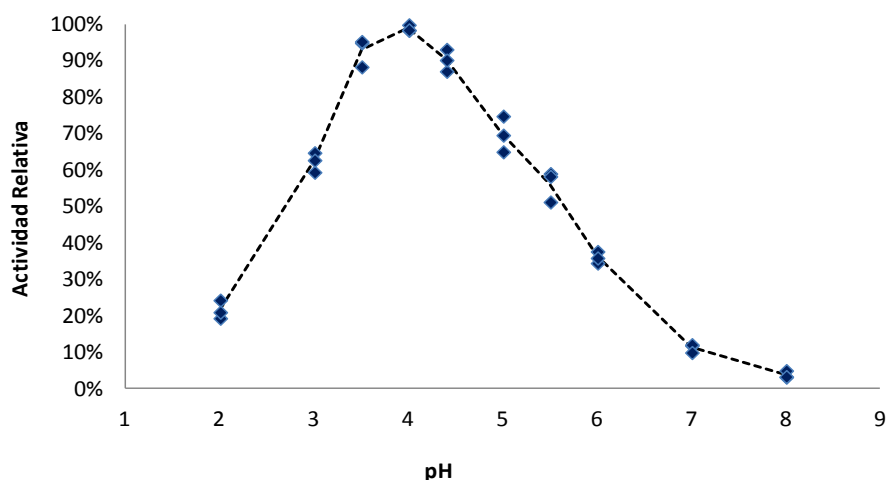


Figura 25.- Perfil de actividad de la enzima a diferentes pH.

Se observó que el pH óptimo para la actividad de la enzima libre es a pH 4,0, ya que es en donde se encuentra la mayor actividad.

6.2.- Parámetros para la inmovilización enzimática

Determinación de la cantidad de microesferas y proteína para la inmovilización

Para la inmovilización se utilizaron microesferas de quitosano fierro elaboradas por Silva (2010) y optimizadas por Aguayo (2011). Se estableció trabajar con un volumen de microesferas de 250 μL medidas volumétricamente en tubos de eppendorf milimetrados (1,5 mL). Este volumen fue escogido, ya que físicamente no se disponía de material de laboratorio para tomar menores volúmenes y utilizar un volumen mayor significaba un gasto innecesario de material.

Las dimensiones de la β -Glucosidasa proveniente de la especie *Aspergillus niger*, fueron determinadas por medio de mediciones manuales efectuadas en Protein Data Bank, utilizando la estructura cristalina de la enzima β -Glucosidasa proveniente del hongo *Trichoderma reesei* (3AHY) del complejo Tris (Jeng *et al.*, 2010), por lo tanto su peso molecular establecido fue de 118 kDa (118 kg/mol) con un diámetro de 50 Å y un área de $2,5 \times 10^{-11} \text{mm}^2$.

Se realizaron los cálculos necesarios para medir la cantidad de enzima a inmovilizar en los 250 μL de microesferas, dato calculado entre el volumen total y el volumen de una microesfera (Anexo 10A) dando los siguientes resultados:

La cantidad de microesferas en 250 μL fue de aproximadamente 1351 unidades, dato calculado asumiendo que todas las microesferas miden 0,707 mm y son perfectamente esféricas (Silva, 2010), por lo tanto el área total calculada de este volumen fue de 2121 mm^2 .

También se requirió cuantificar el número de proteínas necesarias para la inmovilización, el que fue calculado teniendo en conocimiento el área total de las microesferas (2121 mm^2) y el área de una proteína ($2,5 \times 10^{-11} \text{mm}^2$), por lo tanto el número de proteínas requeridas para cubrir la superficie de las microesferas fue de $8,49 \times 10^{12}$ unidades de proteínas aproximadamente, lo que en cantidad se traduce a $1,41 \times 10^{-10}$ moles, con este valor y la masa molar de la β -Glucosidasa (118 kg/mol) se pudo obtener la masa de las proteínas la cual fue de $1,66 \times 10^{-2}$ mg (ver cálculo Anexo 10B).

Se estableció una concentración de $1,41 \times 10^{-10}$ moles de proteína para cubrir un total de 250 μL de microesferas en un volumen de reacción de 2,0 mL. Sin embargo esta cantidad resulto no ser suficiente para recubrir la totalidad de la superficie de las microesferas, por este motivo se aumentó 5 veces dando como resultado $7,05 \times 10^{-10}$ moles de proteínas (ver cálculo Anexo 10C) para garantizar el recubrimiento completo de todas las microesferas. A partir de esta cantidad se determinó la cantidad de *linker* (Glutaraldehído y EDC) a utilizar en la inmovilización aumentando desde este valor hasta tantas veces como fuere necesario para estimar el rango a utilizar en la inmovilización para realizar el diseño experimental.

Los $7,05 \times 10^{-10}$ moles de proteína tienen una masa de 0,083 mg la cual se diluyo en 2,0 mL de reacción obteniendo una concentración 41,6 mg/L a utilizar en los ensayos como valor central para el diseño experimental (ver calculo Anexo 10D).

6.3.- Inmovilización enzimática

Todos los ensayos de inmovilización se realizaron por medio del protocolo 5.2.5. A. La determinación de actividad se calculó con la pendiente entre 10 y 30 minutos, ya que bajo los 5 minutos hubo una subida abrupta de pendiente que no permitió una medición correcta de actividad y sobre 10 minutos, la actividad mantiene una correlación lineal entre la cantidad de glucosa producida y el tiempo (Anexo 11).

A partir de la cantidad de proteína necesaria para cubrir toda la superficie de las microesferas, se determinó la cantidad de *linker* a utilizar en la inmovilización, cálculos que se detallan en el Anexo 10E. Además, puesto que en la producción de las microesferas de quitosano se utilizó Glutaraldehído, en la primera etapa de la inmovilización se realizó un pretratamiento de inactivación de éste, por medio de la mezcla de las microesferas con una solución de un aminoácido (ácido glutámico 50 mM a pH 10 a temperatura ambiente por una hora).

6.3.1.- Proteína adsorbida por las microesferas

La proteína adsorbida por los 250 μ L de microesferas se determinó mediante la diferencia entre la concentración de proteína inicial libre y la proteína que quedó en el sobrenadante durante la inmovilización, por método espectrofotométrico a 280 nm y el método de Bradford. Las mediciones se realizaron comparando la utilización de ambos *linker*, con y sin el pretratamiento del aminoácido. Los resultados se muestran en porcentaje de proteína adsorbida por las microesferas (ver cálculos Anexo 12) que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.- Comparación de la proteína adsorbida mediante métodos Bradford, Espectrofotométrico y, con y sin pretratamiento de ácido glutámico.

<i>Linker</i>	% Proteína promedio adsorbida Método Bradford		% Proteína promedio adsorbida Método Espectrofotométrico	
	c/pretratamiento	s/pretratamiento	c/pretratamiento	s/pretratamiento
Glutaraldehído	38,6	32,2	35,2	25,2
EDC - NHS	23,6	20,4	-	-

6.3.2.- Actividad resultante después de la inmovilización enzimática

Se realizó la medición de la actividad enzimática por medio del líquido sobrenadante obtenido tras la inmovilización al cual se ajustó su pH de 7,0 a 4,0, pero los resultados fueron incongruentes debido a que la actividad que quedo en el sobrenadante en algunos casos resulto ser mayor la de la enzima libre.

Por lo tanto la actividad se determinó mediante la enzima inmovilizada que quedo en las microesferas adicionando 2,0 mL de celobiosa de 1,9 g/L en buffer a pH 4,0. La Tabla 4 muestra el porcentaje de actividad enzimática que se adhirió las microesferas después de ser inmovilizada.

Tabla 4.- Actividad de la enzima inmovilizada en las microesferas sin y con pretratamiento de ácido glutámico.

Actividad enzima libre ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Sin pretratamiento		Con pretratamiento	
	Actividad enzima inmovilizada ($\mu\text{M}/\text{min}$)	% Actividad enzima inmovilizada	Actividad enzima inmovilizada ($\mu\text{M}/\text{min}$)	% Actividad enzima inmovilizada
306	8,38	2,74	10,6	3,45
395	7,26	1,84	11,4	2,88
277	8,33	3,01	10,4	3,76
451	9,80	2,17	14,2	3,16

Para evaluar la significancia entre las muestras con pretratamiento y sin pretratamiento se realizó un análisis estadístico *t-Student* (ver Anexo 13) cuyos resultados se muestran a continuación.

Prueba t para dos muestras

- Promedio $X_1 = 2,44\%$ Promedio $X_2 = 3,31\%$
- Varianza $_1 = 0,282$ Varianza $_2 = 0,143$

Donde:

- X_1 es el promedio de la actividad de la enzima inmovilizada sin el pretratamiento
- X_2 es el promedio de la actividad de la enzima inmovilizada con el pretratamiento.

Se realizó un análisis de significancia, *t-Student* con un nivel de confianza de 95% (ver Anexo 13).

- **Valor-P:** 0,018

Según los resultados obtenidos, el $t_{calculado}$ fue de -2,67 que es inferior al t_{α} (de tabla) de -1,94, lo que indicó que se acepta con pretratamiento y se rechaza la sin pretratamiento. Conjuntamente el valor-*P* resulto ser menor que 0,05 lo que indica que existió un aumento significativo de la actividad de la muestra con pretratamiento en relación a la sin pretratamiento. Además se determinó que la varianza se reduce hasta la mitad con el pretratamiento, por lo tanto los resultados son mucho más estables y existe menor dispersión de los valores.

6.4.- Efecto del *linker* en la inmovilización enzimática

Se estudió el efecto de la adición de los *linker* Glutaraldehído y EDC-NHS en la actividad de la enzima inmovilizada. Este estudio se realizó utilizando una concentración fija de β -Glucosidasa de 41,6 mg/L equivalente a 7×10^{10} moles, con diferentes cantidades de *linker* los cuales se especifican en la Tabla 5, (ver cálculos Anexo 10E). Estos ensayos se realizaron para de determinar cuál fue la cantidad óptima a utilizar de *linker* en donde se generó mayor actividad.

Tabla 5.- Concentración de *linker* a utilizar (μ M) en la inmovilización, aumentando a razón de 1:1 hasta 1:20 con respecto a la enzima.

Proteína: <i>linker</i>	<i>Linker</i> EDC o Glutaraldehído (μ M)
1:1	0,35
2:5	0,88
1:4	1,41
2:11	1,94
1:6	2,11
1:7	2,47
1:8	2,82
2:17	2,99
1:10	3,52
1:20	7,05

6.4.1.- Estudio del efecto de la cantidad de EDC

El ensayo se realizó de acuerdo al procedimiento de inmovilización enzimática. La concentración de proteína utilizada en el ensayo fue de 41,6 mg/L a distintas concentraciones de *linker* EDC-NHS en μM en tampón acetato pH 4,0 a 21°C. La Figura 26 muestra la actividad de la enzima inmovilizada en diferentes cantidades de EDC-NHS (2:5).

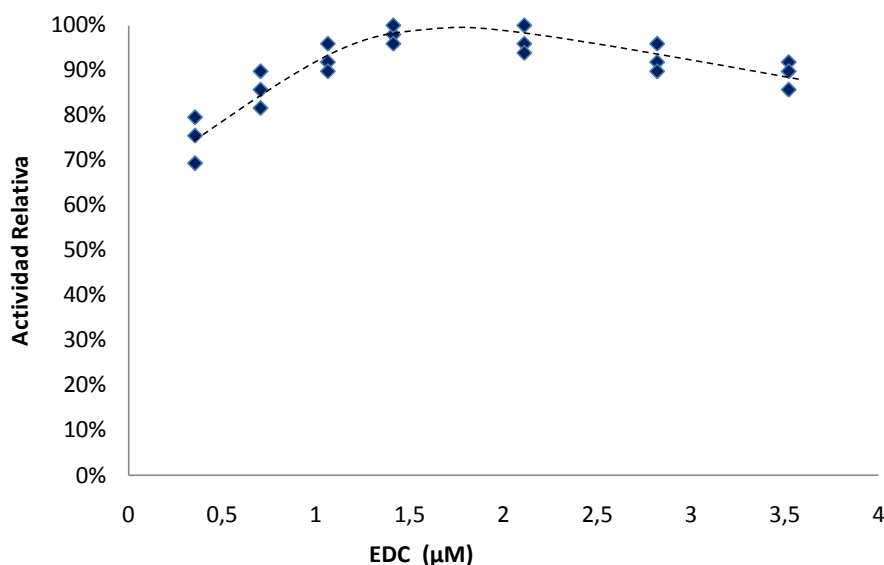


Figura 26.- Efecto de la concentración del *linker* EDC-NHS en la Actividad de la enzima inmovilizada.

De las concentraciones observadas se determinó que desde 0,35 μM hasta 1,41 μM fue aumentando su actividad, y sobre estos valores fue disminuyendo de a poco.

6.4.2.- Estudio del efecto de la cantidad de Glutaraldehído

El ensayo se realizó de acuerdo al procedimiento de inmovilización enzimática. La concentración de proteína utilizada en el ensayo fue de 41,6 mg/L a distintas concentraciones de *linker* Glutaraldehído en μM . La Figura 27 muestra la actividad de la enzima inmovilizada en diferentes cantidades de Glutaraldehído (0,35 a 7,02 μM).

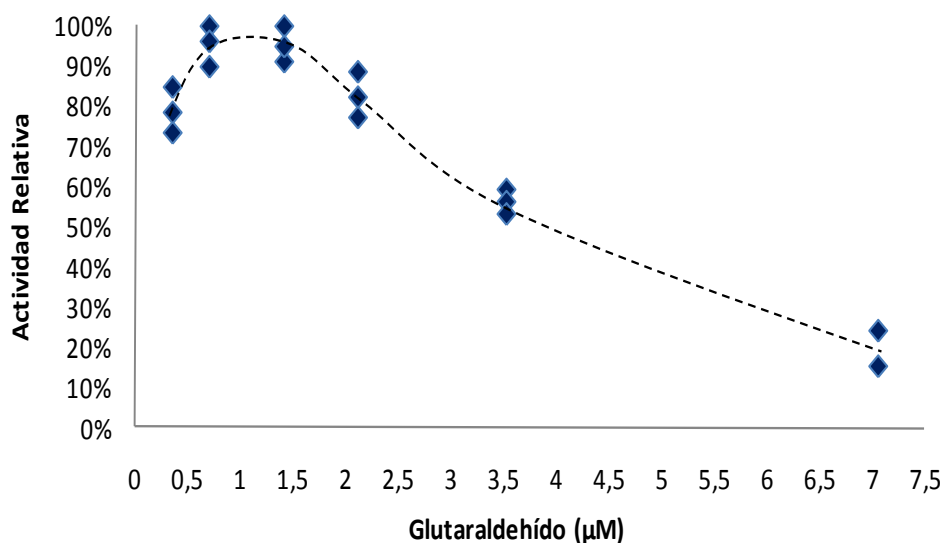


Figura 27.- Efecto de la concentración del *linker* Glutaraldehído en la Actividad de la enzima inmovilizada.

De los datos observados se determinó que desde 0,35 µM hasta 1,41 µM fue aumentando la actividad, y sobre estos valores va disminuyendo.

6.5.- Diseño factorial 2² para la inmovilización enzimática

La Tabla 6 muestra mediante el orden aleatorio, los datos de la concentración de enzima y *linker* (Glutaraldehído y EDC) utilizados en la inmovilización para la realización del diseño factorial el cual evaluó el efecto y su interacción.

Tabla 6.- Orden del diseño factorial para EDC y Glutaraldehído.

Orden aleatorio (Novozyme 188 – Linker)	Novozyme 188 (mg/L)	Linker (µM)
-1, -1	20,8	0,35
0, 0	41,6	0,88
1, 1	62,4	1,41
-1, 1	20,8	1,41
1, 1	62,4	1,41
0, 0	41,6	0,88
-1, 1	20,8	1,41
1, -1	62,4	0,35
-1, -1	20,6	0,35
1, 1	62,4	0,35
0, 0	41,6	0,88

Se realizaron ensayos de actividad con *linker* EDC y Glutaraldehído, de los cuales se determinó la actividad para ambos agentes enlazantes. Luego de obtener las actividades, que constituyen la respuesta del modelo, se analizó cada diseño factorial 2^2 y los resultados se detallan a continuación.

6.5.1.- Diseño factorial utilizando EDC – NHS

Los datos de la Tabla 7 muestran las actividades enzimáticas resultantes del diseño factorial utilizando EDC en interacción con NHS y Novozyme 188.

Tabla 7.- Datos del diseño factorial con EDC-NHS.

Concentraciones de los reactivos			Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Novozyme 188 (mg/L)	EDC (μM)	NHS (μM)	
20,8	0,35	0,88	9,58
41,6	0,88	2,20	18,5
62,4	1,41	3,52	29,9
20,8	1,41	3,52	15,6
62,4	1,41	3,52	30,1
41,6	0,88	2,20	22,8
20,8	1,41	3,52	5,38
62,4	0,35	0,88	13,8
20,8	0,35	0,88	4,37
62,4	0,35	0,88	17,8
41,6	0,88	2,20	15,1
41,6	0,88	2,20	15,1

En la Tabla 8 se muestra el análisis estadístico de las actividades obtenidas en el diseño experimental, de allí se desprende que el valor-*P*, para Novozyme 188 y EDC, es menor a 0,05 lo que significa que ambas variables son estadísticamente significativas, mientras que la interacción de las dos variables presentadas [Novozyme 188 (mg/L)•EDC (μM)] no es significativa.

Tabla 8.- Efectos y Coeficientes estimados para Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) con *linker* EDC con datos en unidades codificadas.

Parámetros	Efecto	Coef.	Coef. de EE	T	Valor-P
Constante		16,682	1,258	13,27	0,000
Novozyme 188 (mg/L)	14,250	7,125	1,475	4,83	0,002
EDC (μM)	8,750	4,375	1,475	2,97	0,021
Novozyme 188 (mg/L)• EDC (μM)	5,250	2,625	1,475	1,78	0,118
S = 4,17067 PRESS = 321,130			R-cuad.= 83,46% R-cuad. (pred) = 56,38% R-cuad. (ajustado) = 76,37%		

El análisis factorial también arroja los valores de los coeficientes estimados para la respuesta, utilizando datos de unidades decodificadas (datos con las unidades de medición originales de los factores experimentales), los que se presentan en la Tabla 9. Estos se utilizaron para elaborar una ecuación modelo del diseño factorial para el EDC, que representa la relación entre la respuesta y los factores.

Tabla 9.- Coeficientes estimados para Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) utilizando *linker* EDC con datos en unidades decodificadas.

Términos	Coef.
Constante	3,88465
Novozyme 188 (mg/L)	0,133005
EDC (μM)	-1,65094
Novozyme 188 (mg/L)•EDC (μM)	0,238117

$$\text{Actividad}\left(\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}\right) = 3,88 + (0,13[\text{Enzima}]) - (1,7 [\text{EDC}]) + (0,24[\text{Enzima}][\text{EDC}])$$

En la Figura 28 y Figura 29 se pueden visualizar tanto la superficie de respuesta como el gráfico de contorno de la actividad enzimática, en base a la ecuación establecida anteriormente. En ambas figuras se muestra una respuesta relacionada con dos variables fijas (Novozyme 188 y EDC), en donde se observa que mientras mayor es la cantidad de EDC y Novozyme 188, mayor es la actividad enzimática. Para visualizar de mejor forma los puntos del diseño y gráficas de residuos ver el Anexo 14A.

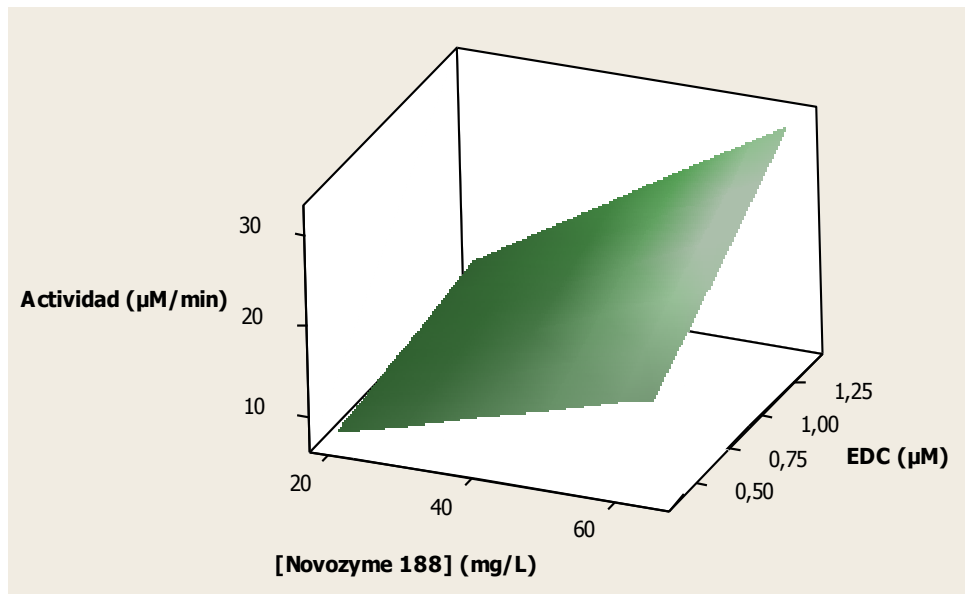


Figura 28.- Representación gráfica de la superficie de respuesta de Actividad de la enzima inmovilizada con *linker* EDC.

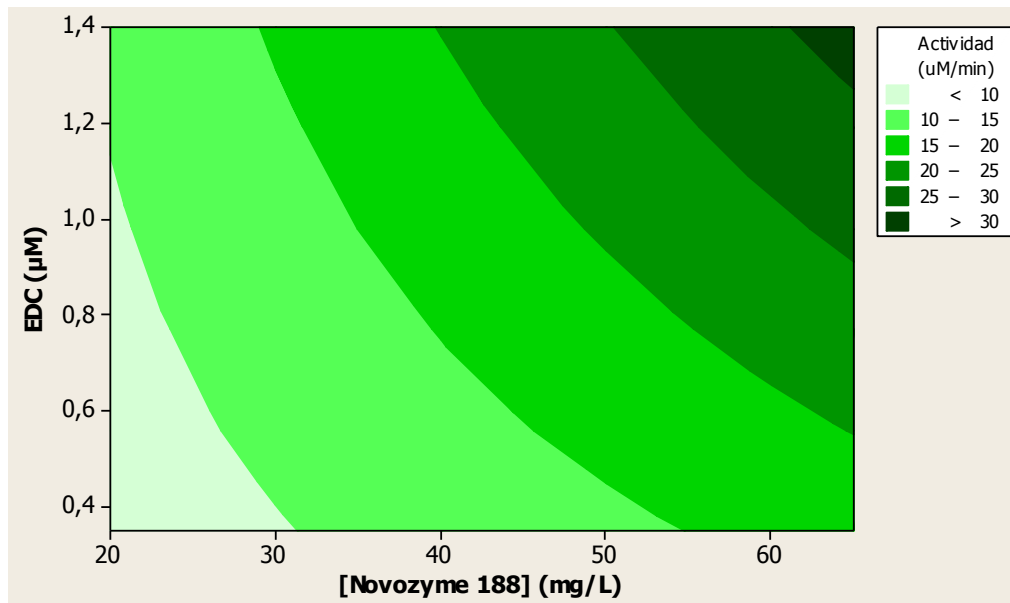


Figura 29.- Representación gráfica del contorno de Actividad de la enzima inmovilizada con *linker* EDC.

Según los resultados obtenidos, la mayor actividad del diseño se produjo con aproximadamente 62,4 mg/L de proteína, con 1,41 μM de EDC y 3,52 μM de NHS y fue de 30,1 $\mu\text{M}/\text{min}$.

Para determinar si ese valor de respuesta era el máximo, se realizó una ampliación del diseño aumentando la concentración de proteína y *linker*. Todos estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 30.

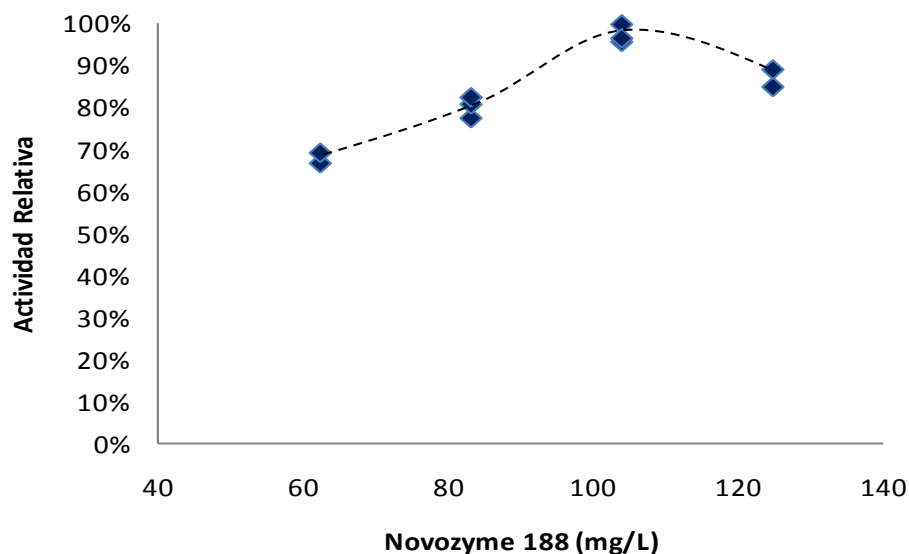


Figura 30.- Prolongación del diseño experimental con EDC; aumentando la concentración de enzima y *linker* en la inmovilización.

Por medio de este gráfico se puede observar que a medida que se aumenta la concentración de enzima en las microesferas también aumenta la actividad enzimática, pero solo hasta la concentración de 103,9 mg/L de Novozyme 188, 2,47 μM de EDC y 6,17 μM de NHS, en donde generó su actividad máxima de 39,6 $\mu\text{M}/\text{min}$. Sobre estas concentraciones la actividad decayó.

6.5.2.- Diseño factorial utilizando Glutaraldehído

Los datos presentados en la Tabla 10 muestran las actividades enzimáticas resultantes del diseño factorial utilizando *linker* Glutaraldehído y Novozyme 188 a distintas concentraciones determinadas previamente.

Tabla 10.- Datos del diseño factorial con Glutaraldehído.

Concentraciones de los reactivos		Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Novozyme 188 (mg/L)	Glutaraldehído (μM)	
20,8	0,35	42,4
41,6	0,88	43,7
62,4	1,41	67,2
20,8	1,41	40,7
62,4	1,41	67,9
41,6	0,88	39,3
20,8	1,41	29,6
62,4	0,35	39,7
20,6	0,35	22,2
62,4	0,35	40,7
41,6	0,88	39,7

En la Tabla 11 se muestra el análisis estadístico de las actividades obtenidas en el diseño experimental, de allí se desprende que el valor- P , para Novozyme 188 y Glutaraldehído, es menor a 0,05 lo que significa que ambas variables son estadísticamente significativas.

En cuanto a la interacción de las dos variables [Novozyme 188 (mg/L)•Glutaraldehído (μM)], el valor- P también muestra que es un parámetro significativo estadísticamente, pero en menor grado que ambos factores por separado.

Tabla 11.- Efectos y Coeficientes estimados de Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) con *linker* Glutaraldehído (unidades codificadas).

Parámetros	Efecto	Coef.	Coef. de EE	T	Valor-P
Constante		42,973	1,962	21,91	0,000
Novozyme 188 (mg/L)	20,163	10,081	2,300	4,38	0,003
Glutaraldehído (μM)	15,113	7,556	2,300	3,28	0,013
Novozyme 188 (mg/L)• Glutaraldehído (μM)	12,262	6,131	2,300	2,67	0,032
S = 6,50611 PRESS = 981,222			R-cuad.= 84,13% R-cuad. (pred) = 47,44% R-cuad. (ajustado) = 77,33%		

El análisis factorial también arroja los valores de los coeficientes estimados para la respuesta, utilizando datos de unidades descodificadas (datos con las unidades de medición originales de los factores experimentales), los que se presentan en la Tabla 12 y se utilizaron para elaborar una ecuación modelo del diseño factorial para Glutaraldehído (GA), que representa la relación entre la respuesta y los factores.

Tabla 12.- Coeficientes estimados para Actividad ($\mu\text{M}/\text{min}$) utilizando *linker* Glutaraldehído con datos en unidades descodificadas.

Términos	Coef.
Constante	30,6
Novozyme 188 (mg/L)	-8,9
Glutaraldehído (μM)	-0,00483
Novozyme 188 (mg/L)• Glutaraldehído(μM)	0,564

$$\text{Actividad} \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{min}} \right) = 30,6 - (8,9 [\text{Enzima}]) - (0,00483 [\text{GA}]) + (0,564 [\text{Enzima}][\text{GA}])$$

En la Figura 31 y Figura 32 se pueden visualizar tanto la superficie de respuesta como el gráfico de contorno de la actividad enzimática, en base a la ecuación establecida anteriormente. En ambas figuras se muestra una respuesta relacionada con dos variables fijas (Novozyme 188 y Glutaraldehído), en donde se observa que mientras mayor es la cantidad de *linker* y Novozyme 188, mayor es la

actividad enzimática. Para visualizar de mejor forma los puntos del diseño y graficas de residuos ir a Anexo 14B.

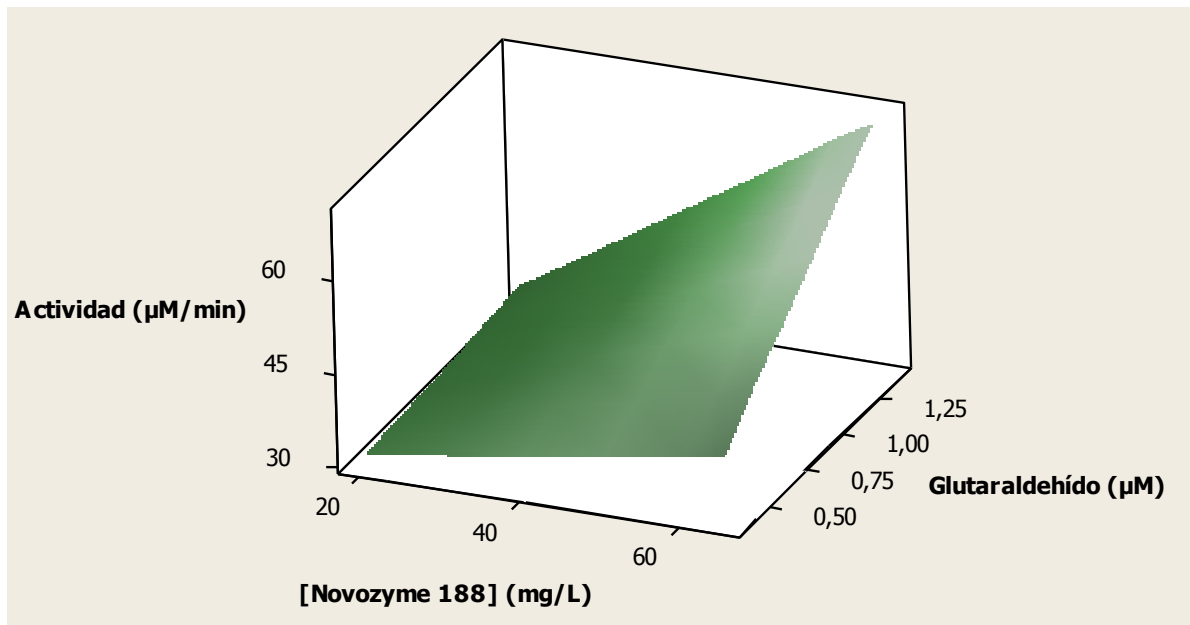


Figura 31.- Representación gráfica de la de superficie de respuesta de Actividad enzimática con *linker* Glutaraldehído.

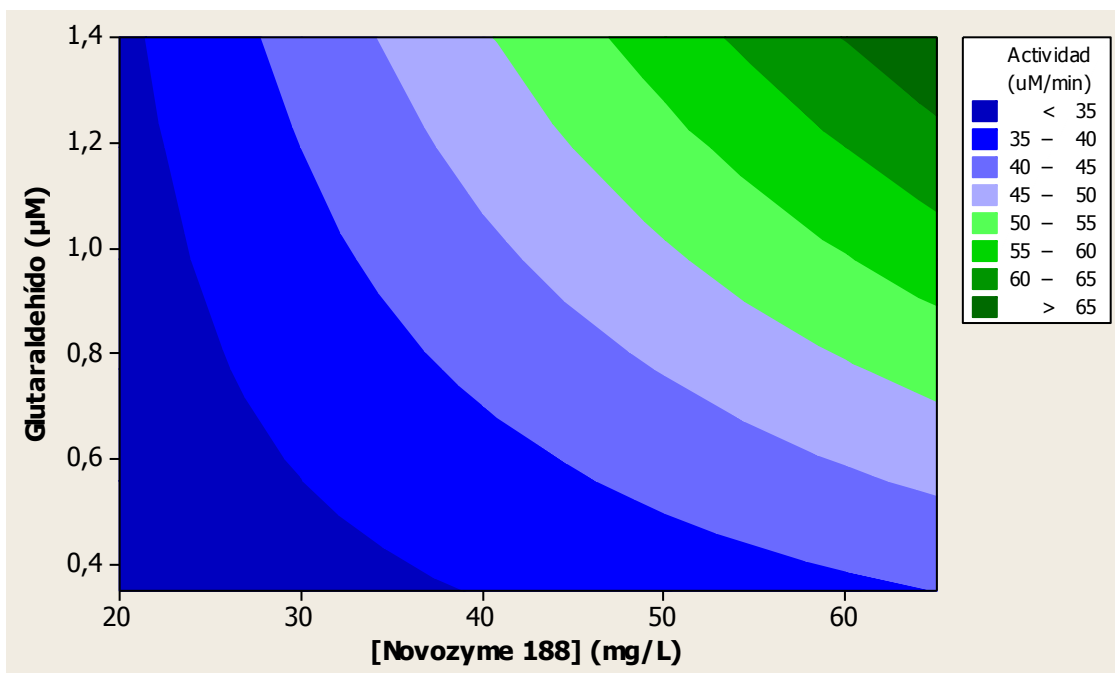


Figura 32.- Representación gráfica del contorno de Actividad con *linker* Glutaraldehído.

Según los resultados obtenidos, la mayor actividad se registró con 62,4 mg/L de Novozyme 188 y 1,41 μM de Glutaraldehído y fue de un promedio de 67,5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Con el fin de terminar si a mayores concentraciones se producía mayor actividad, se realizó una prolongación del diseño con Glutaraldehído, la que se presenta gráficamente en la Figura 33.

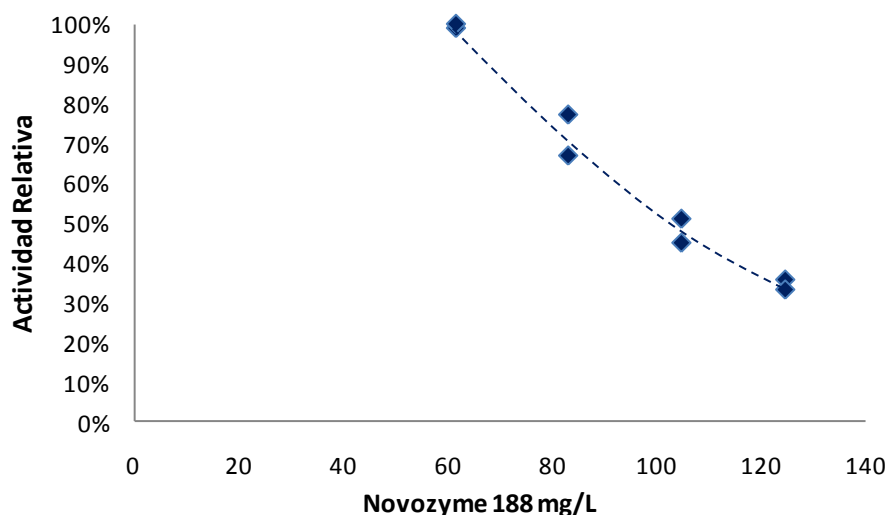


Figura 33.- Prolongación de Glutaraldehído; aumentando la concentración de enzima y *linker* en la inmovilización.

La gráfica muestra que a concentraciones superiores a 62,4 mg/L y 1,41 $\mu\text{M}/\text{min}$ respectivamente de enzima y *linker*, la actividad fue disminuyendo hasta perderse casi totalmente.

6.6.- Perfiles de Temperatura y pH para la actividad de la enzima inmovilizada

6.6.1.- Perfil de Temperatura

Se determinaron los perfiles de temperatura para la enzima inmovilizada, mediante ensayos realizados a distintas temperaturas, cuyos resultados se muestran en la Figura 34. Se estableció trabajar a una temperatura de 40 °C, puesto a que con esta temperatura la enzima no se desnaturaliza tan rápidamente.

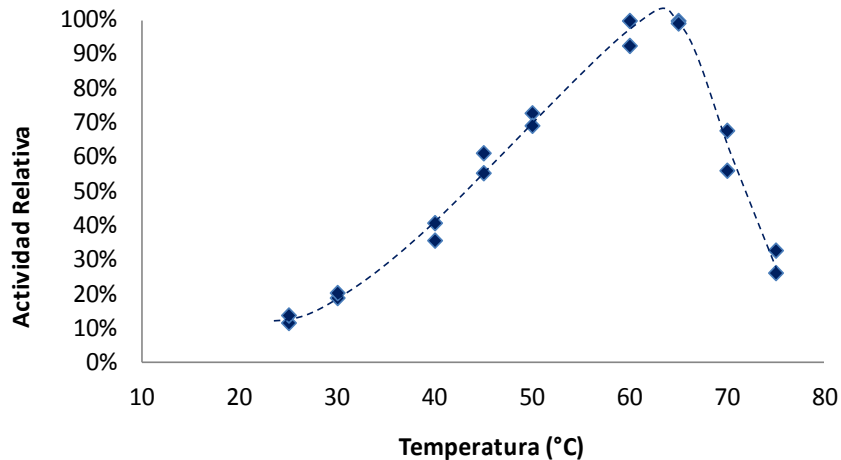


Figura 34.- Porcentaje de actividad enzimática de la enzima inmovilizada a diferentes temperaturas con un tiempo de contacto de 10 min. entre la enzima y el sustrato.

La Figura 35 muestra una comparación entre la actividad enzimática de la enzima libre e inmovilizada a distintas temperaturas. Se observa un desplazamiento hacia temperaturas más altas, en el perfil de la enzima inmovilizada, con respecto a la libre.

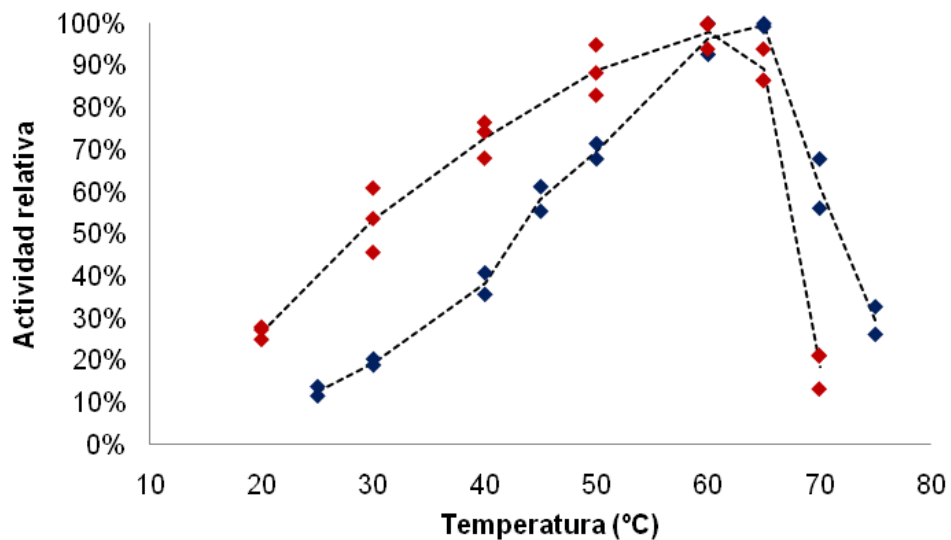


Figura 35.- Comparación de los perfiles de temperaturas en porcentaje de actividad relativa, para la enzima libre e inmovilizada a un pH fijo de 4,0. Donde: ♦ Enzima Libre, ◆ Enzima Inmovilizada.

6.6.2.- Perfil de pH

Se determinaron los perfiles de pH para la enzima inmovilizada, mediante ensayos realizados a distintos pH. El gráfico de la Figura 36 indicó que el pH óptimo para la enzima inmovilizada estuvo entre 3,5 y 4,0.

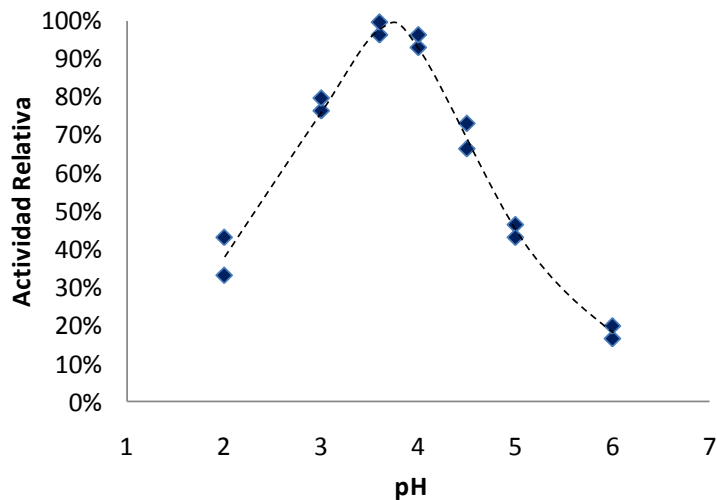


Figura 36.- Porcentaje de actividad enzimática de la enzima inmovilizada a diferentes pH con un tiempo de contacto de 10 min. entre la enzima y el sustrato.

La Figura 37 muestra una comparación entre la actividad enzimática de la enzima libre e inmovilizada a distintos pH. Se observa que el perfil de pH de la enzima inmovilizada se desliza hacia pH más ácidos, con respecto a la libre.

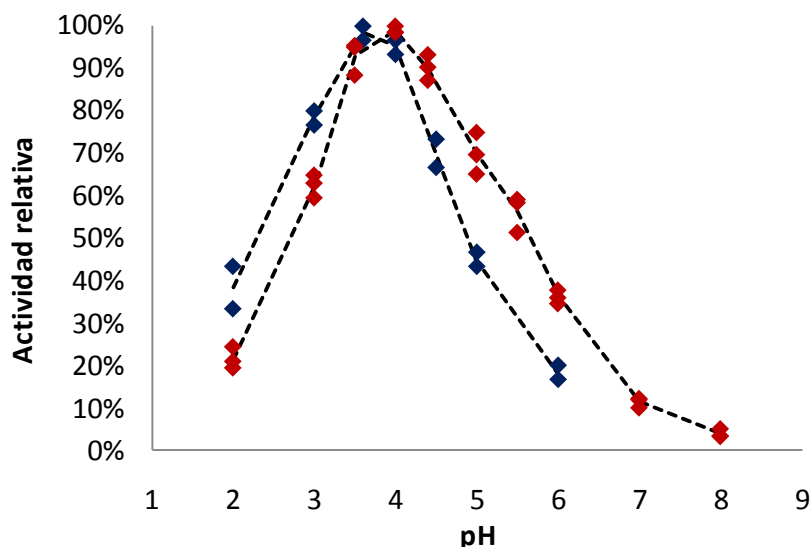


Figura 37.- Comparación de los perfiles de pH en porcentaje de actividad relativa para la enzima libre e inmovilizada a una temperatura fija de 40 °C. Donde: ♦ Enzima Libre, ◆ Enzima Inmovilizada.

6.7.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada

Se realizaron ciclos de repetición para determinación de actividad de la enzima inmovilizada en las microesferas de quitosano fierro. Todos los resultados de reutilizaciones seguidas de enzima inmovilizada se compararon con los datos de actividad de enzima libre.

Los ensayos constaron de pruebas de inmovilización de enzima: sin *linker*, con *linker* glutaraldehído y con *linker* EDC-NHS. la medición de la actividad se realizó añadiendo sustrato de celobiosa fresca en cada reutilización.

Estos ensayos se realizaron bajo las mejores condiciones obtenidas en el diseño experimental, con el fin de determinar el rendimiento de la enzima inmovilizada.

6.7.1.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada sin *linker*

Para los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada sin *linker* se inmovilizó 41,6 mg/L de enzima en las microesferas, y se añadió 1,9 g/L de sustrato de celobiosa fresca en cada reutilización.

La Figura 38 muestra la actividad acumulada de la enzima inmovilizada hasta 30 ciclos y se comparó con la que produce la enzima libre. Todos los cálculos se detallan en el Anexo 15A.

Los resultados mostraron que a 30 ciclos la enzima inmovilizada alcanza una actividad de 55,6% de la actividad que presenta la enzima libre.

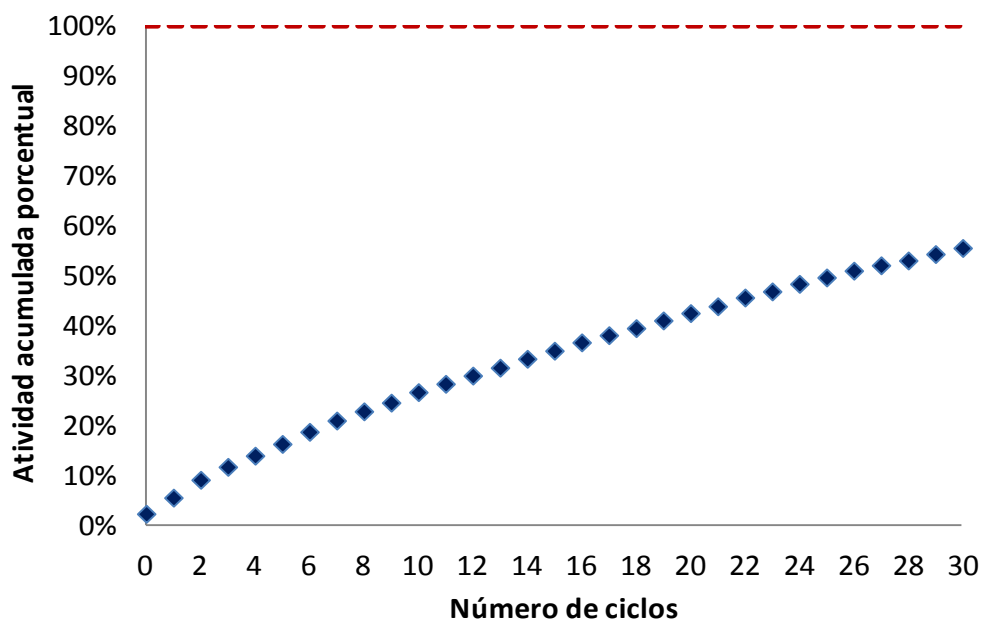


Figura 38.- Actividad enzimática acumulada en 30 ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada en microesferas utilizando 41,6 mg/L de Novozyme 188 sin *linker* y 1,9 g/l de celobiosa en la reacción. Donde: -- Actividad de la enzima libre, ◆ Actividad acumulada en cada ciclo por la enzima inmovilizada.

6.7.2.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con EDC - NHS

Para los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con *linker* EDC-NHS se utilizaron las mejores condiciones obtenidas tras el diseño experimental es decir se inmovilizó 103,9 mg/L de enzima en las microesferas y para la determinación de actividad se fue añadiendo 1,9 g/L de sustrato de celobiosa fresca en cada reutilización.

La Figura 39 muestra la actividad acumulada de la enzima inmovilizada con *linker* EDC-NHS hasta 30 ciclos y se comparó con la que produce la enzima libre. Todos los cálculos se detallan en el Anexo 15B y los valores de actividad en $\mu\text{M}_{\text{glucosa}}/\text{min}$ se muestran en el Anexo 16, Tabla 31.

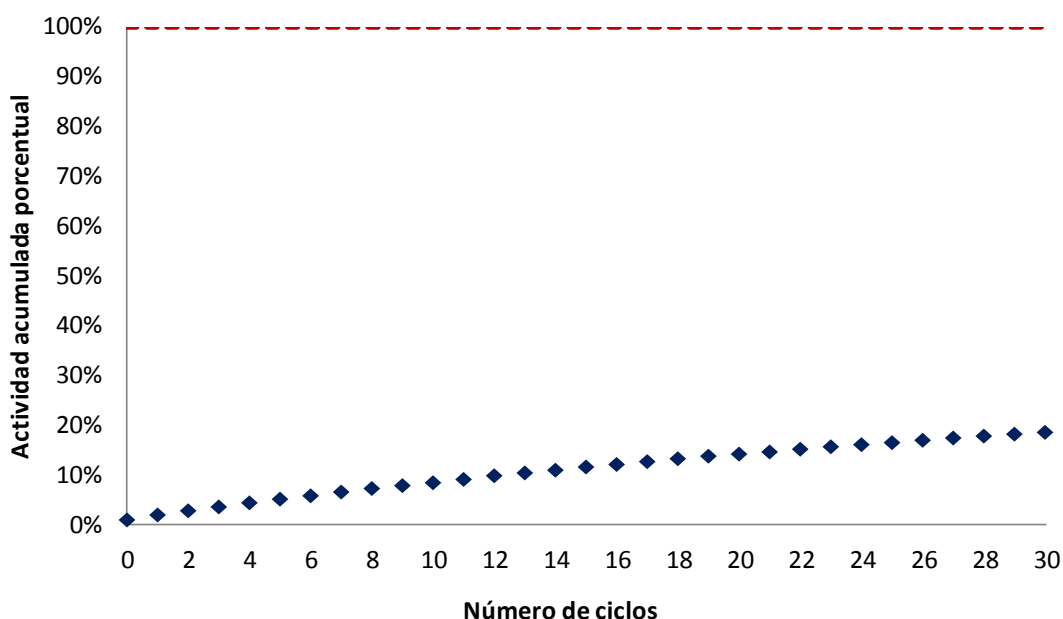


Figura 39.- Actividad enzimática acumulada en 30 ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada en microesferas utilizando 103,9 mg/L Novozyme 188, 2,47 μM EDC y 6,17 μM NHS. Donde:-- Actividad de la enzima libre, \blacklozenge Actividad acumulada en cada ciclo por la enzima inmovilizada con *linker* EDC.

El gráfico indicó que a 30 ciclos la enzima inmovilizada alcanzó una actividad de 18,5%, de la actividad que presenta la enzima libre.

6.7.3.- Ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con Glutaraldehído

Para los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con *linker* Glutaraldehído se utilizaron las mejores condiciones obtenidas tras el diseño experimental es decir se inmovilizó 61,6 mg/L de enzima en las microesferas y para la determinación de actividad se fue añadiendo 1,9 g/L de sustrato de celobiosa fresca en cada reutilización.

La Figura 39 muestra la actividad acumulada de la enzima inmovilizada con *linker* EDC hasta 30 ciclos y se comparó con la que produce la enzima libre. Todos los cálculos se detallan en el Anexo 15C y los valores de actividad en $\mu\text{M}_{\text{glucosa}}/\text{min}$ se muestran en el Anexo 16, Tabla 32.

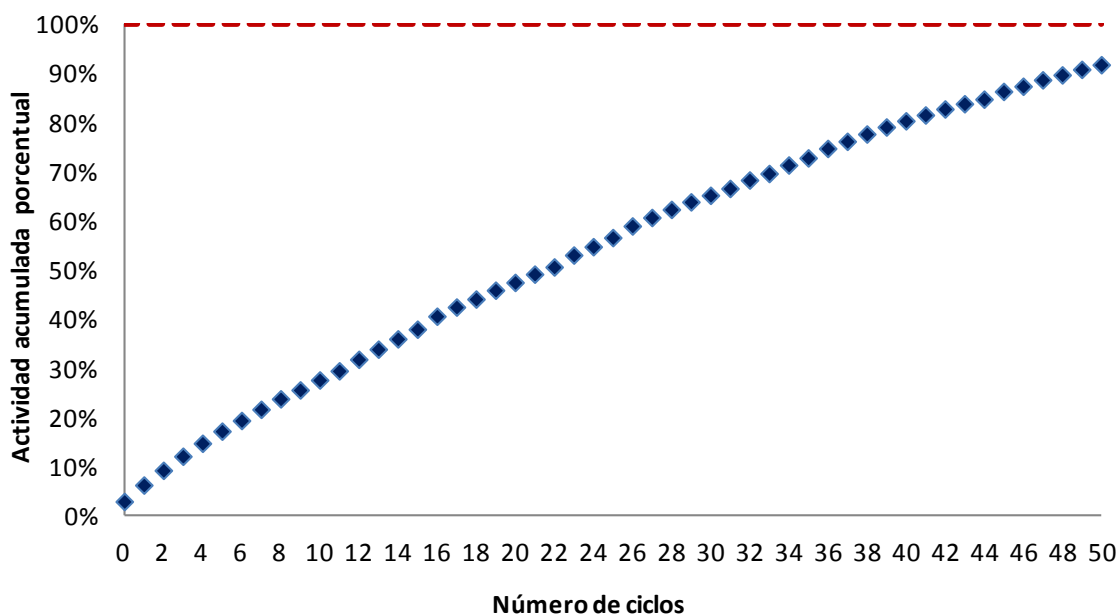


Figura 40.- Actividad enzimática acumulada en 30 ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada en microesferas utilizando 61,6 mg/L Novozyme 188, 1,41 μ M de *linker* Glutaraldehído. Donde:-- Actividad de la enzima libre, \blacklozenge Actividad acumulada en cada ciclo por la enzima inmovilizada con *linker* Glutaraldehído.

El gráfico indicó que a 30 ciclos la enzima inmovilizada alcanzó una actividad de 65,3% de la actividad que presenta la enzima libre, y con 50 ciclos pudo llegar al 91,9%.

6.7.4.- Comparación de la actividad en las reutilizaciones con ambos *linkers*

En la Figura 41 se muestra una comparación entre las actividades obtenidas en 30 reutilizaciones de la β -Glucosidasa inmovilizada utilizando ambos *linker*.

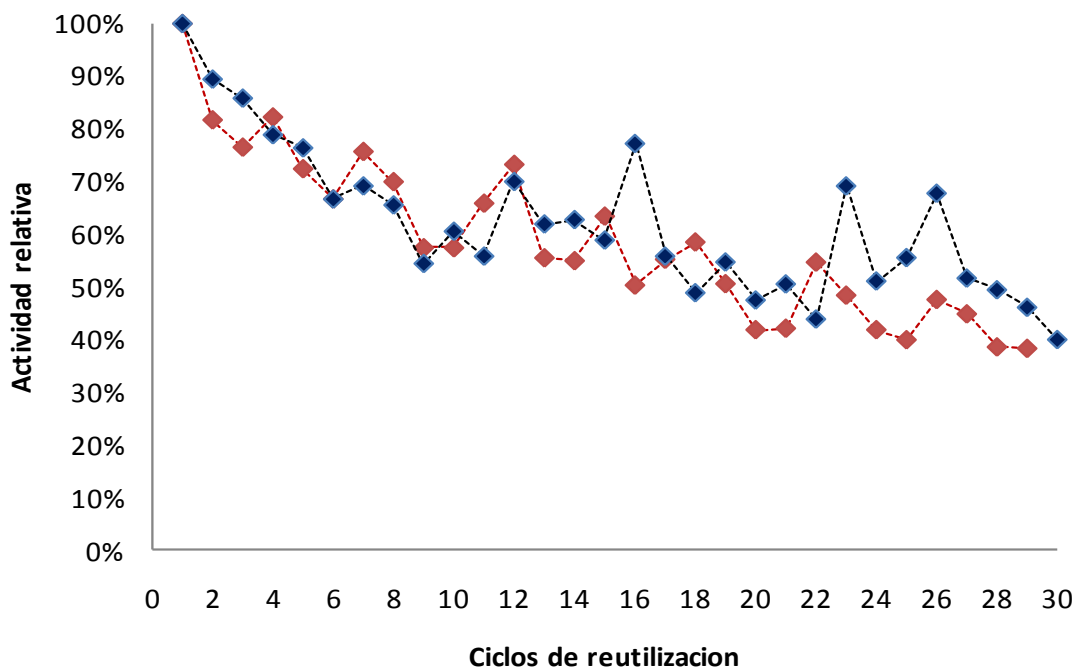


Figura 41.- Comparación de la actividad generada por la enzima inmovilizada utilizando ambos *linkers*. Donde: \blacklozenge -Glutaraldehído ($1,41\mu\text{M}_{\text{Glutaraldehído}}$, $61,6\text{ mg/L}$ de enzima), \blacklozenge -EDC-NHS ($2,47\mu\text{M}_{\text{EDC}}$ con $6,17\mu\text{M}_{\text{NHS}}$ y $103,9\text{ mg/L}$ de enzima).

Los resultados mostraron que la actividad de la enzima inmovilizada fue mejor con Glutaraldehído que con EDC, pues generó mayor actividad utilizando una menor cantidad de enzima. Las actividades, al final del 30º ciclo, disminuyeron hasta el 40% de la inicial, tanto para el caso del Glutaraldehído como del EDC, observándose la misma tendencia de inactivación para ambos *linkers*.

6.8.- Estabilidad en el tiempo de la enzima Inmovilizada

Se realizaron ensayos de almacenamiento semanal a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de la enzima inmovilizada con ambos *linkers* para evaluar la estabilidad de la enzima en relación al tiempo. Los resultados se presentan a continuación.

6.8.1.- Estabilidad de la enzima inmovilizada con *linker* EDC- NHS

La Figura 42 muestra los resultados de actividad de los ensayos en los que se almacenó la enzima inmovilizada semanalmente. En esta gráfica se presentan los promedios en porcentaje de las tres muestras a los que se les determinó la actividad hasta la segunda semana de almacenamiento a 4 °C en buffer pH 4,0. El intervalo de confianza utilizado fue de 95%.

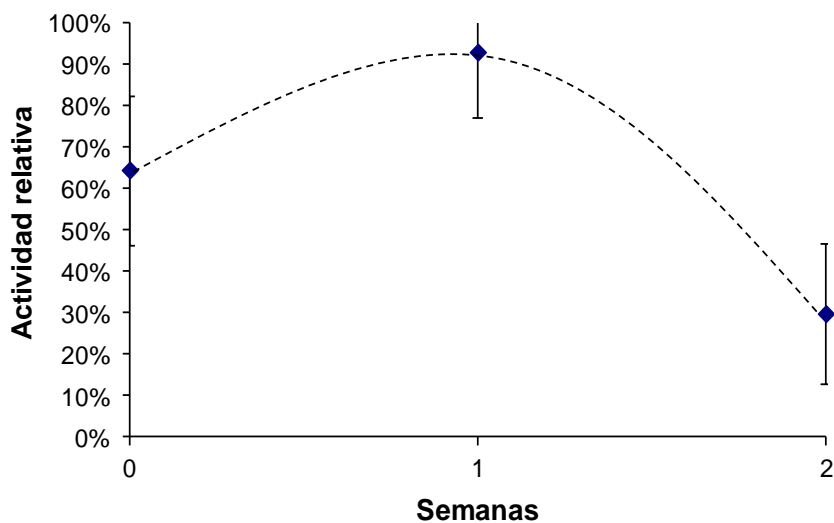


Figura 42.- Estabilidad durante el almacenamiento semanal de la enzima inmovilizada con *linker* EDC- NHS (2:5) a 4 °C, pH 4,0 en tampón acetato 50 mM.

Mediante un análisis ANOVA se determinó que las diferencias entre los datos de actividad semanales son significativas y por medio de un posterior estudio de test de Bonferroni, se determinó que hubo un aumento estadísticamente significativo entre las muestras del inicio a la primera semana de almacenamiento y luego hubo una baja abrupta significativa entre la primera semana de almacenamiento y la segunda semana (ver Tabla 33, Anexo 17).

Se evidenció un aumento de actividad del 30% pasado una semana y luego una abrupta disminución a la semana subsiguiente perdiendo un 70% de la máxima actividad.

6.8.2.- Estabilidad de la enzima inmovilizada con *linker* Glutaraldehído

La Figura 43 muestra los resultados de actividad de los ensayos en los que se almacenó la enzima inmovilizada semanalmente. En esta grafica se presentan los promedios en porcentaje de las tres muestras a las que se les determinó la actividad hasta la cuarta semana de almacenamiento a 4 °C en buffer pH 4,0. El intervalo de confianza utilizado fue de 95%.

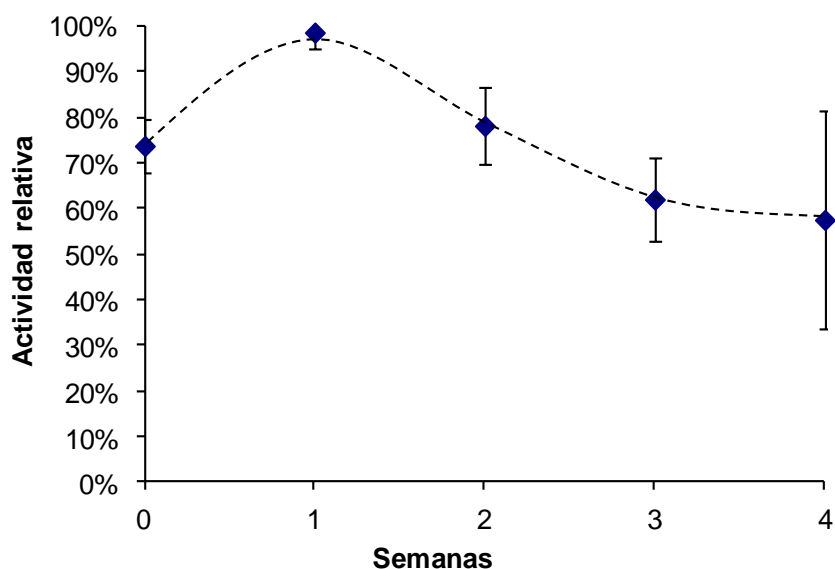


Figura 43.- Estabilidad durante el almacenamiento semanal de la enzima inmovilizada con *linker* Glutaraldehído a 4 °C, pH 4,0 en tampón acetato 50 mM.

Utilizando un análisis ANOVA se determinó que las diferencias, entre los datos de actividad semanales, son significativas. Por medio de un posterior estudio, test de Bonferroni, se determinó que hubo un aumento estadísticamente significativo después de una semana de almacenamiento, y luego hubo una baja significativa hasta la tercera semana de almacenamiento la cual se estabilizó entre la tercera y cuarta semana donde no se evidenció cambio significativo (ver Tabla 34, en Anexo 17).

Se evidenció un aumento de actividad pasado una semana de 25% y luego fue disminuyendo gradualmente hasta perder un 41% en la cuarta semana.

CAPÍTULO 7 – DISCUSIÓN

7.1.- Caracterización del preparado enzimático

7.1.1.- Proteína del preparado enzimático

Puesto que el contenido de proteína del preparado enzimático no estaba indicado por el proveedor fue necesario calcular la cantidad de proteína presente en este. Este estudio fue realizado asumiendo que toda la proteína del preparado Novozyme 188 corresponde solo a la enzima β -Glucosidasa y que no hay interferencia de otros compuestos. Por lo tanto, la proteína contenida por litro de preparado enzimático resulto ser de un promedio de 35,0 g/L, determinada mediante método de Bradford (Bio Rad) volumétrico.

Según otros autores este valor puede variar según el proveedor de la enzima y el método para calcularla, siendo para Kabel *et al.* (2005) la concentración total de proteínas presente en el preparado enzimático Novozyme 188 de 57 g/L mediante Bradford y 168 g/L por ensayo Pierce, para Calsavara *et al.* (2001) fue de 170 g/L, dato suministrado por Novo Nordisk (Copenhague, Dinamarca), mientras que para Silva (2010), mediante método Bradford, resulto ser de 36,4 g/L.

7.1.2.- Dimensiones de la β -Glucosidasa

Según Watanabe *et al.* (1992) el peso molecular de la β -Glucosidasa purificada proveniente de *Aspergillus niger*, es de 240 kDa, valor determinado mediante GPC (cromatografía de permeación en gel), y por el método SDS/PAGE, es de 120 kDa. Estudios de Chirico y Brown (1986) proporcionan datos de masa molecular de β -Glucosidasa de la especie *Trichoderma reesei* purificada de 80 kDa. Mientras que Reshmi y Sugunan (2013) mencionan que la enzima posee una masa molecular de aproximadamente 130 kDa.

Ante la diferencia entre valores de peso molecular para la enzima, se decidió realizar este cálculo utilizando el Protein Data Bank, tomando los datos de la β -Glucosidasa proveniente del hongo *Trichoderma reesei* (3AHY) del complejo Tris, dando como resultado 118 kDa. Además, a través de este programa se midió el diámetro aproximado de la enzima el cual fue de 50 Å.

Las diferencias de las masas de β -Glucosidasa en el preparado enzimático pueden deberse a: la exactitud del método a utilizar, la purificación de la enzima del preparado y origen de la enzima (*Trichoderma reesei* o *Aspergillus Níger*). Además el preparado enzimático puede contener otras enzimas que los métodos contabilice como β -Glucosidasas sin serlo, o que el método no contabilice como tal.

7.1.3.- Actividad específica de la enzima

Los resultados obtenidos de la actividad de la enzima libre utilizando una concentración fija de sustrato de celobiosa indicaron que la liberación de glucosa fue creciendo linealmente a medida que se aumentó la concentración de enzima llegando a mantenerse constante. Esto por causa de la concentración de sustrato que se tornó limitante en la reacción a niveles superiores a 20 μg de Novozyme 188 aproximadamente. Por este motivo para ensayos posteriores de cinética se decidió utilizar una cantidad de enzima de modo tal de asegurar que la reacción no se encontrará en la etapa estacionaria, en donde la producción de glucosa se mantiene constante aunque se aumente la cantidad de enzima, esto es 10,6 μg de enzima por 1,9 g/L de celobiosa.

La actividad específica del preparado enzimático fue de 38,96 $\mu\text{mol}_{\text{glucosa}}/\text{mg}_{\text{Novozyme188}}/\text{min}$ a 40 °C y pH 4,0. Este valor fue comparado con el obtenido por Silva (2010) la cual utilizó el mismo preparado comercial a similares condiciones de temperatura y pH, el cual fue de 7,14 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$, siendo aproximadamente 5,5 veces menor que el obtenido en este estudio. Calsavara *et al.* (2001) utilizó un preparado de β -Glucosidasa suministrado por Novo Nordisk

(Copenhague, Dinamarca) cuya actividad específica fue de 9,5 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ a 50 °C y pH 4,8.

Las diferencias entre resultados de actividad específica obtenida entre este estudio y otros se pudieron deber al método de cuantificación de la glucosa utilizado o al tipo de inactivación realizado a la reacción enzimática.

En los ensayos de medición de actividad enzimática se observó que en el tiempo cero existe una acelerada producción de glucosa. Para corregir este error se utilizó el método de cambio brusco de pH, descrito por Silva (2010), que consta en la adición de NaOH de 1 M a una razón de 1:20 con el fin de cambiar el pH a 12. Para asegurar la total inactivación de la enzima, se realizaron ensayos, con un tiempo de reacción de 10 minutos, con distintas concentraciones de NaOH a una proporción de 1:1, con respecto a la reacción, para determinar de esta forma cual era la mejor concentración para realizar esta tarea. Los resultados mostraron que en la inactivación de la reacción con concentraciones iguales o superiores a 1 M de NaOH a una proporción de 1:1 con respecto a la reacción la actividad permanece constante, es decir, ya no disminuye la producción de glucosa. En base a lo anterior, en todos los ensayos siguientes se trabajó con 1 M de NaOH para inactivar la enzima (ver gráfico en Anexo 6).

Sin embargo, aun a tiempo cero continuaron generándose un mínimo de glucosa. Se recomienda profundizar en este tema, ya que el método de cambio brusco de pH inactiva la enzima, pero no completamente a tiempo cero.

7.1.4.- Cinética enzimática

Silva (2010), utilizando β -Glucosidasa y sustrato de celobiosa, obtuvo un K_M de 6,79 y un V_{max} de 0,483 mM/min pero no respondió a la cinética de Michaelis-Menten. En cambio, trabajos realizados por Rechmi y Sugunan (2013) señalan un K_M y V_{max} para la β -Glucosidasa, fue de 5,9 mM y 0,0135 mM/min, respectivamente, utilizando p-NPG como sustrato y con un r^2 de 0,9989, el cual fue determinado

mediante la ecuación inversa de Lineweaver-Burk. Zheng *et al.* (2013) que utilizaron el mismo soporte de este informe, señalan haber obtenido un K_M igual a 4,94 mM y un V_{max} de 215 $\mu\text{mol/mg/min}$ y tras la inmovilización estos valores aumentaron a 6,46 mM y 396 $\mu\text{mol/mg/min}$, respectivamente. Verma *et al.* (2012) utilizando β -Glucosidasa de *Aspergillus niger* con distintas cantidades de p-NPG observaron el comportamiento cinético de Michaelis-Menten, en el cual la K_M determinada para la enzima libre fue de 3,5 mM y el V_{max} de 0,72 U/mg, mientras que la para la inmovilizada obtuvo un K_M de 4,3 mM y un V_{max} de 0,89 U/mg. Todos estos resultados muestran una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato, luego de la inmovilización.

En este estudio la K_M calculada fue de 2,94 mM y la V_{max} de 1,26 mM/min, estos valores fueron obtenidos mediante correlación no lineal de la glucosa producida en el tiempo a distintas concentraciones de sustrato. Estos resultados respondieron a la cinética de Michaelis-Menten ajustada mediante la determinación del inverso por Lineweaver-Burk. Comparado con los otros estudios realizados a la enzima libre se observan K_M similares. Además, según bibliografía, los valores de K_M bajos significan una mayor afinidad de la enzima al sustrato, en un rango de 10^{-1} a 10^{-6} M (Hicks, 2001).

La K_M en este trabajo fue menor en comparación con otros estudios, esto indicó que hubo mayor afinidad de la enzima por el sustrato, y un V_{max} generalmente mayor que otros estudios, pues este valor puede variar con la forma de la inactivación de la reacción enzima-sustrato o el método utilizado para cuantificar la glucosa

7.2.- Inmovilización enzimática

7.2.1.- Enzima adsorbida y actividad inicial en la inmovilización

Las microesferas utilizadas en el presente informe fueron preparadas por Silva (2010) y optimizadas por Aguayo (2011). Según esta última autora, el Glutaraldehído

utilizado en la preparación de las microesferas permite entrecruzar las cadenas de quitosano, concediendo su ligación covalente con la β -Glucosidasa en la etapa de la inmovilización enzimática. Sin embargo, por lo descrito por Agnihotri *et al.* (2004), el Glutaraldehído utilizado para la unión del quitosano no queda reactivo para su posterior uso en la inmovilización.

En este trabajo se realizaron ensayos de pretratamiento para las microesferas en donde se adicionó un aminoácido con el fin de asegurar la inactivación total del Glutaraldehído presente en la superficie de estas, de manera tal de dejar los grupos amino libres del quitosano para la reacción con el agente enlazante necesario para la inmovilización, en este caso se utilizó ácido glutámico.

Los resultados mostraron que en la inmovilización enzimática el porcentaje de proteína adsorbida fue mayor con el pretratamiento de ácido glutámico que sin este. Los ensayos realizados utilizando el método de Bradford indicaron que con el pretratamiento la enzima aumentó de un 32,2% a un 38,6% con Glutaraldehído y con EDC aumentó de un 20,4% a un 23,6% (ver Tabla 3). Además la actividad de la enzima inmovilizada también aumentó con el uso del ácido glutámico de un 2,44% a un 3,31% en relación a la actividad de la enzima libre.

En otros estudios se observan distintos resultados de adsorción de la enzima al soporte que pueden ser explicadas por el uso de distintas condiciones de inmovilización, así como la naturaleza del soporte, del *linker* o del tipo de enzima utilizada.

Para Calsavara *et al.* (2001), que utilizaron Novozyme 188 en un soporte de sílice de poro controlado (CPS) de diámetro 0,351 mm, la cantidad de proteína fijada en la inmovilización fue de 67% del máximo de enzima total para la inmovilización, según este autor, la enzima inmovilizada pierde solo un tercio de actividad con respecto a la enzima libre. Otros estudios realizados por Yan *et al.* (2010), en los que se inmovilizó β -Glucosidasa en dos componentes coloidales de suelo, arcilla gruesa (0,2-2 μm) y arcilla fina (<0,2 μm), mostraron que la β -Glucosidasa adsorbió entre 71,5% a 72,4% y entre 79,8% a 82,5%, respectivamente; la β -Glucosidasa

inmovilizada en coloides gruesos inorgánicos y orgánicos mostraron una actividad del 72,4% y 69,8% en relación a la libre, respectivamente, y la actividad residual de la arcilla de tierra fina fue de 79% a 81%. Verma *et al.* (2013), inmovilizando β -Glucosidasa de *Aspergillus niger* en nanopartículas magnéticas de óxido de hierro preactivadas con Glutaraldehído, obtuvieron un 93% de adsorción mediante unión covalente. Este estudio fue realizado con nanopartículas que presentan un tamaño de 40 nm y un área superficial de 29 m²/g, por lo que se concluye que la mayor adsorción se debió a la gran área superficial del soporte lo que permitió aumentar la carga enzimática.

Según Zheng *et al.* (2013) que inmovilizó β -Glucosidasa en microesferas magnéticas de quitosano, la adsorción se ve directamente afectada por la concentración de enzima, pero se satura cuando llega a un máximo específico. Además señaló que el incremento del tiempo de adsorción puede mejorar la actividad de la enzima inmovilizada, la que después de 8 horas tuvo la máxima actividad, donde la eficiencia de inmovilización fue de 90,2% con un rendimiento de actividad de 83,2%. La extensión de este tiempo de adsorción, según este autor, no aumentaría la actividad de la enzima inmovilizada.

Zubriene *et al.* (2003) señalaron en su trabajo que el máximo rendimiento de inmovilización de β -galactosidasa sobre microesferas de quitosano fue de un 98%, con una retención del 90% de la actividad original tras 240 días a 4 °C. Esto demuestra que el mismo soporte con otras enzimas puede tener buenos resultados.

7.2.2.- Efectos de los *linker* en la actividad de la enzima inmovilizada

Para la inmovilización de la β -Glucosidasa en las microesferas de quitosano fierro se usaron dos tipos agentes enlazantes (*linker*), cada uno con características especiales, con el fin de realizar una comparación entre ellos y determinar el rango donde se genera mayor actividad.

Según Chang y Juang (2007) una alta cantidad de Glutaraldehído puede causar la desnaturalización de enzimas. Esta afirmación fue confirmada por los ensayos realizados en este trabajo como se muestra en la Figura 27 (efectos del Glutaraldehído). Para el EDC la actividad fue baja con respecto al Glutaraldehído, sin embargo se mantuvo más estable a mayores concentraciones como se muestra en la Figura 26 (efectos del EDC).

El Glutaraldehído fue uno de los dos enlazantes elegidos por su bajo costo y su eficiencia en la estabilización de biomateriales, siendo frecuentemente utilizado para la inmovilización (Chang y Juang, 2007). Para el presente trabajo, el soporte utilizado estaba previamente activado por los grupos aminos primarios presentes en las microesferas de quitosano, por lo que el Glutaraldehído adicionado quedó enlazado con las aminas. Posteriormente, al adicionar la enzima, esta se enlazó covalentemente con el *linker*. Según López *et al.* (2005) esta estrategia reduce la modificación química de la enzima solo a los grupos de la proteína que están involucrados en la inmovilización, mientras que juntar la enzima con el soporte, antes de agregar el enlazante, puede llevar a una modificación total de la superficie de la enzima.

El otro agente enlazante utilizado en este informe fue el EDC. Este *linker* fue escogido por ser un agente activante de grupos carboxilo y por permitir la reacción con grupos aminos de otra cadena. El EDC es usado como enlazante de biomoléculas con fines medicinales, por sobre el Glutaraldehído, debido a que luego del entrecruzamiento de este, se ha demostrado que existe una liberación de monómeros tóxicos de Glutaraldehído después de la hidrolización del material. (Powell y Boyce, 2006)

Se determinó que las dos variables estudiadas (*enzima-linker*) son estadísticamente significativas, es decir, influyen en la respuesta final, que es la actividad enzimática. Esta influencia se traduce en la cantidad de Novozyme 188 y *linker* que se le agrega a la reacción. Según Chang y Juang (2007) con una baja fuerza iónica de Glutaraldehído es posible una rápida inmovilización de proteínas, lo

que también se puede aplicar al EDC. En cuanto a la enzima, según Singhanian *et al.* (2012) tanto la celobiosa como la glucosa son inhibidores de esta, por lo tanto a concentraciones altas de estas biomoléculas la actividad se verá inhibida. Los resultados de la Figura 30 y Figura 33 (prolongación de ambos *linkers*) corroboran los estudios de Chang y Juang (2007) y Singhanian *et al.* (2012), demostrando que sobre un límite de concentraciones de enzima y *linker*, la actividad enzimática disminuye.

7.2.3.- Inmovilización de la enzima

Los mayores resultados del diseño factorial se obtuvieron con el *linker* Glutaraldehído a 1,41 μM con 62,4 mg/L de enzima, y fueron de 67,5 $\mu\text{M}/\text{min}$ de actividad enzimática, y para EDC dio su mayor actividad utilizando 2,47 μM de EDC, 6,17 μM de NHS y 103,9 mg/L de enzima alcanzando una actividad máxima de 39,6 $\mu\text{M}/\text{min}$.

Sin embargo, estos resultados están muy por debajo de lo obtenido con la enzima libre y siguen siendo bajos con respecto a los obtenidos en otros estudios en donde se utilizan condiciones similares de inmovilización.

Fajardo *et al.* (2011) tiene tres posibles explicaciones para la reducción de actividad: (1) después de la inmovilización el sitio activo puede modificarse, (2) puede haber ocurrido algún impedimento estérico, o (3) inactivación del sitio activo. Sobre este punto, el EDC posee un brazo espaciador de longitud cero, es decir, la separación entre el soporte y la enzima ligada por el EDC es mínima, por lo que si el sitio activo de la enzima al unirse al *linker* se ve obstruido, no habrá forma en que la enzima pueda moverse para cambiar esa situación. Mientras que el Glutaraldehído posee un brazo espaciador más largo, que permite el movimiento entre el soporte y la enzima, por lo que si el sitio activo de la enzima se ve obstaculizado, es posible que esto pueda ser revertido. Por lo tanto, si existe inactivación del sitio activo, con Glutaraldehído tal efecto se puede ver reducido, e incluso un *linker* con un brazo espaciador más largo (de mayor longitud) puede optimizar aún más la eficiencia de la

unión entre la enzima y el soporte (Thermo Scientific Pierce, Crosslinking Technical Handbook).

Según Rodríguez (1991) esta disminución de actividad también pudo ser causada por alteraciones en la conformación de la enzima debido a alguna modificación de aminoácidos o de su centro activo, o porque la difusión del sustrato a su centro activo pudo estar impedida por resistencias de tipo interno y externo, por ende el paso del sustrato fue muy bajo. También se presume que estos resultados pudieron deberse a que los grupos reactivos del soporte, que en este caso fueron los grupos amino del quitosano, se confundieron fácilmente con la celulosa (glucosa o celobiosa) o pudieron reaccionar con algún aminoácido que formaba parte del centro activo de la enzima que era esencial para la actividad catalítica.

Jung *et al.* (2012), que inmovilizaron la β -Glucosidasa de *A. niger* en gel de sílice, para evitar la pérdida de actividad realizaron un tratamiento previo a la enzima con celobiosa y glucosa, de forma a proteger el sitio activo de la β -Glucosidasa durante la inmovilización. Sus resultados demostraron que con este pretratamiento aumentó hasta 176% la actividad, dejando demostrado que cuando la enzima no pretratada es inmovilizada, muchos grupos amino de las proximidades del sitio activo se unen, lo que resulta en una disminución de actividad significativa.

Se sugiere realizar pretratamientos en la enzima, como lo descrito por Jung *et al.* (2012), de modo tal de aumentar la producción de glucosa. Además, también se recomienda probar con otros agentes enlazantes de mayores longitudes, ya que como se observó en los estudios realizados en este informe, mientras mayor es la distancia entre la enzima y el soporte, mayor es la actividad, por lo tanto si la tendencia sigue de esa misma forma se puede asumir que *linkers* más largos, tales como DMS (Dimethyl Suberimidate•2HCl) de 11 Å o BS(PEG)_n (Bis(succinimidyl) n(ethylene glycol) de entre 21 a 35 Å, pueden dar mejores resultados.

7.3.- Comparación de los perfiles de pH y temperatura para la enzima libre e inmovilizada

En este estudio se observó que la actividad de la enzima libre fue subiendo a medida que aumentó la temperatura llegando a su óptimo a los 60 °C y luego, bajo levemente a los 65 °C hasta tener una caída abrupta a los 70 °C (ver Figura 24), situación semejante a la descrita por Bravo *et al.* (1999), en donde se observó que entre 40 °C y 60 °C hubo una inhibición de sustrato que contribuyó a la producción de glucosa, y a los 70 °C se produjo una desactivación enzimática significativa dentro de un tiempo corto. A pesar de encontrar un máximo rendimiento de la enzima libre a los 60 °C, se decidió trabajar a 40 °C, ya que según Calsavara *et al.* (2001), la β -Glucosidasa mantiene su actividad por 240 minutos hasta los 55 °C y si bien no es la temperatura óptima, es una temperatura a la cual la enzima se mantiene estable, siendo el único impedimento el tiempo de reacción, el que será mayor.

En el caso de la enzima inmovilizada se encontró que la actividad también fue aumentando a medida que aumentó la temperatura hasta llegar a su máximo entre los 60-65 °C, y sobre los 70 °C comenzó a disminuir rápidamente.

La Figura 35 muestra las leves diferencias entre los perfiles de temperatura de la actividad de la enzima libre e inmovilizada, en el cual se observa un leve desplazamiento de la enzima inmovilizada hacia temperaturas más altas, lo que se traduce en un aumento de la estabilidad en la actividad del inmovilizado a temperaturas más altas, puesto que la enzima inmovilizada a los 70 °C mantiene un 60% de actividad de a máxima, en cambio con la enzima libre se desnaturaliza a esta temperatura. Según Reshmi y Sugunan (2013), que inmovilizaron en espuma de sílice nanoporosa, la inmovilización de enzimas tiene un efecto en la rigidez de esta, lo que se refleja en el aumento de la estabilidad frente la desnaturalización a altas temperaturas, lo que explicaría el desplazamiento del perfil de la inmovilizada. Verma *et al.* (2012) también encontraron que la temperatura óptima para la enzima libre e inmovilizada era de 60 °C.

En cuanto a los perfiles de pH se observó, tanto para enzima libre como inmovilizada, que la actividad fue subiendo hasta llegar a 4,0 en la libre y 3,5 en inmovilizada, y luego bajo rápidamente, como se observa en la Figura 36. El rango promedio para ambas estuvo entre 3,5 y 4,5, fuera de estos límites la actividad disminuyó.

En la Figura 37 se observó un leve desplazamiento del perfil de la enzima inmovilizada hacia pH más ácidos, lo que sugiere que existe una mayor estabilidad del inmovilizado a pH ácidos, mientras que para la enzima libre existe mayor estabilidad a pH básicos.

Un comportamiento parecido tuvieron Bissett y Sternberg (1977), que inmovilizaron β -Glucosidasa sobre quitosano, para ellos el pH óptimo, tanto para enzima libre como inmovilizada fue de 4,5 a 50 °C, pero la enzima inmovilizada mostro mayor actividad a pH más bajos. Este efecto pudo ser causado por el pH del microentorno de la matriz del quitosano, que se utiliza como soporte ya que en concentraciones altas de protones (H^+) los grupos amino del quitosano serían protonados, atrayendo así los iones hidroxilo que contribuirían a mantener un pH del microentorno mayor que en la solución completa y por lo tanto estabilizar la β -Glucosidasa. Para Zheng *et al.* (2013), el pH óptimo de la enzima inmovilizada en microesferas de quitosano fue de 4,8, a valores de pH más altos causó una significativa reducción de actividad de la enzima inmovilizada y libre. En cambio para Verma *et al.* (2013) en nanopartículas magnéticas de óxido de fierro con Glutaraldehído el pH óptimo de actividad para la enzima libre e inmovilizada vario de 4,0 a 6,0, indicando que la enzima fue más estable a pH más básicos, igualmente para Jung *et al.* (2012) que inmovilizaron la β -Glucosidasa pretratada con celobiosa-glucosa en gel de sílice, se desplazó hacia la región alcalina.

7.4.- Efectos de la reutilización de la enzima inmovilizada

La reutilización de las enzimas inmovilizadas es importante desde el punto de vista de rendimiento, debido al aumento de la actividad que puede producirse con respecto a una enzima libre. Además es posible reutilizar más de una vez la enzima inmovilizada, a diferencia de la libre. Para este trabajo se realizaron ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con ambos *linkers*, cuyos resultados indicaron la producción de actividad en 30 ciclos.

La Figura 39 mostró las actividades acumuladas en 30 reutilizaciones con *linker* EDC, la cual alcanzó un 18,5% de la actividad que produce la enzima libre. En cambio, con Glutaraldehído como se representó en la Figura 40, en 30 reutilizaciones alcanzó el 65,3% de la actividad de la enzima libre, lo que indica que este *linker* es más apropiado para la inmovilización en este trabajo.

Jung *et al.* (2012), que inmovilizó β -Glucosidasa en gel de sílice activada con celobiosa-glucosa, obtuvo una actividad relativa a las 20 repeticiones de hasta el 80% de la actividad máxima inmovilizada. Rechmi y Sugunan (2013) que inmovilizaron la β -Glucosidasa con *linker* Glutaraldehído en espuma de sílice nanoporosa mostrando que en 10 ciclos se retiene más del 85% de actividad inicial. Verma *et al.* (2013) con sus nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con Glutaraldehído hidrolizaron p-NPG a 60 °C e indicaron que se mantuvo una actividad superior a 80% hasta el octavo ciclo y fue estable hasta los 16 ciclos pues se retuvo hasta un 50% de la actividad inicial. Zheng *et al.* (2013), que inmovilizaron β -Glucosidasa en microesferas magnéticas de quitosano, después de ocho ciclos repetidos su tasa de conversión se mantuvo sobre el 76,5% y recuperaron un 84,4% de actividad de la enzima libre. Esto indicó que las microesferas magnéticas con β -Glucosidasa inmovilizada poseían una estabilidad operativa favorable.

En la Figura 41 se muestra una comparación entre las actividades relativas obtenidas a lo largo de 30 reutilizaciones de la enzima inmovilizada con ambos *linkers*, dando como resultado que la inactivación de la enzima no se ve afectada por

la naturaleza del *linker* empleado, pues en ambos existió la misma tendencia a disminuir. No obstante la actividad inicial para la enzima inmovilizada con Glutaraldehído resulto ser mas del doble que con EDC como se muestran en las Figura 39 y Figura 40.

En general, las reutilizaciones de la enzima inmovilizada fueron disminuyendo su actividad a lo largo de los ciclos. Algunas de las causas fueron: poca adsorción de la enzima en las microesferas, modificación interna de la estructura de las microesferas a medida que se fueron reutilizando, hinchamiento o rompimiento de las microesferas, lo que pudo causar que la actividad fuera disminuyendo. También el proceso de las reutilizaciones pudo causar desnaturalización o desactivación de la enzima, también la enzima pudo haber inhibido su acción catalítica en el transcurso de las reutilizaciones debido a la modificación de su sitio activo (Cifuentes y Rojas, 2005; Chang y Juang, 2007; Fajardo *et al.*, 2011).

7.5.- Efectos de la estabilidad en el tiempo de la enzima inmovilizada

La Figura 42 y Figura 43 (ver resultados) mostraron la estabilidad de almacenamiento de la enzima inmovilizada con ambos *linkers* a 4 °C, semanalmente. Se determinó para ambos *linkers*, utilizando un análisis ANOVA, que las diferencias entre semanas fueron significativas, y por medio de un post test de Bonferroni se demostró que el alza de una semana a otra y su posterior baja, también fue significativa (Anexo 16). Los resultados con EDC-NHS mostraron un crecimiento de actividad después de una semana de almacenamiento del 30%, la cual disminuyó casi completamente a las dos semanas, perdiéndose alrededor de un 70% de actividad. Mientras que con Glutaraldehído después de una semana aumentó 25% y luego disminuyó pausadamente hasta perder un 41% de actividad a la cuarta semana de almacenamiento.

Caso parecido ocurrió con Chang y Juang (2007) que inmovilizaron la β -Glucosidasa la que después de 5 días de almacenamiento aumento la actividad y se

mantuvo estable hasta los 30 días, además la estabilidad de almacenamiento de la enzima inmovilizada fue mayor que el de la libre. Rechmi y Sugunan *et al.* (2012) compararon la estabilidad de la enzima libre e inmovilizada y encontraron que en la libre más del 85% de actividad se perdió en 10 días, en cambio la enzima inmovilizada en espuma de sílice mesoporosa entrecruzada con Glutaraldehído mostró una gran estabilidad con altas cargas de enzima, pues la actividad se mantuvo estable hasta los 60 días de almacenamiento.

En este estudio, la estabilidad de la enzima inmovilizada con ambos *linkers* comparada con otros autores, resultó ser más menor, sobre todo con EDC que fue el más inestable en el tiempo.

CAPÍTULO 8 – CONCLUSIONES

Se determinó que la actividad específica de la enzima libre fue de 38,96 $\mu\text{M}/\text{mg}/\text{min}$, valor que posteriormente fue utilizado en la comparación con la actividad de la enzima inmovilizada. Los ensayos de cinética enzimática realizados en este estudio se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten, con un V_{max} de 1,26 mM/min y el K_M de 2,94 mM , infiriéndose que la enzima y el sustrato tienen buena afinidad.

Fue posible realizar la inmovilización de la enzima sobre microesferas magnéticas de quitosano fierro con una retención máxima de actividad inicial del 3,31% de la actividad que produce la enzima libre. Además se logró la inmovilización con los dos linkers propuestos y se encontró que la actividad enzimática con el Glutaraldehído resultó ser mayor que la del EDC-NHS.

Se encontró que los perfiles de trabajo de temperatura y pH, para la enzima inmovilizada con respecto a la libre, sufrieron un leve desplazamiento hacia pH más ácidos y temperaturas más altas.

En cuanto a los ensayos de reutilizaciones arrojaron que el mejor *linker* fue el Glutaraldehído, pues en 30 ciclos alcanzó un 65,3% de la actividad que presentó la enzima libre, mientras que con EDC solo se obtuvo un 18,5%.

En relación a la estabilidad de la enzima inmovilizada con respecto al tiempo, se observó un aumento significativo después de una semana de almacenamiento utilizando ambos *linkers*. Luego de la segunda semana de almacenamiento con EDC se perdió alrededor de un 70% de la actividad máxima obtenida en este ensayo, lo que indicó que la enzima inmovilizada con este *linker* no fue estable en el tiempo, en cambio con Glutaraldehído, luego de la cuarta semana, se perdió solo un 41% de la actividad máxima, lo que indicó que la enzima con este *linker* es más estable en el tiempo.

En bibliografía se indica que la relación enzima-*linker* utilizada es favorable para el proceso de inmovilización. Sin embargo, en este estudio no se observó esta

afinidad, lo que se debió a que la relación enzima-soporte-*linker* no fue la más apropiada, por esta razón no se obtuvo la productividad que se esperaba en términos de glucosa producida para la enzima inmovilizada, pues fue muy inferior en comparación con la enzima libre.

Por esto se sugiere realizar más investigaciones tales como aumentar el tiempo de adsorción de la proteína en las microesferas, realizar un pretratamiento para el soporte de quitosano con arcilla o carbón activado o activar la enzima con celobiosa y glucosa, como también se recomienda probar con otros materiales, tales como placas o nanopartículas de sílice gel activada con Glutaraldehído. Asimismo se sugiere probar con otros *linkers* de mayores longitudes para minimizar los posibles impedimentos estéricos o la inactivación del sitio activo del biocatalizador de tal manera de mejorar el rendimiento de la enzima inmovilizada.

CAPÍTULO 9 – BIBLIOGRAFÍA

- Abril A., Navarro E. 2012. Etanol a Partir de Biomasa Lignocelulósica. Aleta Ediciones.
- Acevedo F., Gentina J.C., Illanes A. 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ed. Universitarias de Valparaíso.
- Agnihotri S., Mallikarjuna N., Aminabhavi T. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 100: 5- 28.
- Aguayo C. 2011. Optimización de condiciones experimentales de producción de microesferas quitosano-ferro. Facultad de Ingeniería y Tecnología Ingeniería Civil en Biotecnología. Universidad San Sebastián.
- Álvarez A., Salgado R., García E., Domínguez M.M., Granandos J.M., Aguirre A., Carmona R., Morales A., Herrera P.J., Licea A., Mendoza A.M. 2012. Aprovechamiento Integral de los Materiales Lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 13 (4)*.
- Ancín J. 2008. Biocombustibles de Segunda Generación. *Revista del Colegio Oficial de Físicos*, nº 19 (12).
- Arroyo M. 1998. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 39: 23-39.
- Balat M., Balat H., Oz C. 2007. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 551–573.
- Balat Mustafa. 2010. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 52:858–875.

- Barroso M. 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una Biorrefinería. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Madrid, España.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. 2008. Bioquímica. Sexta Edición. Editorial Reverté.
- Betancor L., López-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Guisán J. 2006. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 39, p 877–882.
- Bissett F, Sternberg D. 1977. Immobilization of *Aspergillus* β - Glucosidase on Chitosan. *Applied and Environmental Microbiology* 35: 750-755.
- Bradley F., Bennett T. 1982. Biochemistry. Editorial Reverté, S.A.
- Bravo V. Paez M., Paez P., Aoulad M., Reyes A. 2000. The influence of temperature upon the hydrolysis of cellobiose by β -1,4-glucosidases from *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 614–620
- Calsavara L., De Moraes F., Zarin G. 2001. Comparison of catalytic properties of free and immobilized cellobiase Novozym 188. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93: 615-626.
- Caprile M. D. 2005. Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. Trabajo presentado en el Congreso del ISWA (International Solid Waste Association). Pp. 1-6. Buenos Aires, Argentina.
- Casablanca E., Ríos N., Terrazas E., Álvarez M. 2011. Producción de β -Glucosidasas por cultivos de bacterias termófilas indígenas del altiplano boliviano. *Rev. Colomb. Biotecnology* Vol. XIII No. 1, p 66-72.

- Chang, M. Y., Juang, R. S. 2007. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability β -glucosidase Enzyme and Microbial Technology 36:75-82.
- Chirico W., Brown R. 1986. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei*. Eur.J. Biochem 165:333-341.
- Cifuentes A., Rojas D. 2005. Inmovilización de Lipasa *Candida rugosa* en Soporte de Quitosano. Universidad Nacional de Colombia.
- Correa T. 2008. Estudio Exploratorio de la Producción de Etanol en Chile a partir de Residuos Forestales. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Industrial.
- Cuervo L., Folch J.L., Quiroz R.E. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de bioetanol. Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM. (Instituto de Biotecnología), México. Vol. 13 No. 3.
- Davies G., Herissat B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure, Volume 3, Issue 9, September 1995, Pages 853–859.
- Dutta R. 2008. Fundamentals of Biochemical Engineering. ISBN 978-3-540-779fYJ-I Springer Berlin Heidelberg New York.
- Fajardo-Ochoa R., Osuna-Castro J., Velázquez-Mendoza C., Escalante-Minakata P., Ibarra-Junquera V., 2011. Inmovilización de Células y Enzimas. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. Volumen 3, No. 6.
- Foresti M.L., Ferreira M.L. 2007. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. Enzyme and Microbial Technology 40: 769-777.
- Gómez E., Ríos L., Peña J. 2012. Biocombustibles Madera, un Potencial Material Lignocelulósico para la Producción de Biocombustibles en Colombia. Información Tecnológica Vol. 23(6), 73-86.

- Hayworth D. 2013. Chemistry of Crosslinking. Recuperado de <http://www.piercenet.com/method/chemistry-crosslinking>
- Hernández G., Martín J.A., Mata Y., Martín R., Terron M.C., Carbajo J.M., Santos S., Eugenio M.E., Villar J.C., González A.E. 2009. Tratamientos combinados de la biomasa forestal para la obtención de bioethanol. 5ºcongreso Forestal Español. Capítulo 2.
- Hicks J. 2001. Bioquímica. Editorial Mcraw-Hill Interamericana. p 91.
- Illanes A. 2008. Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications. Ed. Springer. School of Biochemical Engineering. Chapter 3. Valparaíso, Chile
- Jeng W. Y., Wang N. Ch., Lin M., Liaw Y., Chang W. J., Liu Ch., Liang P., Wang A. (2011) Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*.173: 46–56
- Jung Y. R., Shin H. Y., Song Y. S., Kim S. B., Kim S. W. 2012. Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of β -glucosidase with cellobiose and glucose. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University* 18: 702–706
- Kabel M., Van Der Maarel M., Klip G., Voragen A., Schols H. 2005. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering* 93: 56-63.
- Krajewska Barbara. 2003. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 126-139.
- Keogh M., O'Brien F., Daly J. 2010. Substrate stiffness and contractile behaviour modulate the functional maturation of osteoblasts on a collagen–GAG scaffold. *Acta Biomaterialia* 6, p 4305–4313.

- Lárez Velásquez C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.
- López F., Betancor L., Mateo C., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guisán J., Fernández-Lafuente R. 2005. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*. Volume 119, Issue 1, 22. Pages 70–75.
- López-Gallego F. 2006. Desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semisintéticas a partir de cefalosporina C. Facultad de Ciencias Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. p 156.
- Manzini, F., Macías G. 2004. Nuevas energías renovables; una alternativa energética sustentable para Mexico (análisis y propuesta).
- Martínez C., Balcázar E., Datán E., Folch J. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Volumen 50 pp 119-131.
- Pasini S., Takara E., Masuelli M., Acosta A., Ochoa N. A., Marchese J. 2010. Modificación y caracterización de membranas de diferente composición de Alginato-Carragenato mediante entrecruzamiento con Glutaraldehído. IBEROMET XI, X CONAMET/SAM.
- Peniche H., C. Peniche, A. de la Campa, S. Díaz. 2002. Preparación y caracterización de micro-esferas magnéticas de poliestireno. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 3: 15-35.
- Peña A. 1988. Bioquímica, Área Química. Edición 2, Editorial Limusa Pagina: 141.
- Powell H., Boyce S. 2006. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials* 27, p 5821–5827.

- Reshmi R., Sugunan S. 2013. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 85– 86 (2013) 111– 118.
- Ríos E., Solorza O., Poggi-Varaldo H. 2010. Energías Renovables Biologicas – Hidrogeno - Pilas de combustible- II. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Rodríguez L. 1991. Hidrólisis de celobiosa con β -Glucosidasa inmovilizada. Memoria Doctorado en Ciencias Químicas. Madrid, España. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid. 276 p.
- Romo S., Ramírez H.L., Arévalo M., Úbeda J. 2011. Immobilization of cellulase and xylanase on different supports. *Current Opinion in Biotechnology*. Volume 22, Supplement 1, Pages S82.
- Saval Susana. 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. Instituto de Ingeniería, UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510.
- Singhania R., Patal A., Sukumaran R., Larroche C., Pandey A. 2012 Role and significance of β -glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*. Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, Université Blaise Pascal.
- Silva Rocío. Villanueva. 2010. Producción de microesferas superparamagnéticas de quitosano-hierro para la inmovilización de β -Glucosidasa. Facultad de Ingeniería y Tecnología Ingeniería Civil en Biotecnología. Universidad San Sebastian.
- Schulz A. 1994. *Enzyme Kinetics from diastase to multi-enzyme systems*. Cambridge University Press.
- Taylor K. 2004. *Enzyme Kinetics and Mechanisms*. Kluwer Academic Publishers. Chapter 2: 11-12

- Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook, 2009. Recuperado de: http://www.ie.fishersci.com/components/com_fss/files/TSP_Protein_Handbook.pdf
- Verma M., Chaudhary C., Tsuzuki T., Barrow C., Puri M. 2013. Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 135:2-6.
- Watanabe T., Sato T., Yoshioka S., T. Koshijima, Kuwahara M. 1992. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 209: 651-659.
- Withers S. 2001. Mechanisms of Glycosyl Transferases and Hydrolases. Protein Engineering Network of Centres of Excellence of Canada. Departments of Chemistry and Biochemistry, Canada. Elsevier. 325–337.
- Yan J., Pan G., Li L., Quan G. Ding C., Luo A. 2010. Adsorption, immobilization, and activity of β -glucosidase on different soil colloids. *Journal of Colloid and Interface Science* 348.p 565–570.
- Zheng P., Wang J., Lu C., Xu Y., Sun Z. 2013. Immobilized β -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose. *Process Biochemistry* 48: 683–687
- Zubriene A., S. Budriene, N. Gorochovceva, T. Romaskevicius, E. Matulionis, G. Dienys. 2003. Immobilization of hydrolases onto chitosan microparticles. *Chemija* 14, 226-230.

CAPÍTULO 10 – ANEXOS

Anexo 1.- Preparación de soluciones Buffer y cálculos asociados

A) Preparación de buffer fosfato 50 mM (pH 7,0)

$$g = PM \cdot M \cdot V$$

Donde: (g) gramos, (PM) peso molecular, (M) Molaridad, (V) volumen.

Solución (A): Fosfatode sodio monobásico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 0,1 M (2,0 Litros)

- Disolver 6,90 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, completando 500 mL

Solución (B): Fosfatode sodio dibásico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1 M (2,0 Litros)

- Disolver 26,81 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, completando 1 Litro.

Tomar 390 mL de la solución A y mezclar con 610 mL de la solución B, aforar a 2000 mL en matraz aforado

Tabla 13.- Cantidades de cada compuesto utilizadas para realizar los buffer fosfatos a distintos pH para hacer 1000 mL de buffer

Solución A (mL)	Solución B (mL)	Agua destilada (mL)	pH
467.5	32.5	500	5,7
460	40	500	5,8
450	50	500	5,9
438.5	61.5	500	6,0
425	75	500	6,1
407.5	92.5	500	6,2
387.5	112.5	500	6,3
367.5	132.5	500	6,4
342.5	157.5	500	6,5
312.5	187.5	500	6,6
282.5	217.5	500	6,7
255	245	500	6,8
225	275	500	6,9
195	305	500	7,0
165	335	500	7,1
140	360	500	7,2

B) Preparación de buffer acetato 50 mM (pH 4,0)

$$g = PM \cdot M \cdot V$$

Donde: (g) gramos, (PM) peso molecular, (M) Molaridad, (V) volumen.

Solución (A): Ácido acético 0.1 M (2,0 Litros)

- Disolver 5,775 g de ácido acético glacial en agua destilada hasta completar un volumen de 1000 mL.

Solución (B): Acetato de sodio 0,1 M (2,0 Litros)

- Disolver 2,05 g de acetato de sodio en agua destilada hasta completar un volumen de 250 mL.

Tabla 14.- Cantidades de cada compuesto utilizadas para realizar los buffer acetatos a distintos pH para hacer 1000 mL de buffer.

Solución A (mL)	Solución B (mL)	Agua destilada (mL)	pH
463	37	500	3,6
440	60	500	3,8
410	90	500	4,0
368	132	500	4,2
305	195	500	4,4
255	245	500	4,6
200	300	500	4,8
148	352	500	5,0
105	395	500	5,2
88	412	500	5,4
48	452	500	5,6

C) Preparación de solución de ácido glutámico 50 mM en buffer carbonato 50 mM (pH 10)Cálculos para 100 mL de solución según buffer⁸

- Cantidad Carbonato de sodio Na_2CO_3 $g = 106 \cdot 0,0181 \cdot 0,1 = 0,192$ g
- Cantidad Bicarbonato de sodio NaHCO_3 $g = 84 \cdot 0,0319 \cdot 0,1 = 0,268$ g
- Cantidad de ácido glutámico $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_4(\text{NH}_2)$ $g = 147,1 \cdot 0,05 \cdot 0,1 = 0,736$ g

⁸<http://dbr.csoft.net/chem/bufcalc.php>

Disolver cada uno de los reactivos en un poco de agua destilada carbonato, bicarbonato y ácido glutámico, y luego mezclarlos, Ajustar la solución a pH 10 con NaOH 1 M y luego aforar a 100 mL en matraz aforado.

Anexo 2.- Curvas de calibración proteína método Bradford

Curva de calibración normal (diluida)

Se realizó la medición de proteína utilizando 20 μ L de la reacción con 1 mL de kit de Bradford en la cual las concentraciones de proteína van desde 0,1 hasta 1,0 g/L.

Tabla 15.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de proteína diluida

g/L Proteína	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Blanco	0,000	0,000	0,000
0,100	0,100	0,125	0,116
0,180	0,213	0,225	0,239
0,250	0,323	0,292	0,292
0,500	0,565	0,573	0,566
0,750	0,705	0,738	0,762
1,000	0,859	0,913	0,921

Curva de calibración sensible (concentrada)

Se realizó la medición utilizando 200 μ L de la reacción con 1 mL de kit de Bradford en la cual las concentraciones de proteína van desde 0,01 hasta 0,10 g/L.

Tabla 16.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de proteína concentrada

g/L Proteína	Absorbancia 1	Absorbancia 2
0,01	0,122	0,137
0,02	0,231	0,218
0,05	0,524	0,526
0,10	0,813	0,810

La curva de calibrado de las proteínas es polinómica y no lineal, como se puede observar en la Figura 44.

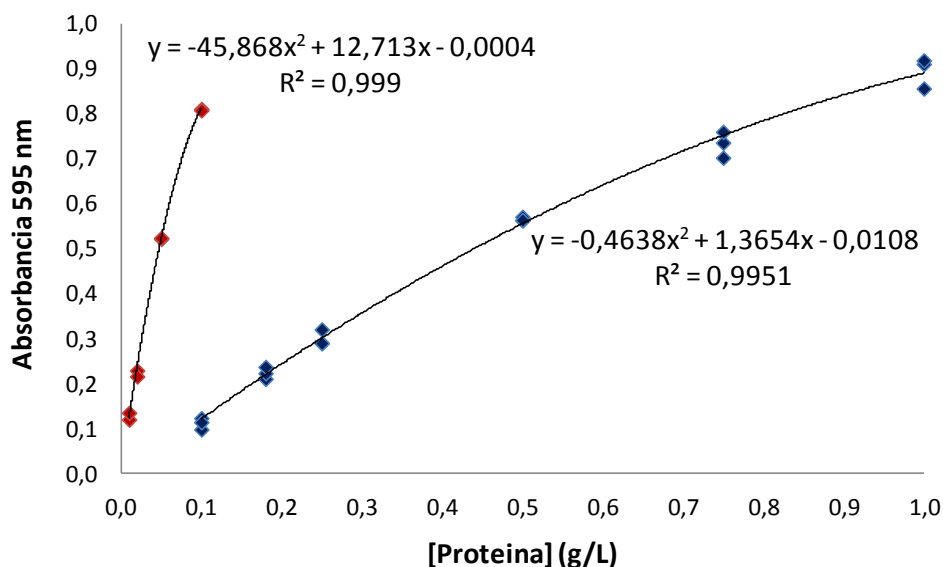


Figura 44.- Curvas de calibración de proteína por método Bradford. Donde: ◆Curva de calibración normal, ◆Curva de calibración sensible.

Se realizaron dos curvas, una en la que se utiliza proteína hasta 1 g/L que es para ensayos donde la proteína se encuentra muy concentrada y una curva más sensible que detecta concentraciones más pequeñas de proteína.

Al graficar los puntos de la curva normal se obtienen una regresión cuadrática con un R^2 de 0,9951. La ecuación obtenida desde la regresión cuadrática, es decir, la ecuación de la curva de calibrado representada por $y = -0,4638x^2 + 1,3654x + 0,0108$ se interpreta como la ecuación cuadrática $y = ax^2 + bx + c$.

Al graficar los puntos de la curva sensible se obtienen una regresión cuadrática con un R^2 de 0,9990. La ecuación obtenida desde la regresión cuadrática, representada por $y = -45,868x^2 + 12,713x + 0,0004$, se interpreta como la ecuación cuadrática $y = ax^2 + bx + c$.

Mediante esta ecuación se podrá determinar la concentración de proteínas presente en cada muestra, sabiendo los valores de absorbancia obtenidos tras medir la reacción del Kit de Bradford (BioRad) a 595 nm.

Anexo 3.- Curvas de calibración glucosa

Curva de calibración normal (diluida) para la enzima libre

Se realizó la inactivación de 20 μL de reacción con 20 μL de NaOH, adicionando posteriormente 1 mL de kit de Glucosa en la cual las concentraciones de glucosa van desde 0,1 hasta 1,5 g/L (Tabla 15)

Tabla 17.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de glucosa diluida de 20 μL de glucosa con 20 μL de NaOH 1M.

Glucosa (g/L)	Absorbancia 1 (500 nm)	Absorbancia 2 (500 nm)
Blanco	0,000	0,000
0,10	0,045	0,047
0,25	0,110	0,114
0,50	0,220	0,214
0,75	0,328	0,318
1,00	0,410	0,430
1,25	0,511	0,519
1,50	0,626	0,617

Curva de calibración sensible (concentrada) para la enzima inmovilizada

Se realizó una curva más sensible para detectar glucosa de concentraciones más pequeñas en la cual se inactivo 40 μL del reactivo con 40 μL de NaOH en 1 mL de kit de Glucosa, en la cual las concentraciones de glucosa van desde 0,01 hasta 0,15 g/L (Tabla 16)

Tabla 18.- Datos para la elaboración de la curva de calibrado de glucosa sensible con 40 μL de glucosa y 40 μL de NaOH 1M.

Glucosa (g/L)	Absorbancia 1 (500 nm)	Absorbancia 2 (500 nm)
0,01	0,006	0,007
0,02	0,016	0,015
0,05	0,047	0,044
0,075	0,061	0,062
0,10	0,08	0,086
0,15	0,123	0,123

A continuación en la Figura 45 se muestra un gráfico con las dos curvas de calibración diluida y concentrada

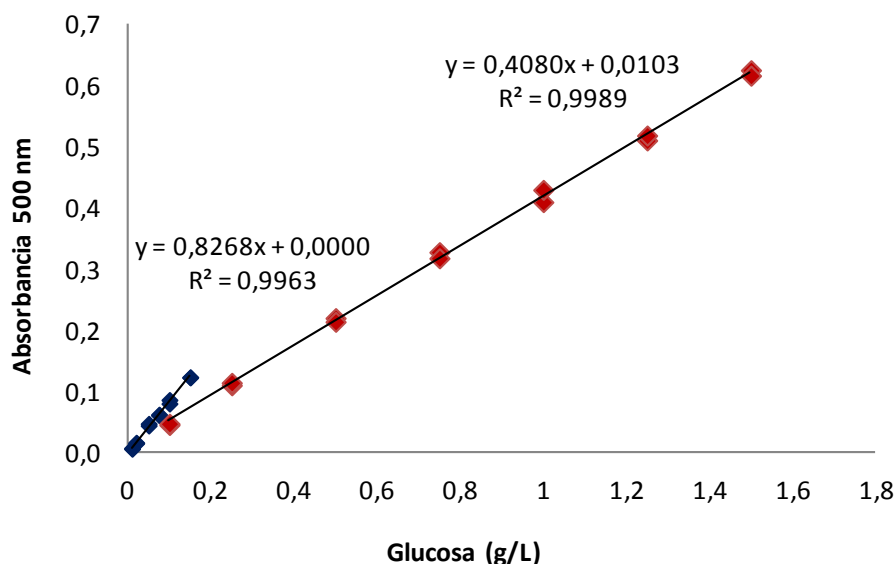


Figura 45.- Curvas de calibración de glucosa. Donde: \blacklozenge Curva de calibración sensible, \blacklozenge Curva de calibración normal

Se recomienda trabajar con valores de absorbancia que no superen los 0,800, ya que no se garantiza la linealidad de la recta más allá de este valor.

Al graficar los puntos de la curva normal se obtienen una regresión lineal con un R^2 de 0.9989, bajo estas condiciones de ensayo se garantiza una linealidad hasta la concentración de glucosa de 2,0 g/L. La ecuación obtenida desde la regresión lineal, es decir, la ecuación de la curva de calibrado representada por $y = 0,408x - 0,0103$ se interpreta como la ecuación de la recta $y = mx + b$, donde m es la pendiente y b el intercepto, cuyos valores obtenidos según la gráfica son 0,408 y 0,0103, respectivamente. Debido a que en la curva no se alcanza a visualizar valores más pequeños de absorbancia, se realizó una curva sensible que fluctúa entre valores de 0,001 a 0,15 g/L de glucosa, en la cual al graficar los puntos de la curva normal se obtiene una regresión lineal con un R^2 de 0.9963, bajo estas condiciones de ensayo se garantiza una linealidad hasta la concentración de glucosa de 2,0 g/L. La ecuación obtenida desde la regresión lineal, es decir, la ecuación de la curva de calibrado representada por $y = 0,8268 \cdot x - 0,000$ se interpreta como la ecuación de la recta $y = mx + b$, donde m es la pendiente y b el intercepto, cuyos valores obtenidos según la gráfica son, 0,8268 y 0,00002, respectivamente.

Anexo 4.- Proteína del preparado enzimático

Se realizaron distintas diluciones del preparado enzimático para determinar su concentración, esta se determinó mediante su absorbancia por método de Bradford. El promedio de las concentraciones del preparado enzimático es de 35,0 g/L con una desviación de 0,9 g/L.

Tabla 19.- Concentración de proteína en el preparado enzimático Novozyme 188

Dilucion Proteína mL <small>novozyme</small> / mL <small>buffer fosfato</small>	Absorbancia	[Proteína] g/L
0,01	0,421	36,0
0,01	0,397	33,7
0,01	0,424	36,3
0,02	0,703	34,2
0,02	0,709	34,6
0,02	0,686	33,0
0,025	0,834	36,0
0,025	0,839	36,4
0,025	0,825	35,3

Anexo 5.- Determinación del tiempo de reacción para la enzima libre

Se estableció el tiempo con el cual realizar los ensayos de hidrólisis de la enzima libre que mejor se adecue a la producción de glucosa a partir de celobiosa en el cual se mantenga una correlación lineal entre el tiempo y glucosa producida (Figura 46). Este ensayo se realizó a una temperatura de 40 °C y pH 4,0.

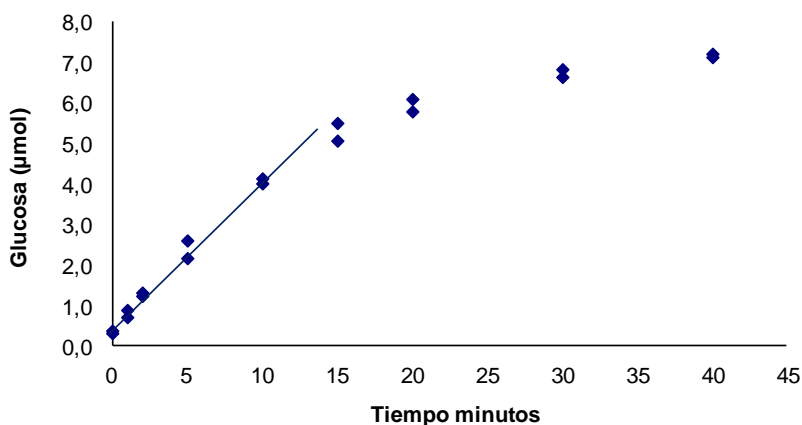


Figura 46.- Determinación del tiempo de reacción ($d[P]/dt$) para la enzima libre

Para los estudios de la actividad enzimática, se estableció que trabajar con un tiempo de contacto de la enzima con el sustrato de 10 minutos, ya que con este tiempo se mantiene una relación lineal en la liberación de glucosa versus tiempo.

Anexo 6.- Inactivación de la enzima

Para determinar la eficiencia de la inactivación en la hidrólisis enzimática por cambio brusco de pH, se realizaron ensayos con distintas concentraciones de NaOH los cuales se muestran en el siguiente grafico Figura 47.

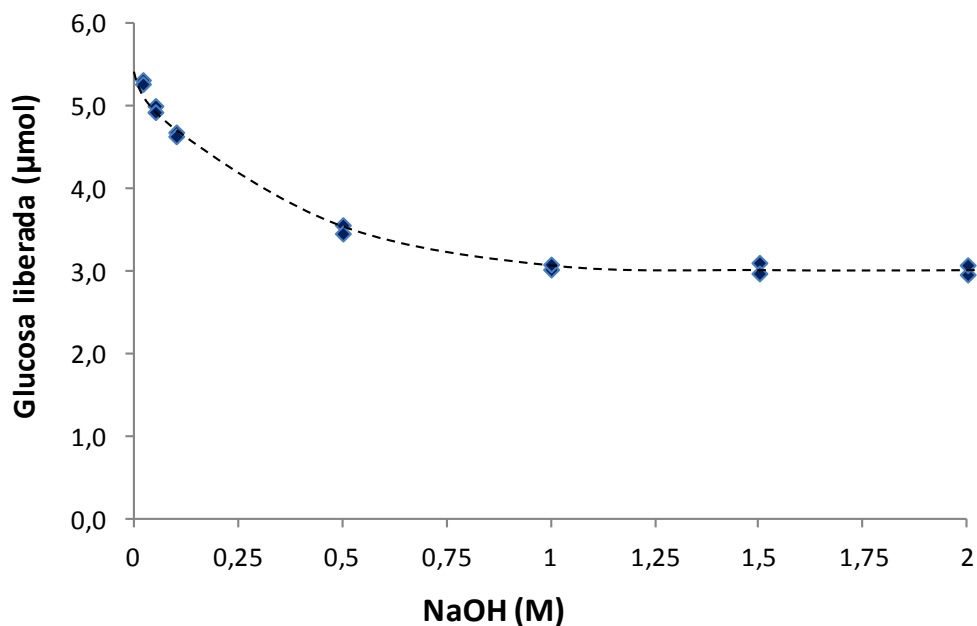


Figura 47.- Eficiencia del NaOH en la inhibición de la enzima a una proporción de 1:1 entre la reacción y el hidróxido, utilizando concentraciones de NaOH de 0,02, 0,05, 0,1 0,5 1, 1,5 y 2,0 M.

Anexo 7.- Enzima necesaria para la hidrólisis de celobiosa

En la Tabla 20 se muestra la glucosa producida al hacer reaccionar diferentes concentraciones de Novozyme 188 con 1,9 g/L de celobiosa en 10 minutos.

Tabla 20.- Glucosa producida al hacer reaccionar distintas concentraciones de enzima con una concentración fija de sustrato de celobiosa de 1,9 g/L

Dilución m _{Novozyme 188} /mL _{buffer}	Novozyme (µg)	Glucosa producida (µmol)			Promedio Glucosa (µmol)
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	
0,000002	0,04	0,039	0,059	0,052	0,050
0,000010	0,18	0,189	0,155	0,127	0,157
0,000020	0,35	0,189	0,257	0,209	0,218
0,000029	0,50	0,311	0,386	0,332	0,343
0,000040	0,70	0,379	0,475	0,454	0,436
0,000080	1,40	0,835	0,672	0,747	0,751
0,000143	2,50	1,169	1,087	1,251	1,169
0,000200	3,50	1,652	1,394	1,462	1,503
0,000286	5,00	2,163	2,034	1,972	2,056
0,000333	5,83	2,313	2,422	2,524	2,419
0,000400	7,00	2,680	2,749	2,932	2,787
0,000420	7,35	3,055	2,912	3,034	3,000
0,000500	8,75	3,307	3,416	3,348	3,357
0,000613	10,6	3,960	4,022	3,872	3,951
0,001000	17,5	4,594	4,662	4,743	4,666
0,002000	35,0	5,152	5,172	5,329	5,218
0,004000	70,0	5,411	5,540	5,499	5,483
0,006061	106	5,656	5,370	5,581	5,535

Anexo 8.- Cinética enzimática para los diferentes valores de sustrato

Valores de glucosa obtenidos al hacer reaccionar distintas concentraciones de celobiosa en distintos tiempos. Estas mediciones se efectuaron en duplicado. Se determinó el promedio utilizando una concentración fija de enzima de 10,6 µg.

Tabla 21.- Datos de cinética para los diferentes tiempos utilizando distintas concentraciones de sustrato.

[celobiosa] (mM)	0,555			1,168			2,337			2,921		
	Glucosa producida (mM)			Glucosa producida (mM)			Glucosa producida (mM)			Glucosa producida (mM)		
	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	Muestra 1	Muestra 2	Promedio
0	0,107	0,141	0,124	0,235	0,262	0,248	0,316	0,302	0,309	0,391	0,446	0,419
0,17	0,215	0,195	0,205	0,336	0,302	0,319	0,511	0,551	0,531	0,650	0,677	0,664
0,5	0,262	0,302	0,282	0,490	0,490	0,490	0,779	0,840	0,809	0,977	0,936	0,957
1	0,383	0,356	0,369	0,652	0,719	0,685	1,008	1,082	1,045	1,494	1,494	1,494
2	0,531	0,558	0,544	0,920	1,001	0,961	1,505	1,572	1,539	2,121	2,339	2,230
5	0,779	0,867	0,823	1,565	1,478	1,522	2,761	2,681	2,721	3,864	3,714	3,789
10	1,249	1,331	1,290	2,339	2,461	2,400	3,673	3,837	3,755	5,784	6,043	5,913
15	1,426	1,494	1,460	2,897	2,720	2,808	4,926	4,599	4,763	6,546	6,860	6,703
20	1,576	1,631	1,603	3,101	2,938	3,020	5,525	5,198	5,362	7,717	7,295	7,506

[celobiosa] (mM)	4,382			5,55			8,764			11,1		
	Glucosa producida (mM)			Glucosa producida (mM)			Glucosa producida (mM)			Glucosa producida (mM)		
	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	Muestra 1	Muestra 2	Promedio
0	0,459	0,487	0,473	0,487	0,528	0,507	0,705	0,623	0,664	0,718	0,773	0,745
0,17	0,705	0,759	0,732	0,800	0,882	0,841	1,004	0,963	0,984	1,018	1,127	1,072
0,5	1,018	0,936	0,977	1,208	1,304	1,256	1,426	1,603	1,515	1,753	1,590	1,671
1	1,535	1,685	1,610	1,876	1,712	1,794	1,930	2,121	2,025	2,107	2,121	2,114
2	2,747	2,611	2,679	3,183	2,924	3,054	3,237	3,455	3,346	3,401	3,591	3,496
5	5,552	5,403	5,477	5,362	5,525	5,443	6,002	6,301	6,151	6,506	6,328	6,417
10	7,854	8,058	7,956	9,025	8,861	8,943	10,15	10,39	10,27	11,15	10,96	11,05
15	9,324	9,637	9,481	10,81	11,03	10,92	12,61	12,99	12,80	14,55	14,09	14,32
20	10,41	10,20	10,30	12,43	12,14	12,29	14,69	14,32	14,51	16,09	15,77	15,93

A continuación se presentan los gráficos realizados para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima comercial Novozyme 188 (K_M y V_{max}).

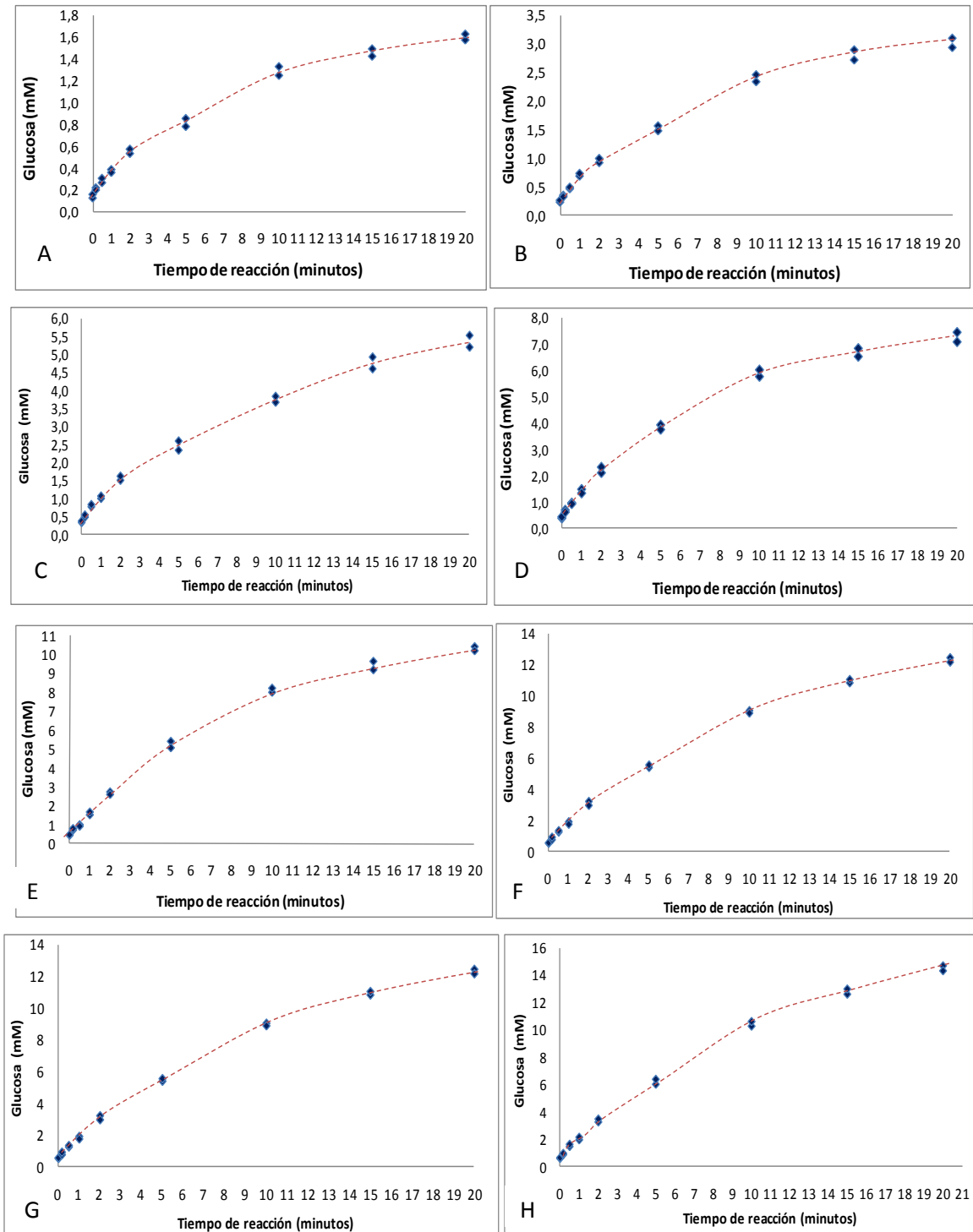


Figura 48.- Gráficos de glucosa producida en función del tiempo utilizando una concentración fija de enzima a distintas concentraciones de celobiosa: A) 0,19 g/L, B) 0,38 g/L, C) 0,76 g/L, D) 1,0 g/L, E) 1,52 g/L, F) 1,9 g/L, G) 3,0 g/L, H) 3,8 g/L.

Anexo 9.- Determinación de las constantes cinéticas

A cada uno de los gráficos cinéticos mencionados anteriormente se les cálculo la pendiente para así obtener la velocidad ($\text{mM}_{\text{glucosa}}/\text{minuto}$) por cada concentración de celobiosa (mM). Esta fue calculada mediante la correlación lineal de periodos de tiempo que tienden al inicio debido a que a mayor tiempo la enzima la liberación de glucosa se mantuvo constante.

La determinación del K_M y V_{max} se realizó mediante cálculos en base a transformaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando la representación de Lineweaver-Burk con la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración (de ahí que también la representación sea conocida como de dobles inversos), así se obtiene una recta cuya intersección con el eje X es $-1/K_M$ y con el eje Y es $1/V_{\text{max}}$, siendo la pendiente K_M/V_{max} . De esta forma, y una vez hecha la representación, se pudo extrapolar el valor de X para $Y=0$, o el de Y, cuando $X=0$, y obtener haciendo el inverso de los valores (y teniendo en cuenta el signo) el valor de K_M y V_{max} .

Tabla 22.- Linealización de los datos cinéticos obtenidos experimentalmente mediante Lineweaver-Burk. Donde: ([S]) sustrato de celobiosa utilizado en cada análisis, (V_i) Velocidad experimental, ($1/V_i$) Inversa de la velocidad, ($1/[S]$) Inversa de la concentración [S].

Determinación experimental			Determinación de la inversa por Lineweaver-Burk	
[Celobiosa] (g/L)	[celobiosa] (mM)	v_i (mM/min)	$1/[\text{Celobiosa}]$ (mM)	$1/V$
0,19	0,56	0,199	1,802	5,025
0,38	1,11	0,358	0,901	2,796
0,76	2,22	0,532	0,450	1,880
1,00	2,92	0,637	0,342	1,570
1,52	4,44	0,749	0,225	1,335
1,90	5,55	0,816	0,180	1,225
3,00	8,76	0,935	0,114	1,069
3,80	11,1	0,999	0,090	1,001

La Figura 49 representa la gráfica de los valores obtenidos al realizar la inversa de la concentración de sustrato utilizada y la inversa de la velocidad obtenida en $\text{mM}_{\text{glucosa}}/\text{minuto}$.

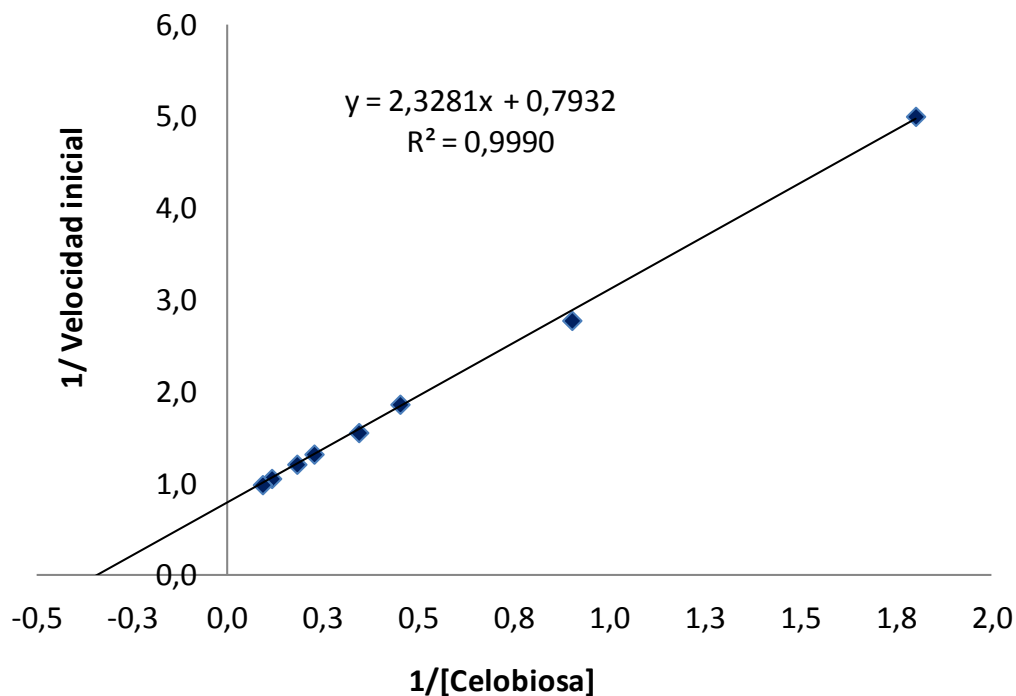


Figura 49.- Linealización de la curva de velocidad inicial experimental por medio de Lineweaver-Burk que representa la inversa de los resultados.

Se compararon los resultados obtenidos en la curva de la cinética enzimática experimental con la cinética de Michaelis-Menten, cuyas diferencias se presentan en la Tabla 23.

Los resultados obtenidos por esta ecuación fueron los siguientes:

- Intercepto eje y: 0,793
- Intercepto eje x: -0,341
- V_{\max} (1/intercepto eje y): 1,26
- K_M (1/intercepto eje x): 2,94

Tabla 23.- Comparación de los datos cinéticos obtenidos experimentalmente y valores ajustados por Michaelis-Menten. Donde: (V_i) Velocidad determinada experimentalmente, (V) velocidad ajustada por ecuación de Michaelis-Menten utilizando el K_M y V_{max} determinado por Lineweaver-Burk, $((v-v_i)^2)$ Cuadrado del error entre la velocidad experimental y la velocidad ajustada de Michaelis-Menten, $((v_{prom.} - v_i)^2)$ cuadrado del error entre la velocidad promedio y la velocidad determinada experimentalmente.

Sustrato	Velocidad experimental	Velocidad ajustada M-M ($v=V_{max} \cdot [S]/(K_M+[S])$)	Cuadrado del error	
[celobiosa](mM)	v_i (mM/min)	v (mM/min)	$(v - v_i)^2$	v (mM/min)
0,56	0,199	0,201	$2,23 \times 10^{-06}$	0,206
1,11	0,356	0,346	$1,36 \times 10^{-04}$	0,087
2,22	0,534	0,543	$1,20 \times 10^{-04}$	0,015
2,92	0,635	0,629	$6,20 \times 10^{-05}$	0,000
4,44	0,750	0,759	$1,01 \times 10^{-04}$	0,009
5,55	0,816	0,825	$6,63 \times 10^{-05}$	0,027
8,76	0,936	0,944	$8,42 \times 10^{-05}$	0,080
11,1	0,994	0,997	$2,16 \times 10^{-06}$	0,119

- La suma de los cuadrados del error fue de $(v-v_i)^2 = 0,000574$
- El coeficiente de correlación ajustado fue de $r^2 = 0,9990$

Debido a que los márgenes de diferencias son muy pequeños la curva experimental de velocidad obtenida (v_i) se ajustó a la cinética de Michaelis-Menten (v).

Anexo 10.- Cálculos asociados a la determinación de microesferas, enzima y linker a utilizar en la inmovilización

Datos microesferas

- Diámetro de las microesferas = $707 \mu\text{m} = 0,707 \text{ mm}$
- Área de las microesferas suponiendo esfera perfecta: πd^2

$$\pi \cdot [0,707]^2 = 1,57 \text{ mm}$$

Datos Enzima

- Diámetro de la enzima = 50 \AA
- Área de la enzima = $2,5 \times 10^{-11} \text{ mm}^2$

- Masa molar aproximada de la enzima = 118 kg/mol

A) Determinación de las microesferas a utilizar en la inmovilización

El volumen de microesferas a utilizar en la inmovilización fue de 250 μL (250mm^3), volumen elegido volumétricamente por medio de tubos de eppendorf.

Número de microesferas en el volumen de 250 μL

$$\begin{aligned} \text{Número microesferas en } 250 \mu\text{l} &= \frac{\text{Volumen total microesferas}}{\text{Volumen 1 microesfera}} \\ &= \frac{250 \text{ mm}^3}{\frac{\pi}{6} \cdot 0,707 \text{ mm}^3} = 1351 \text{ unidades de microesferas} \end{aligned}$$

Superficie total de las microesferas en los 250 μL

Se midió tomando el número de microesferas existentes en este volumen por el área de una microesfera.

$$\text{Área de las microesferas en } 250 \mu\text{L} = n^\circ \text{ de microesferas} \times \text{área 1 microesfera}$$

$$1351 \cdot 1,57 \text{ mm}^2 = 2121 \text{ mm}^2$$

B) Determinación de las proteínas en una monocapa

Número de proteínas totales para cubrir las microesferas se determinó por medio del área de las microesferas

$$\text{Número de proteínas} = \frac{\text{área de las microesferas}}{\text{área proteína}}$$

$$\frac{2121 \text{ mm}^2}{(1,0 \times 10^{-12}) \text{ mm}^2} = 8,49 \times 10^{12} \text{ proteínas}$$

A partir del número de proteínas necesarias para cubrir las microesferas se determinó su cantidad en moles por medio del número elemental de abogadro.

$$\mathbf{Moles\ proteina} = \frac{\mathbf{Número\ Proteinas}}{\mathbf{Número\ Abogadro}}$$

$$\frac{8,49 \times 10^{13} \cdot 10^{14}}{6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}} = 1,409 \times 10^{-10} \text{ moles}$$

Masa de proteínas a utilizar en la inmovilización

$$\mathbf{kg\ proteinas\ en\ 1\ monocapa} = \frac{\mathbf{moles}}{\mathbf{masa\ molar}}$$

$$1,409 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot 118 \left(\frac{\text{kg}}{\text{mol}} \right) = 1,66 \times 10^{-8} \text{ kg}$$

$$\mathbf{mg\ proteina\ en\ 1\ monocapa} = 1,66 \times 10^{-8} \cdot 10 \times 10^6 = 1,66 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

$$\mathbf{mg\ de\ proteína\ en\ 1\ mL\ de\ reacción} = \frac{\mathbf{mg\ proteina}}{\mathbf{mL\ reacción}}$$

$$\frac{0,0166}{2} = 0,0083 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 8,32 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)$$

Concentración de proteína en 1 monocapa

$$\frac{[\text{preparado enzimático}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{[\text{monocamada}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} = \frac{35}{0,0083} = 4216 \left(\frac{\text{mL}}{\text{mL}} \right)$$

$$\mathbf{Dilución\ de\ la\ proteína\ en\ la\ reacción} = \frac{1}{4216} = 2,37 \times 10^{-4} \text{ mL}^{-1}$$

Debido a que con una monocapa de proteínas no se visualizó actividad por medición espectrofotométrica de actividad se determinó realizar con cinco monocapas

C) Determinación de la concentración de proteína para la inmovilizaciónProteínas para la inmovilización

$$\mathbf{Moles\ proteina} = \frac{\mathbf{Número\ Proteinas}}{\mathbf{Número\ Abogadro}} \cdot 5$$

$$\frac{8,49 \times 10^{13} \times 10^{14}}{6,022 \times 10^{23}} \cdot 5 = 7,05 \times 10^{-10} \text{ moles}$$

$$\mathbf{kg\ proteinas\ en\ 5\ monocapa} = \mathbf{moles} \cdot \mathbf{masa\ molar}$$

$$7,05 \times 10^{-10} \text{ moles} \times 118 \left(\frac{\text{kg}}{\text{mol}} \right) = 8,31 \times 10^{-8} \text{ kg}$$

$$\mathbf{mg\ proteina\ en\ 5\ monocapa} = 8,31 \times 10^{-8} \cdot 10 \times 10^6 = 0,0831 \text{ mg}$$

$$\mathbf{mg\ de\ proteina\ en\ 1\ mL\ de\ reaccion} = \frac{\mathbf{mg\ proteina}}{\mathbf{mL\ reaccion}}$$

$$\frac{0,083}{2} = 0,0416 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 41,6 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)$$

$$\frac{[\mathbf{preparado\ enzimatico}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{[\mathbf{monocamada}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} = \frac{35}{0,0416} = 841,8 \left(\frac{\text{mL}}{\text{mL}} \right)$$

$$\mathbf{Dilucion\ de\ la\ proteina\ en\ la\ reaccion} = \frac{1}{841,8} = 0,00118 \text{ mL}^{-1}$$

Esta concentración de 41,6 mg/L de proteína corresponde a cinco monocapas. A partir de este valor se pueden aumentar y disminuir las concentraciones de enzima a utilizar en los ensayos.

Para la determinación de los datos del diseño experimental se utilizaron concentraciones de proteínas aumentando y disminuyendo las monocapas en un valor de 2,5.

- 2,5 monocapas equivalen a 20,8 mg/L de proteínas
- 5,0 monocapas equivalen a 41,6 mg/L de proteínas
- 7,5 monocapas equivalentes a 62,4 mg/L de proteínas
- 10 monocapas equivalen a 83,2 mg/L de proteínas
- 12,5 monocapas equivalen a 103,9 mg/L de proteínas
- 15 monocapas equivalen a 124,7 mg/L de proteínas

D) Determinación de la dilución de la enzima para inmovilizar para el diseño experimental

Para la preparación de las diluciones de enzima en buffer a utilizar en la inmovilización se realizaron los siguientes cálculos

A partir de una concentración de 41,6 mg/L de enzima en buffer se procedió a aumentar o disminuir la cantidad de enzima disminuyendo a la mitad y aumentando al doble las veces que fuese necesario.

Cálculos de determinación de dilución de la enzima en buffer

$$Dilucion\ enzima = \frac{P1}{P2} \cdot 1000$$

Donde:

- Dilución enzima = mL_{proteína}/mL_{reacción}
- P2= concentración de la proteína mg/L
- P1= concentración del preparado enzimático (35 mg/mL).

$$Dilucion\ enzima = \frac{41,6 \left(\frac{mg}{L}\right)}{35,0 \left(\frac{mg}{L}\right)} \cdot 1000 = 0,00119 \left(\frac{mL\ enzima}{mL\ reaccion}\right)$$

$$0,00119 \left(\frac{mL\ enzima}{mL\ reaccion}\right) \cdot 1000 \left(\frac{\mu L}{mL}\right) \cdot 2\ mL = 2,38\ \mu L\ enzima$$

Además como la reacción fue de 2 mL y se utilizó 1 mL de enzima y 1 mL de *linker*, la enzima se concentró al doble obteniendo $2,38 \mu\text{L}_{\text{enzima}}/\text{mL}_{\text{solución}}$.

Como la dilución de la enzima era demasiado pequeña se extrapolo a concentraciones mayores que fueran medibles por el material de laboratorio.

En este caso para una solución de 20 mL

$$\frac{2,38 \mu\text{L enzima} \cdot 20 \text{ mL reaccion}}{1 \text{ mL}} = 47,6 \mu\text{L enzima}$$

Por lo tanto para obtener una concentración de $41,6 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{L}_{\text{reacción}}$ se requiere tomar $47,6 \mu\text{L}$ de enzima en 20 mL de reacción

Para realizar el diseño experimental se eligió como punto central la concentración de $41,6 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{L}_{\text{reacción}}$ y a partir de esta medida se fue disminuyendo y aumentando su concentración utilizando las siguientes concentraciones: $20,8 \text{ mg/L}$, $62,4 \text{ mg/L}$, $83,2 \text{ mg/L}$, $103,9 \text{ mg/L}$ y $124,7 \text{ mg/L}$

Donde:

- Para $20,8 \text{ mg/L}$ se utilizó $23,8 \mu\text{L}$ de enzima en 20 mL de reacción
- Para $62,4 \text{ mg/L}$ se utilizó $71,4 \mu\text{L}$ de enzima en 20 mL de reacción
- Para $83,2 \text{ mg/L}$ se utilizó $95,0 \mu\text{L}$ de enzima en 20 mL de reacción
- Para $103,9 \text{ mg/L}$ se utilizó $118,9 \mu\text{L}$ de enzima en 20 mL de reacción
- Para $124,7 \text{ mg/L}$ se utilizó $142,6 \mu\text{L}$ de enzima en 20 mL de reacción

E) Cálculos para la determinación de concentración de *linker*

A partir de los moles que hay en 5 monocapas de proteína se determinaron los moles de *linker* a utilizar en la inmovilización

Los moles de proteína utilizados fueron $7,05 \times 10^{-10}$. Por lo tanto los moles de *linker* se calcularon a partir de esa cantidad de proteína aumentando las veces que fuera necesario, mediante la multiplicación de los moles de la proteína por las veces en que se quiere aumentar el *linker*.

El aumento se realizó desde la misma cantidad de enzima y *linker* hasta *n* veces el *linker*. La siguiente ecuación muestra la cantidad de *linker* a utilizar en la inmovilización.

$$\text{Linker a utilizar en inmovilización} = \frac{\text{Moles EI} \cdot n \cdot 10^6}{0,002 \text{ L}} = \mu\text{M linker}$$

Donde:

- Moles EI: son los moles de enzima a inmovilizar ($7,05 \times 10^{-10}$)
- *n*: es el número de veces a aumentar la cantidad de *linker*
- L: volumen de reacción en la inmovilización.

$$1 \text{ vez} = \frac{7,05 \times 10^{-10} \cdot 1 \times 10^6}{0,002} = 0,352 \mu\text{M}$$

$$2,5 \text{ veces} = \frac{7,05 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot 2,5 \times 10^6}{0,002} = 0,881 \mu\text{M}$$

$$4 \text{ veces} = \frac{7,05 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot 4 \times 10^6}{0,002} = 1,41 \mu\text{M}$$

Anexo 11.- Determinación del tiempo de reacción para la inmovilización

Para determinar la mejor forma de medir la actividad de la enzima inmovilizada se realizaron ensayos de glucosa liberada en la inmovilización a distintos tiempos, utilizando las mismas condiciones de temperatura y pH para cada ensayo, con una concentración fija de enzima. Los resultados de la medición se presentan en la Figura 50.

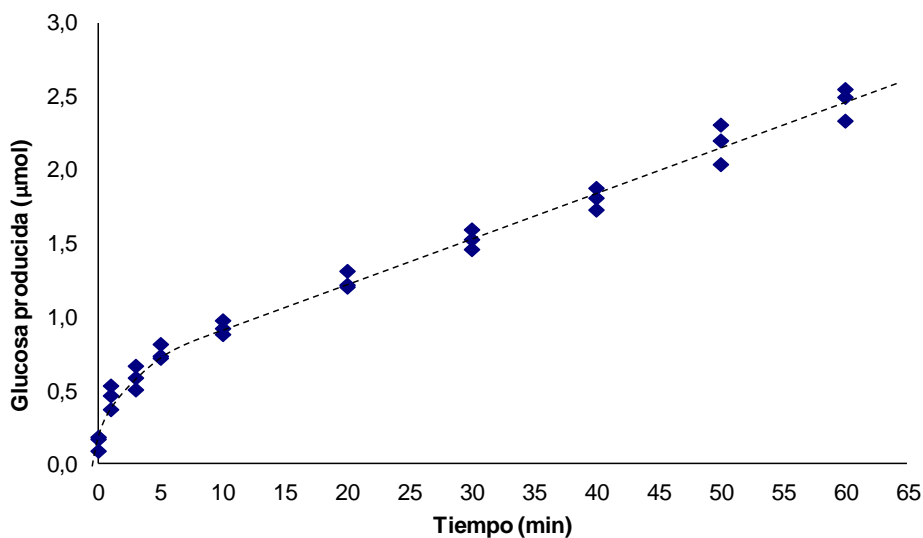


Figura 50.-Determinación del tiempo de reacción para la enzima inmovilizada

Se observó que a tiempo cero ya existe producción de glucosa, además entre 0 y 5 minutos hubo una subida abrupta de glucosa y después de los 10 minutos la generación de la glucosa es de forma lineal, por lo tanto para los ensayos de inmovilización enzimática se estableció realizar mediciones de actividad calculando la pendiente entre 10 y 30 minutos ($d[P]/dt$).

Anexo 12.- Cálculos asociados a la determinación de proteína adsorbida por las microesferas

Se determinó la proteína adsorbida por las microesferas utilizando métodos de Bradford y método espectrofotométrico 280 nm, para ambos *linker*, con y sin el pretratamiento de ácido glutámico utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Proteína adsorbida por las microesferas} = \frac{[PI] - [PS]}{[PI]} \cdot 100$$

Donde:

- PI: Proteína inicial (mg/L)
- PS: Proteína del sobrenadante (mg/L)

A) Proteína adsorbida en la inmovilización utilizando *linker* EDC-NHS**Tabla 24.-** Proteína adsorbida por Método Bradford con pretratamiento con *linker* EDC-NHS.

[Proteína inicial] (mg/L)	[Proteína sobrenadante] (mg/L)	% Adsorbida
41,1	30,1	26,9
41,1	30,1	26,7
41,1	32,5	20,9
41,1	31,0	24,7
41,1	32,8	20,2
41,1	32,0	22,1

- Promedio porcentaje proteína adsorbida 23,6%

Tabla 25.- Proteína adsorbida por Método Bradford sin pretratamiento con *linker* EDC-NHS.

[Proteína libre] (mg/L)	[Proteína sobrenadante] (mg/L)	% Adsorbida
33,8	24,8	26,7
31,8	24,8	21,8
33,8	27,7	18,1
34,8	27,5	21
32,8	27,5	16,2
33,3	27	18,9
31,6	25,2	20,3

- Promedio porcentaje proteína adsorbida 20,4%

B) Proteína adsorbida en la inmovilización utilizando *linker* Glutaraldehído**Tabla 26.-** Proteína adsorbida por Método Bradford con pretratamiento con *linker* Glutaraldehído.

[Proteína] inicial (mg/L)	[Proteína sobrenadante] (mg/L)	% Adsorbida
31,8	19,8	37,7
32,1	20,6	35,8
32,1	16,4	48,9
32,3	23,6	26,9
33,0	22,3	32,4
32,2	18,5	42,5
34,9	18,9	45,8

- Promedio porcentaje proteína adsorbida 38,6%

Tabla 27.- Proteína adsorbida por Método Bradford sin pretratamiento con *linker* Glutaraldehído

[Proteína inicial] (mg/L)	[Proteína sobrenadante] (mg/L)	% Adsorbida
31,8	21,8	31,4
32,1	21,4	33,3
32,1	20,5	36,1
33,1	21,8	34,1
33,0	24,7	25,2
31,8	21,2	33,3
32,1	21,8	32,1

- Promedio porcentaje proteína adsorbida 32,2%

Tabla 28.- Proteína adsorbida por Método Espectrofotométrico con pretratamiento de ácido glutámico con *linker* Glutaraldehído.

[Proteína] inicial (mg/L)	[Proteína sobrenadante] (mg/L)	% Adsorbida
45,6	30,3	33,6
45,6	29,5	35,3
45,6	26,3	42,3
43,0	29,8	30,7
43,4	28,2	35,0
43,4	27,4	36,9
43,4	29,4	32,3

- Promedio porcentaje proteína adsorbida 35,2%

Tabla 29.- Proteína adsorbida por Método Espectrofotométrico sin pretratamiento de ácido glutámico con *linker* Glutaraldehído.

[Proteína] inicial (mg/L)	[Proteína sobrenadante] (mg/L)	% Adsorbida
45,6	41,0	9,20
45,6	42,8	5,60
45,6	39,2	12,4
43,0	25,6	40,5
43,4	29,9	31,1
43,4	25,6	41,0
43,4	28,7	33,9

- Promedio porcentaje proteína adsorbida 25,2%

Anexo 13.- Análisis estadístico para dos muestras de actividad utilizando pretratamiento de ácido glutámico y sin pretratamiento

Tabla 30.- Análisis estadístico *t-Student* para dos muestras de varianzas iguales con un nivel de confianza de 95%.

	Variable 1 Sin tratamiento	Variable 2 con tratamiento
Media	2,44	3,31
Varianza	0,28	0,143
Observaciones	4	4
Varianza agrupada		0,212
Grados de libertad		6
Estadístico t calculado		-2,67
Valor- $P(T \leq t)$ una cola		0,0184
Valor crítico de t (una cola)		1,94

Anexo 14.- Gráficas de los puntos experimentales y residuos para el diseño experimental con cada linker

A) Gráficas con EDC

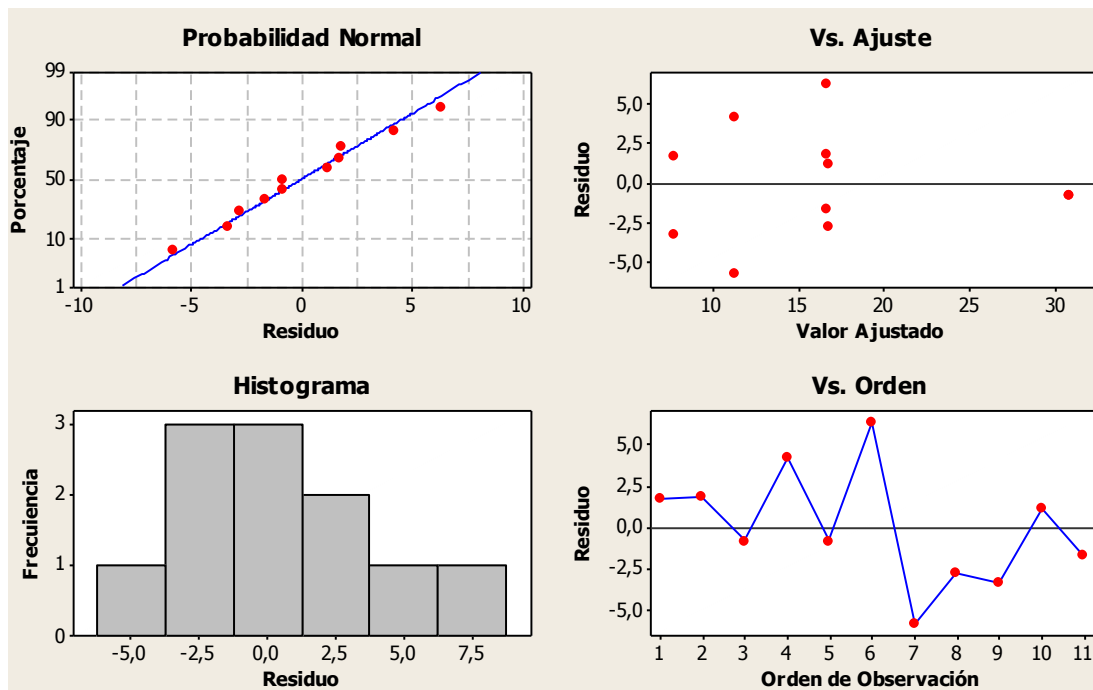


Figura 51.- Gráficas de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) incluyendo interacción con EDC-NHS

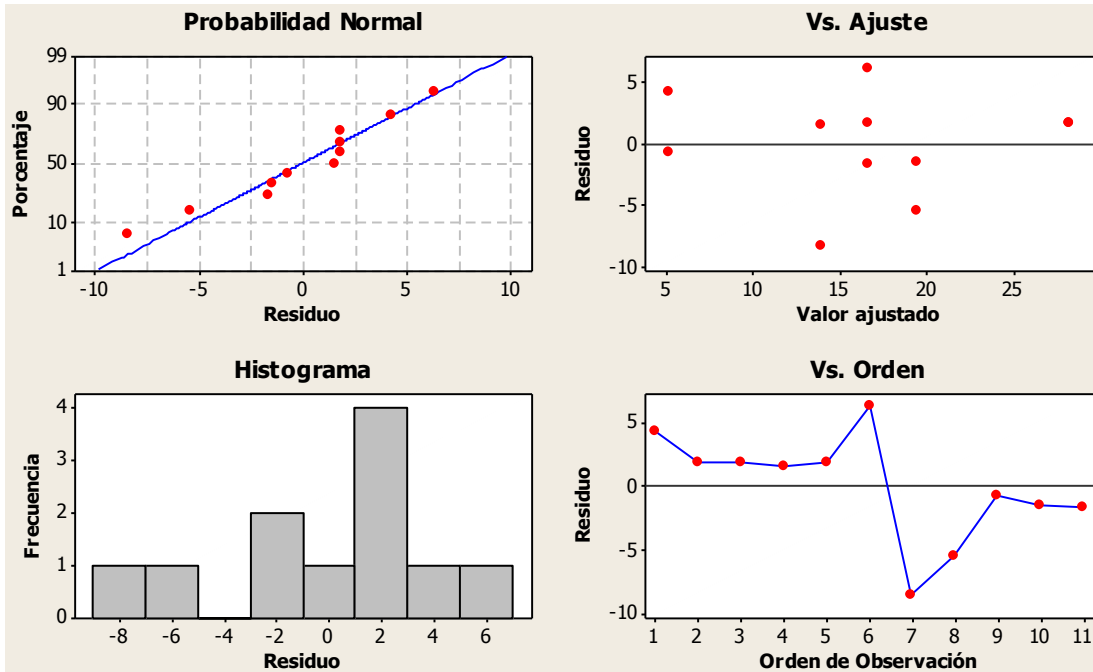


Figura 52.- Gráficas de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) sin interacción, con EDC-NHS.

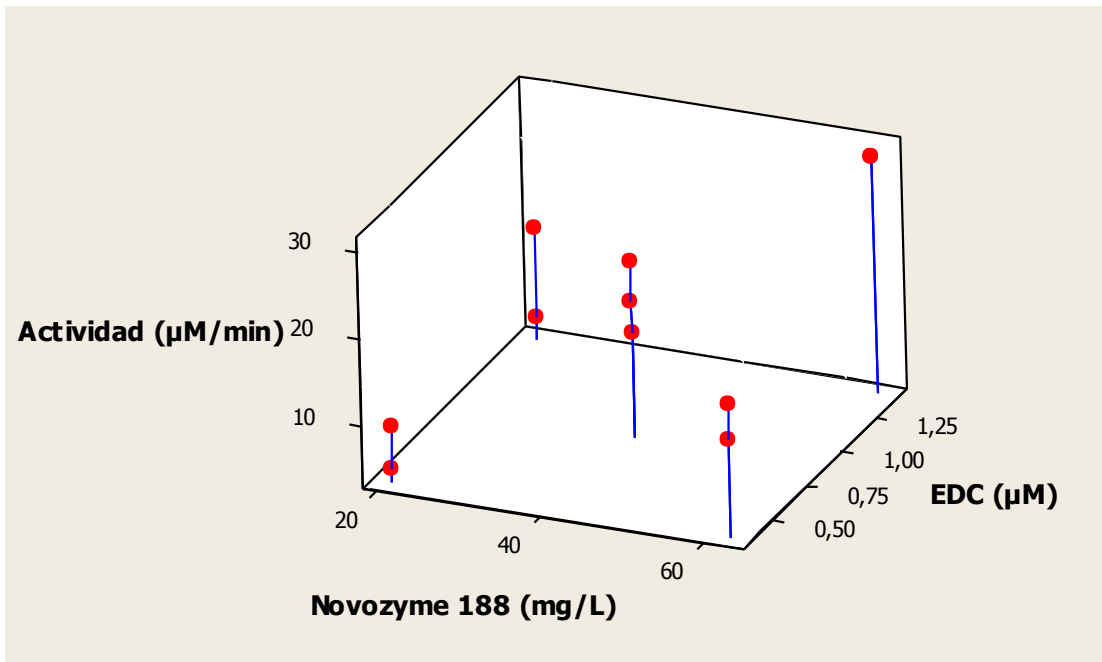


Figura 53.- Puntos experimentales para diseño utilizando EDC-NHS.

B) Gráficas con Glutaraldehído

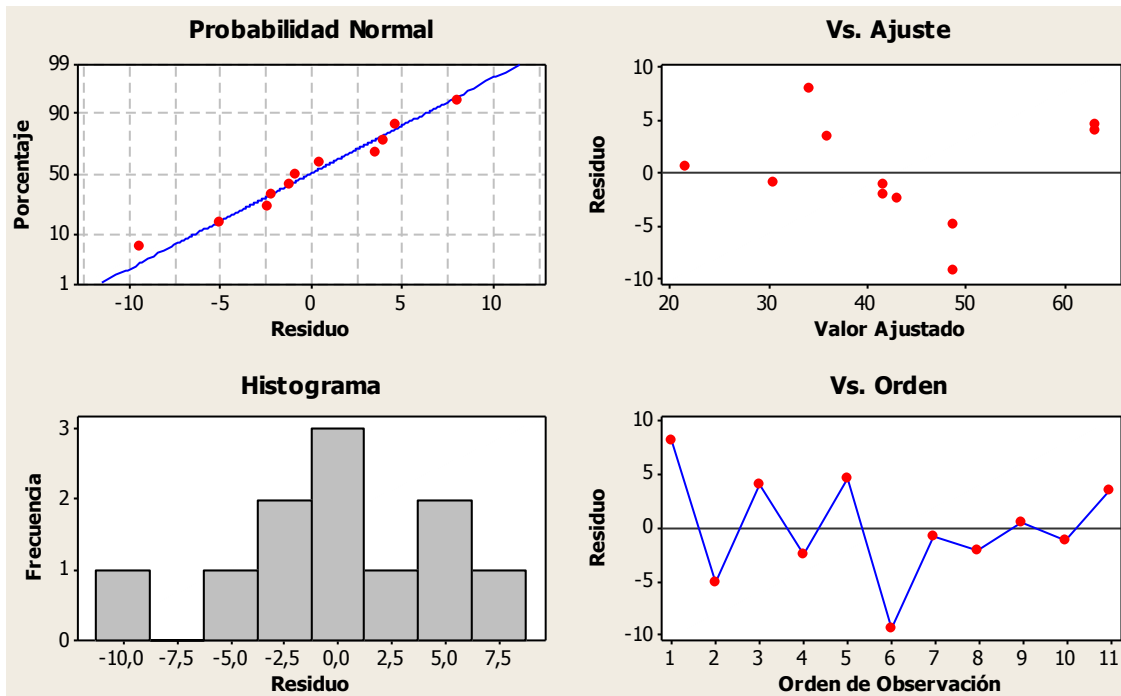


Figura 54.- Gráfica de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) incluyendo interacción con Glutaraldehído.

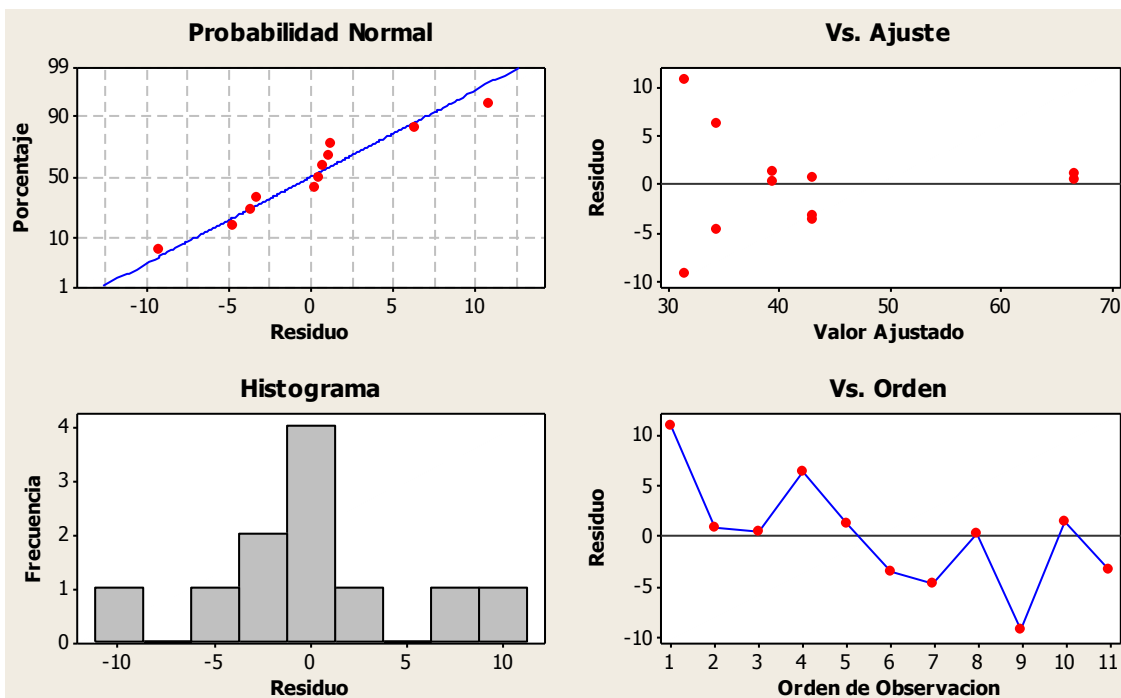


Figura 55.- Gráfica de residuos para Actividad Enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$) sin interacción, con Glutaraldehído.

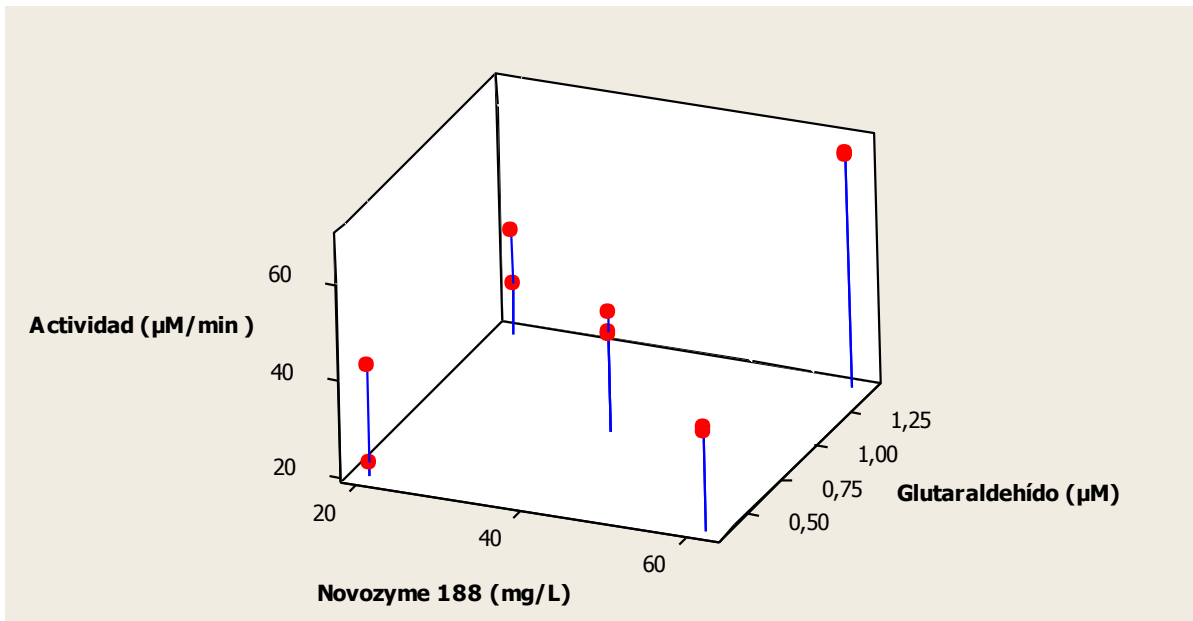


Figura 56.- Puntos experimentales para diseño utilizando Glutaraldehído.

Anexo 15.- Cálculos para la determinación de actividad en las reutilizaciones

La ecuación que se utilizó para determinar la actividad de una enzima libre se detalla a continuación, siendo la actividad específica de $0,03896 \mu\text{mol}/(\mu\text{g}\cdot\text{min})$.

A) Sin linker

En los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada sin *linker* se utilizó $41,6 \text{ mg/L}$ de enzima a inmovilizar

$41,6 \text{ mg/L} = 83,2 \mu\text{g}$ de enzima

$$\text{Actividad EL} = 0,03896 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{g} \cdot \text{min}} \right) \cdot 83,2 \mu\text{g} = 3,24 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$\% \text{ Actividad en 30 reutilizaciones} = \frac{1,80 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)}{3,24 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)} \cdot 100 = 55,6 \%$$

B) Utilizando linker EDC

En los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con *linker* EDC se utilizó 103,9 mg/L de enzima a inmovilizar

103,9 mg/L = 207,8 μg de enzima

$$\text{Actividad EL} = 0,03896 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{g} \cdot \text{min}} \right) \cdot 207,8 \mu\text{g} = 8,10 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$\% \text{ Actividad en 30 reutilizaciones} = \frac{1,49 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)}{8,10 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)} \cdot 100 = 18,5\%$$

C) Utilizando linker Glutaraldehído

En los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada con *linker* Glutaraldehído se utilizó 61,6 mg/L de enzima a inmovilizar, equivalente a 123,2 μg.

$$\text{Actividad EL} = 0,03896 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{g} \cdot \text{min}} \right) \cdot 123,2 \mu\text{g} = 4,80 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$\% \text{ Actividad en 30 ciclos} = \frac{3,13 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)}{4,80 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)} \cdot 100 = 65,3\%$$

$$\% \text{ Actividad 50 ciclos} = \frac{4,41 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)}{4,80 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right)} \cdot 100 = 91,9 \%$$

Anexo 16.- Reutilizaciones de la enzima inmovilizada

Reutilización de la enzima inmovilizada en las microesferas

La Tabla 30 muestra los datos de actividad enzimática en $\mu\text{M}_{\text{glucosa}}/\text{min}$ en los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada utilizando *linker* EDC-NHS, en donde se utilizaron las mejores condiciones obtenidas en el diseño (103,9 mg/L de enzima y 2,47 μM *linker*) en triplicado por cada ensayo y se determinó el promedio de cada reutilización con su intervalo de confianza al 95% de certeza.

La Tabla 31 muestra los valores de actividad enzimática en $\mu\text{M}_{\text{glucosa}}/\text{min}$ en los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada utilizando *linker* Glutaraldehído, en donde se utilizaron las mejores condiciones de actividad (61,6 mg/L de enzima y 1,41 μM *linker*) en triplicado por cada ensayo y se determinó el promedio de cada reuso con su intervalo de confianza al 95% de certeza.

Tabla 31.- Actividad enzimática en los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada utilizando *linker* EDC-NHS.

Reutilizaciones	$\mu\text{M}/\text{min}$	$\mu\text{M}/\text{min}$	$\mu\text{M}/\text{min}$	Promedio	IC
0	37,0	35,3	36,3	36,2	2,10
1	41,0	43,3	39,6	41,3	4,65
2	31,9	35,6	32,9	33,5	4,75
3	33,6	29,6	30,9	31,4	5,10
4	35,3	32,3	33,6	33,7	3,76
5	30,9	29,9	28,2	29,7	3,37
6	29,6	27,2	25,2	27,3	5,43
7	33,9	29,2	29,9	31,0	6,32
8	27,2	30,2	28,6	28,7	3,76
9	24,2	23,9	22,5	23,5	2,21
10	25,5	23,2	21,8	23,5	4,65
11	26,5	26,2	28,2	27,0	2,68
12	31,2	30,9	27,9	30,0	4,60
13	20,8	23,2	24,2	22,7	4,28
14	20,8	21,5	24,2	22,2	4,42
15	24,5	27,2	26,2	26,0	3,37
16	21,8	20,8	19,2	20,6	3,37
17	24,9	20,5	22,5	22,6	5,43
18	21,5	24,5	25,2	23,7	4,89
19	19,2	19,8	21,8	20,3	3,47
20	17,5	18,5	15,5	17,1	3,82
21	19,2	16,5	15,8	17,1	4,42
22	20,2	24,9	21,8	22,3	5,92
23	17,5	21,2	19,2	19,3	4,60
24	17,5	17,8	16,1	17,1	2,21
25	15,5	17,1	16,5	16,4	2,10
26	17,8	21,2	18,8	19,3	4,28
27	18,1	18,8	16,5	17,8	3,01
28	14,4	16,8	16,1	15,8	3,01
29	16,1	14,1	16,8	15,7	3,47
30	15,5	14,1	13,4	14,3	2,55

Tabla 32.- Actividad enzimática en los ciclos de reutilización de la enzima inmovilizada utilizando *linker* Glutaraldehído.

Reutilizaciones	$\mu\text{M}/\text{min}$	$\mu\text{M}/\text{min}$	$\mu\text{M}/\text{min}$	Promedio	IC
0	68,5	66,5	71,9	69,0	6,7
1	80,6	75,3	85,3	80,4	12,5
2	65,8	72,6	77,3	71,9	14,3
3	63,2	70,6	73,2	69,0	13,0
4	63,8	67,9	58,5	63,4	11,7
5	65,2	59,8	59,1	61,4	8,23
6	49,1	53,8	57,8	53,5	10,86
7	59,8	52,4	57,1	56,4	9,29
8	47,7	57,1	53,1	52,6	11,7
9	41,0	43,7	46,4	43,7	6,7
10	53,1	47,7	45,0	48,6	10,2
11	48,4	40,3	45,7	44,8	10,2
12	53,1	55,1	60,5	56,2	9,49
13	49,1	51,7	48,4	49,7	4,42
14	45,7	54,4	51,1	50,4	10,9
15	47,0	44,3	50,4	47,3	7,53
16	59,1	65,2	61,8	62,0	7,53
17	48,4	44,3	41,7	44,8	8,40
18	42,3	38,3	37,0	39,2	6,95
19	38,3	48,4	45,0	43,9	12,7
20	36,3	41,0	37,0	38,1	6,32
21	37,6	43,0	41,0	40,5	6,7
22	34,9	32,3	38,3	35,2	7,53
23	51,1	59,8	55,8	55,5	10,86
24	43,7	41,0	38,3	41,0	6,68
25	47,7	41,0	45,0	44,6	8,40
26	57,1	55,1	51,1	54,4	7,65
27	45,7	41,0	37,6	41,4	10,06
28	41,0	33,6	44,3	39,6	13,7
29	37,0	40,3	33,6	37,0	8,35
30	28,2	32,9	34,9	32,0	8,57
31	34,3	31,6	34,9	33,6	4,42
32	36,3	41,7	45,7	41,2	11,7
33	34,3	30,9	30,2	31,8	5,37
34	38,3	44,3	42,3	41,7	7,65
35	38,3	32,3	33,6	34,7	7,89
36	49,7	47,0	41,0	45,9	11,1
37	37,0	34,3	32,9	34,7	5,10
38	31,6	37,0	39,0	35,8	9,49
39	32,9	35,6	34,3	34,3	3,34
40	26,9	32,9	30,9	30,2	7,65
41	26,9	24,9	34,3	28,7	12,3
42	32,3	26,2	29,6	29,3	7,53
43	22,2	30,2	24,2	25,5	10,42
44	19,5	26,2	21,5	22,4	8,57

45	32,9	41,7	39,0	37,9	11,11
46	20,8	28,2	26,9	25,3	9,78
47	28,2	34,9	30,9	31,4	8,40
48	27,5	20,8	24,2	24,2	8,35
49	26,9	26,2	28,2	27,1	2,55
50	19,5	23,5	25,5	22,8	7,65

Anexo 17.- Análisis estadístico para estabilidad semanal

Tabla 33.- Análisis estadístico para la estabilidad semanal con *linker* EDC-NHS.

Análisis de varianza de un factor	
Valor P	0,0002
Grado de significancia P	***
Promedios estadísticamente diferentes? (P < 0.05)	Si
N° grupos	3
F	48,24
R cuad.	0,9415

Tabla ANOVA	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	2627	4	656,7
Residuos (dentro columnas)	57,34	8	7,167
Total	2684	12	

Análisis de Bonferroni					
Comparación de columnas	Diferencias entre promedios	t	¿Significante? P < 0.05?	Grado P	95% CI de diff
0 vs 1	-24,84	11,36	Si	***	-31.85 a -17.83
1 vs 2	20,44	9,349	Si	***	13.43 a 27.44
2 vs 3	16,77	6,861	Si	***	8.932 a 24.60
3 vs 4	3,275	1,223	No	ns	-5.308 a 11.86

*** muy significativo
 ** medianamente significativo
 * poco significativo
 ns no significativo

Tabla 34.- Análisis estadístico para la estabilidad semanal con *linker* Glutaraldehído.

Análisis de varianza de un factor	
Valor P	P<0.0001
Grado de significancia P	***
Promedios estadísticamente diferentes? (P < 0.05)	Si
Nº grupos	5
F	91,62
R cuad.	0,9786

Tabla ANOVA	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	2627	4	656,7
Residuos (dentro columnas)	57,34	8	7,167
Total	2684	12	

Análisis de Bonferroni					
Comparación de columnas	Diferencias entre promedios	t	¿Significante? P < 0.05?	Grado P	95% CI de diff
0 vs 1	-24,84	11,36	Si	***	-31.85 a -17.83
1 vs 2	20,44	9,349	Si	***	13.43 a 27.44
2 vs 3	16,77	6,861	Si	***	8.932 a 24.60
3 vs 4	3,275	1,223	No	ns	-5.308 a 11.86

*** muy significativo
 ** medianamente significativo
 * poco significativo
 ns no significativo