



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

19492

218
tablas
p. 10

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA
PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE

PROYECTO: DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE
BETAGALACTOSIDASA

Presentado por:

Livio Revel Chion, PH. D.

Lic. Nestor A. Gonzalez

Lic. Marcos Gonzalez

CARACAS, DICIEMBRE, 1990

3/55

INDICE

1. Introducción.....	1
2. Materiales y Métodos.....	3
2.1 Materiales.....	3
2.1.1 Soluciones empleadas.....	3
2.2 Inmovilización por acoplamiento covalente en Nylon.....	5
2.2.1 Preparación del soporte.....	5
2.3 Inmovilización de β -galactosidasa por acoplamiento covalente en vidrio diazotizado.....	5
2.3.1 Preparación del soporte.....	5
2.3.1.1 Tratamiento con ácido sulfúrico.....	5
2.3.1.2 Formación del derivado vidrio-titanio....	6
2.3.1.3 Tratamiento con ácido 5-aminosalicílico..	6
2.3.1.4 Diazotización del soporte.....	6
2.4 Inmovilización de β -galactosidasa en derivado vidrio-titanio usando glutaraldehído.....	7
2.5 Inmovilización de β -galactosidasa en vidrio usando polietilenimina y glutaraldehído.....	8
2.6 Inmovilización de β -galactosidasa en derivado vidrio-titanio empleando polietilenimina y glutaraldehído.....	8
2.7 Preparación y caracterización de la enzima líquida.....	9
2.8 Inmovilización de la enzima comercial.....	9

2.9	Determinación de la actividad lactásica de la enzima...	9
2.10	Determinación de la actividad lactásica de los biocatalizadores.....	10
2.11	Determinación de glucosa por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa.....	11
3	Resultados y Discusión.....	12
3.1	Inmovilización de β -galactosidasa por acoplamiento covalente en vidrio diazotizado.....	12
3.2	Inmovilización de β -galactosidasa en derivado vidrio-titanio usando glutaraldehído.....	16
3.3	Inmovilización de β -galactosidasa en vidrio y derivado vidrio-titanio empleando polietilenimina y glutaraldehído.....	17
4	Bibliografía.....	21

1. INTRODUCCION.

En el presente informe se muestran los resultados obtenidos en la inmovilización de β -galactosidasa en nylon y vidrio, correspondiente a la última etapa del segundo año de contrato.

En dicha experimentación se emplearon como soporte de la enzima partículas de nylon de aproximadamente 1,5 mm de diámetro y vidrio no poroso de 0,32 mm.

A lo largo de la etapa de inmovilización se utilizó la enzima comercial (Lactozym L- 3000 HF-6) suministrada por Novo Industry, Dinamarca.

Al emplear Nylon se obtuvieron 26 U/ gr de sólido, lo cual corresponde al promedio de actividad normalmente obtenida en anteriores experiencias empleando el mismo soporte y metodología de inmovilización. En el caso del vidrio, activado empleando metales de transición (Titanio), y moléculas espaciadoras y reactivos bifuncionales de diferente naturaleza, se obtuvieron resultados prometedores ya que se alcanza hasta 250 U/ gr de actividad en la preparación enzimática inmovilizada.

En la actualidad se están realizando experimentos dirigidos a la determinación de las condiciones óptimas entre la

concentración de enzima y el peso de soporte necesario en la última reacción de inmovilización mencionada.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES.

- Acido sulfúrico 97% de pureza, $d = 1,84$ g/ml (Riedel de Häen).
- Tetracloruro de titanio 99,0% de pureza (Merck).
- Acido clorhídrico 37,0% de pureza, $d = 1,19$ g/ml (Riedel de Häen).
- Acido 5-Aminosalicílico, 98,0% de pureza (SIGMA).
- Nitrito de sodio (SIGMA).
- Glutaraldehído Grado II al 25,0% en solución acuosa (SIGMA).
- Polietilenimina al 50,0% en solución acuosa (SIGMA).
- β -Galactosidasa (Lactozym 3000 L HP-B) suministrado por Novo Industry A/S, Copenhagen, Dinamarca.
- Glucosa oxidasa-peroxidasa (PGO), suministrado por SIGMA.
- o-Dianosidina (SIGMA).
- Vidrio, diámetro de partícula $d = 0,32$ mm.
- Nylon brillante, suministrado por Hilados Flexilon U.A.

2.2 SOLUCIONES EMPLEADAS.

- Solución de glutaraldehído al 18,5% v/v.

- Solución de glutaraldehído al 5,0% V/V.
- Soluciones de polietilenimina al 0,2; 0,5 y 1,0% F/V.
- Solución de Polietilenimina al 10% V/V.
- Buffer para determinación de la actividad de la enzima β -Galactosidasa: fosfato de potasio 0,1 M pH= 6,6 conteniendo 1,0 mM de Magnesio y 0,1 mM de manganeso.
- Buffer utilizado en el lavado y almacenamiento de los biocatalizadores y en la dilución de la preparación enzimática: fosfato de Potasio 0,1 M pH= 6,6 con 0,1 mM de Manganeso.
- Reactivo para lo determinación de glucosa empleando glucosa oxidasa-peroxidasa.
- Buffer acetato de sodio 0,02 M pH= 4,5.

2.2. INMOVILIZACION POR ACOPLAMIENTO COVALENTE EN NYLON

2.2.1 PREPARACION DEL SOPORTE

La activación del nylon se realizó de conformidad con la metodología descrita en los informes de avance Nº1 y Nº2 (1989).

2.3 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA POR ACOPLAMIENTO COVALENTE EN VIDRIO DIAZOTIZADO.

Con la finalidad de estudiar la inmovilización de β -galactosidasa en vidrio se utilizó una modificación de la metodología descrita por Revel-Chlon (1975) en la inmovilización de glucoamilasa sobre partículas de vidrio.

2.3.1 PREPARACION DEL SOPORTE.

2.3.1.1 TRATAMIENTO CON ACIDO SULFURICO.

Se colocan en un vaso de precipitado 80,0 - 100,0 g de vidrio, se le adiciona una solución de ácido sulfúrico (1:2) y se mantiene en reposo por un periodo de 48 horas. Seguidamente, se lava el soporte con abundante agua destilada y se seca en la estufa a una temperatura de 80-90 durante un lapso de 24 horas.

2.3.1.2 FORMACION DEL DERIVADO VIDRIO-TITANIO.

En un balón de reflujo se coloca el peso de vidrio tratado según la sección 2.3.1.1 y se le añaden 150 ml de una solución de tetracloruro de titanio al 15% en ácido clorhídrico al 15% P/V y se somete a reflujo por un periodo de 4 horas. Seguidamente el vidrio se lava con agua destilada y se seca en la estufa a 45 °C durante un periodo de 12 horas.

2.3.1.3 TRATAMIENTO CON ACIDO 5-AMINO SALICILICO.

En un balón de reflujo se coloca el vidrio tratado según la sección 2.3.1.3 y se le adicionan 200 ml de una solución de ácido 5-aminosalicílico al 2,5% en ácido clorhídrico 2 N. Posteriormente, se somete a reflujo durante un periodo de 2 horas. Finalizado este lapso de tiempo el soporte tratado se lava con buffer acetato de sodio 0,02 M pH= 4,5.

2.3.1.4 DIAZOTIZACION DEL SOPORTE.

El vidrio tratado en la sección 2.3.1.3 se diazotiza durante un periodo de 30 minutos empleando 250 ml de una solución de nitrito de sodio 1,0 N en ácido

clorhídrico 6 N (1:2), a una temperatura de 2 °C. Posteriormente se lava el soporte con buffer acetato de sodio 0,02 M pH= 4,5.

2.4 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA EN DERIVADO VIDRIO-TITANIO USANDO GLUTARALDEHIDO.

Con el propósito de evaluar el efecto de la incorporación de una molécula bifuncional como el glutaraldehido en la activación del soporte, se realizó la activación del vidrio según la metodología descrita en la sección 2.3.1.2 y seguidamente se adicionó a 1,0 g de soporte 40,0 ml de una solución de Glutaraldehido al 19,5% V/V. La reacción con el glutaraldehido se llevó a cabo a 30 y 90 °C respectivamente durante un periodo de 30 minutos. Finalizado este lapso de tiempo se lavó el soporte con 50 ml de agua destilada.

Igualmente, 1,0 g de vidrio tratado según la metodología descrita en la sección 2.3.1.2 se activó con glutaraldehido y polietilenimina siguiendo el mismo procedimiento para la activación del nylon descrito en informes previos.

2.5 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA EN VIDRIO USANDO POLIETILENIMINA Y GLUTARALDEHIDO.

Como paso previo a la utilización del vidrio en las experiencias de inmovilización, se realiza el lavado del soporte con una solución de ácido sulfúrico, de conformidad con la sección 2.3.1.1. Una vez seco el soporte, se toman por duplicado, porciones de 1,0 g a las cuales se le adiciona 40,0 ml de polietilenimina al 0,2; 0,5 y 1,0% P/V según la metodología descrita por D'Souza y col. (1986). Posteriormente, a cada peso de soporte tratado se le adicionan 40,0 ml de una solución de glutaraldehido al 5,0% P/V y se incuba a temperatura ambiente durante por un período de 20 minutos. Finalmente, se descarta la fracción líquida, y el sólido se lava tres (3) veces con 50,0 ml de agua destilada.

2.6 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA EN DERIVADO VIDRIO-TITANIO EMPLEANDO POLIETILENIMINA Y GLUTARALDEHIDO.

El procedimiento de inmovilización efectuado en la sección 2.5 se realizó empleando como soporte el derivado vidrio-titanio obtenido según el procedimiento descrito en la sección 2.3.1.2.

2.7 PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LA ENZIMA LIQUIDA.

En la realización de los experimentos se utilizó la enzima comercial Lactozym 3000 L HP-6 en una concentración final de 3,2 mg de proteína/ml (método de Lowry) equivalente a 322,9 Unidades/ml (determinados por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa empleando lactosa como sustrato, sección 2.9).

2.8 INMOVILIZACION DE LA ENZIMA COMERCIAL.

En el desarrollo de los experimentos, la reacción de inmovilización se llevó a cabo adicionando a un gramo de soporte 10 ml de la enzima Lactozym (Ver sección 2.7) y se mantuvo en reposo a 4 °C durante un lapso de 18 horas.

2.9 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTASICA DE LA ENZIMA.

La actividad de la enzima en solución se determinó por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa empleando lactosa como sustrato.

Procedimiento: Se adiciona a un tubo de ensayo 2,9 ml de una solución de lactosa al 2% P/V y se incuba a 40 °C por un período de 3 minutos. Seguidamente se añade 0,1 ml del extracto enzimático apropiadamente diluido y se incuba a 40 °C por un lapso de 4 minutos. Finalizado este tiempo, se detiene la

reacción adicionando 0,1 ml de una solución de hidróxido de sodio 6 N. El contenido de glucosa liberado por la acción de la enzima se determina según la metodología descrita en la sección 2.2.9.1. Se define una unidad de enzima como la cantidad de β -galactosidasa que libera 1 μ mol de glucosa/ ml. minuto.

2.10 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTASICA DE LOS BIOCATALIZADORES.

La determinación de la actividad de la enzima inmovilizada se realizó cuantificando la glucosa generada a partir de una solución de lactosa empleando el método de glucosa oxidasa-peroxidasa. Para ello, se adiciona a un peso de biocatalizador, 10,0 ml de una solución de lactosa al 20% (p/v) y se incuba a 40 $^{\circ}$ C por un período de 4 minutos. Seguidamente, se detiene la reacción adicionando 0,35 ml de una solución de hidróxido de sodio 6 N. Posteriormente, se toma una alícuota de la fracción líquida y se determina el contenido de glucosa por el método de glucosa descrito en la sección 2.11. La fracción sólida que contiene al biocatalizador, se lava con abundante agua destilada y se seca en la estufa a 80 $^{\circ}$ C por un período de 2 horas y se determina su peso. Se define una unidad como la cantidad de enzima que genera 1,0 micromol de glucosa/min.

2.11 DETERMINACION DE GLUCOSA POR EL METODO DE GLUCOSA OXIDASA-PEROXIDASA.

El método enzimático de glucosa oxidasa-peroxidasa involucra la formación de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno a partir de la glucosa por la acción de la enzima glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno generado oxida a la ortodianocidina formando un complejo coloreado que absorbe a 425 nm.

Procedimiento: Se adiciona a un tubo de ensayo 3,0 ml de reactivo "A" y se incuba a 37 °C por un período de 3 minutos. Posteriormente se añade 0,3 ml de la muestra y se incuba a 37 °C por un lapso de 30 minutos. Finalmente se lee la densidad óptica (D.O.) a 425 nm.

REACTIVO A: Se adiciona el contenido de una capsula de PGO y 1,6 ml de solución de ortodanosidina a 100 ml de agua destilada.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA POR ACOPLAMIENTO COVALENTE EN VIDRIO DIAZOTIZADO.

En la tabla Nº 1 y Figura Nº 1 se muestran los resultados obtenidos en la inmovilización de β -galactosidasa en vidrio diazotizado (sección 2.3). Se observa un bajo rendimiento en los valores de actividad de la β -galactosidasa inmovilizada. En efecto, se obtuvo un valor promedio de 1,45 Unidades de enzima inmovilizada por gramo de soporte.

Por otra parte, la actividad promedio de la β -galactosidasa inmovilizada en Nylon alcanzó un valor de 26.9 UI/gramo de soporte, el cual resulta superior al valor de actividad obtenido en el caso de la inmovilización de β -galactosidasa en vidrio diazotizado.

Los resultados obtenidos al emplear Nylon como soporte indican la necesidad de realizar experimentos adicionales que involucren el estudio de una mejor técnica de activación de la superficie del mismo.

A pesar del bajo rendimiento obtenido al inmovilizar β -galactosidasa en vidrio diazotizado se estudió la inmovilización de esta enzima empleando modificaciones en la metodología de

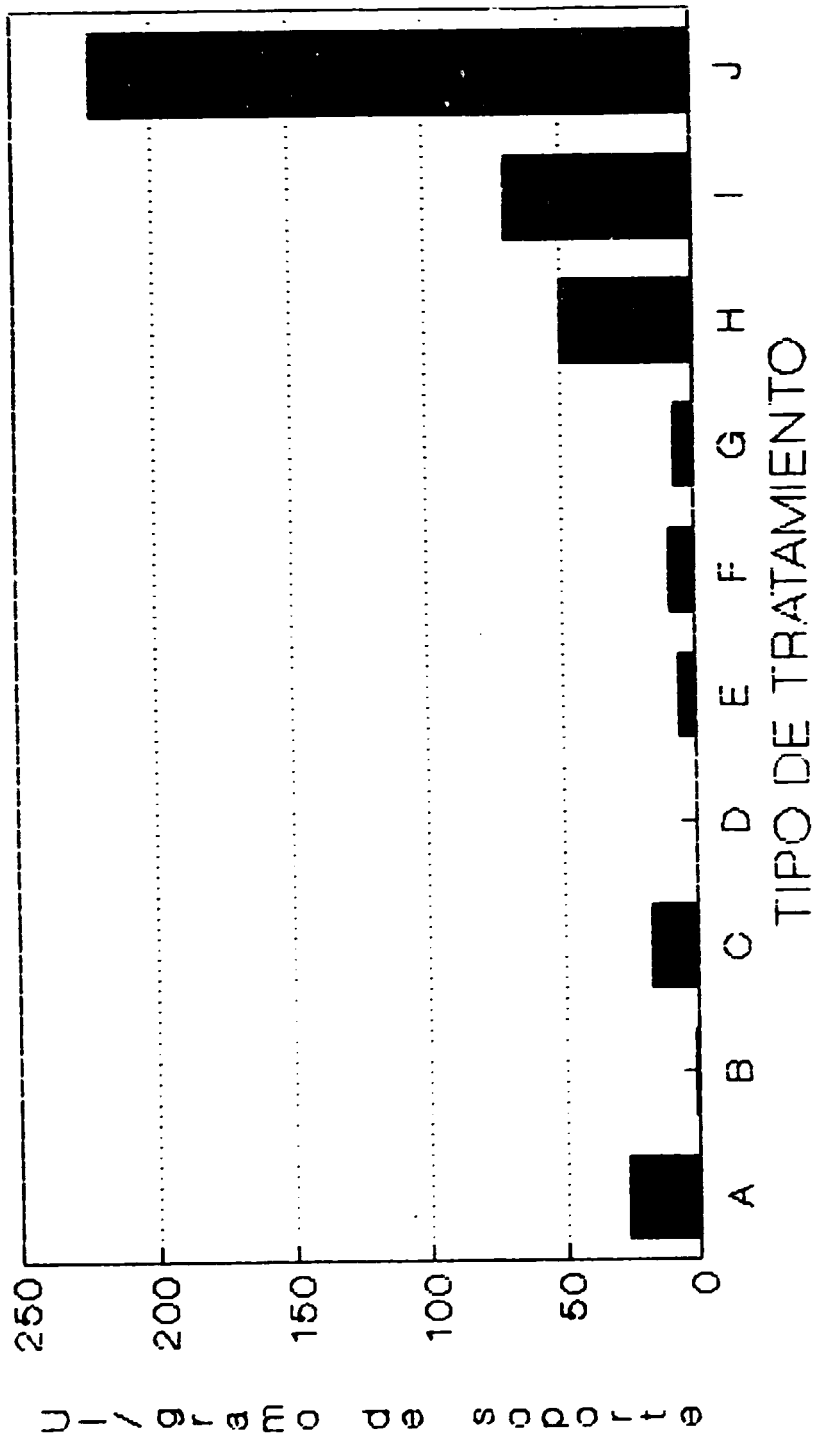
TABLA Nº1. ACTIVIDAD LACTASICA DE LOS BIOCATALIZADORES.

TIPO DE SOPORTE	TRATAMIENTO	UI/gramo de soporte (valor promedio)
NYLON	A	26,90
VIDRIO	B	1,45
	C	17,33
	D	0,07
	E	6,20
	F	9,71
	G	7,50
	H	50,05
	I	70,70
	J	221,79

TRATAMIENTO

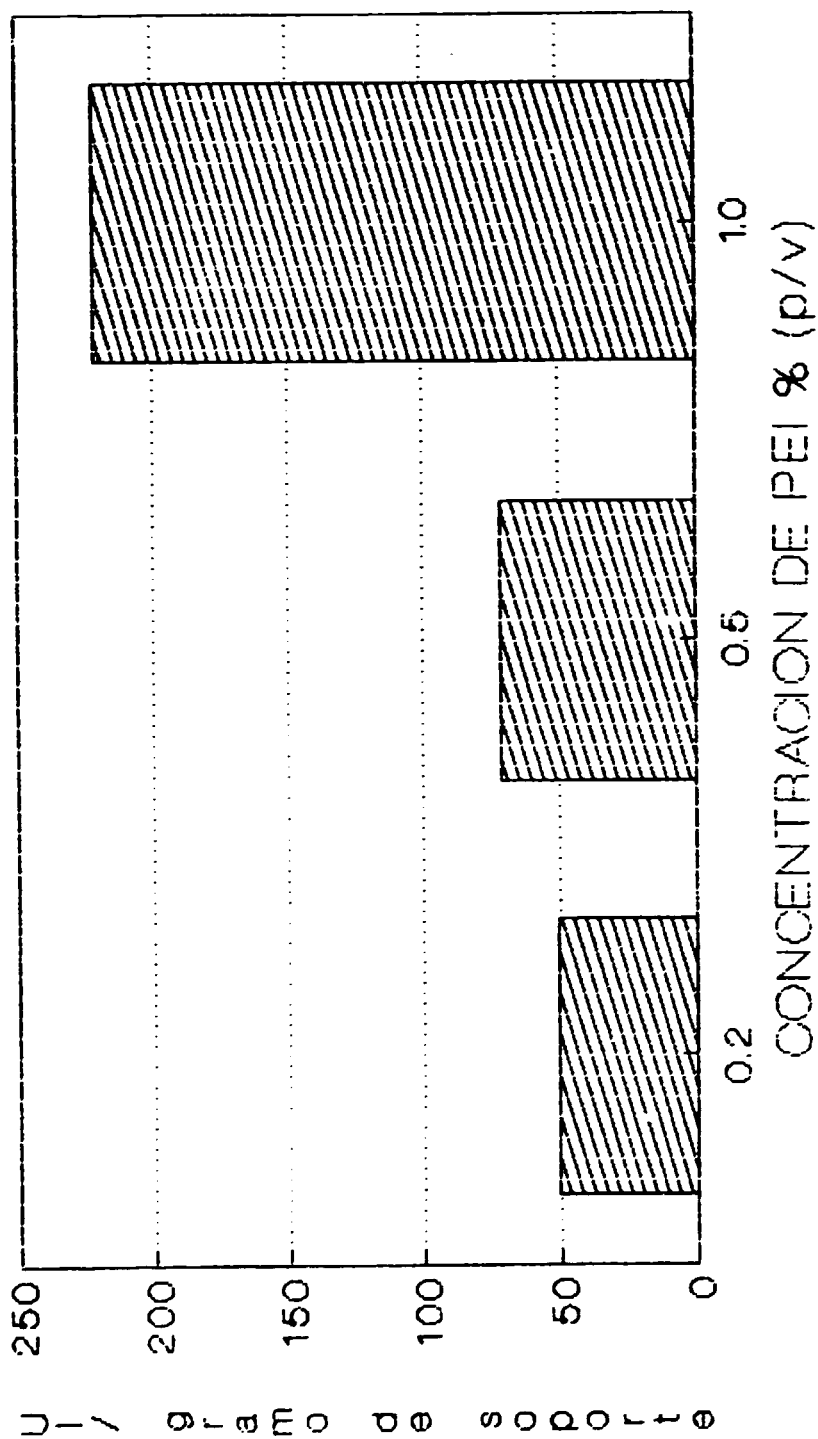
- A: NYLON (metodología descrita en el informe de avance Nº1)
- B: Vidrio diazotizado (metodología descrita en la sección 2.2.2)
- C: Derivado vidrio-titanio tratado con Glutaraldehido al 18,5 % a temperatura ambiente (sección 2.2.3).
- D: Derivado vidrio-titanio tratado con Glutaraldehido al 18,5% a 90º C (sección 2.2.3).
- E: Derivado vidrio-titanio tratado según el proceso de activación aplicado al nylon de conformidad con Informe de Avance Nº1.
- F: Vidrio tratado con PEI al 0,2 % , Glutaraldehido al 5% a temperatura ambiente (sección 2.2.4).
- G: Vidrio tratado con PEI al 1%, Glutaraldehido al 5% a temperatura ambiente (sección 2.2.4)
- H: Derivado vidrio-titanio tratado con 0,2% de PEI, 5% de Glutaraldehido a temperatura ambiente (sección 2.2.5)
- I: Derivado vidrio-titanio tratado con PEI al 0,5 %, 5% de Glutaraldehido a temperatura ambiente.
- J: Derivado vidrio-titanio tratado con PEI al 1%, 5% de Glutaraldehido a temperatura ambiente.

ACTIVIDAD DE LOS BIOCATALIZADORES



■ UI/ gramo
FIGURA Nº1

ACTIVIDAD DE LOS BIOCATALIZADORES



▨ Actividad por gramo

FIGURA Nº 2

activación. Entre las modificaciones realizadas en la activación del soporte se encuentra la utilización de un reactivo bifuncional como el glutaraldehído y de una molécula espacidora como la Polietilenimina (PEI).

3.2 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA EN DERIVADO VIDRIO-TITANIO USANDO GLUTARALDEHIDO

En la Tabla N^o 1 se muestran los resultados obtenidos en la inmovilización de β -galactosidasa en derivado vidrio-titanio utilizando glutaraldehído. Al emplear Glutaraldehído a una concentración de 18.5 % (v/v) a temperatura ambiente para la activación del soporte, se obtuvo un valor promedio de 17,33 UI de enzima inmovilizada por gramo de soporte. Este valor es superior al obtenido sobre vidrio diazotizado (1,45 UI/ gramo de soporte).

Igualmente, la actividad lactásica del derivado vidrio-titanio tratado con glutaraldehído disminuyó desde 17,33 UI/g de soporte hasta 0,07 UI/g de soporte (tratamiento D, Tabla N^o1), al incrementar la temperatura de reacción con glutaraldehído desde 25^oC (temperatura ambiente) hasta 90 ^oC. Ello indica que el tratamiento de este tipo de soporte con la solución concentrada de glutaraldehído a temperatura ambiente resulta favorable en términos de la actividad enzimática del biocatalizador obtenido.

Los resultados obtenidos en el caso de la utilización del derivado vidrio-titanio tratado con glutaraldehído concuerdan con las observaciones realizadas por Revel-Chion (1975) y por Cardozo y col., (1978). Estos investigadores señalan que la solución de cloruro de titanio genera una película de dióxido de titanio en la superficie del vidrio y destacan que numerosos compuestos como el cloruro ferroso (FeCl_2), el ácido 3,5-dinitrosalicílico y el glutaraldehído pueden emplearse como reactivos de acoplamiento en este tipo de soporte.

Por otra parte, la actividad lactásica del derivado vidrio-titanio activado según el tratamiento que se utiliza en el caso del nylon (Tratamiento E, Tabla N^o1) alcanzó el valor de 6,20 UI/g de soporte. Este resultado indica que la utilización de polietilenimina no incrementa la actividad del biocatalizador enzimático, en el caso del soporte previamente tratado con glutaraldehído.

3.3 INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA EN VIDRIO Y DERIVADO VIDRIO-TITANIO EMPLEANDO POLIETILENIMINA Y GLUTARALDEHIDO.

Los resultados obtenidos para la inmovilización de β -galactosidasa en vidrio (tratamientos F y G) y en derivado vidrio-titanio (tratamientos H, I y J) al emplear polietilenimina y glutaraldehído como reactivos de acoplamiento se muestran en la

Tabla Nº1. En esta tabla se muestra una actividad lactásica 9,71 y de 7,50 UI/g para los tratamientos F y G respectivamente. Por otra parte, al emplear el derivado vidrio-titanio se alcanzó un valor máximo de 221,79 UI/g de soporte al utilizar 1,0% de PEI en el proceso de activación.

Al comparar la actividad enzimática de los biocatalizadores obtenidos al emplear vidrio y el derivado vidrio-titanio como soporte en la inmovilización de β -galactosidasa destaca un incremento considerable (26 veces) en la hidrólisis de lactosa en el caso de las esferas de vidrio cubiertas con la película de dióxido de titanio.

Al considerar la alta actividad obtenida (221,79 UI/g de soporte) en la utilización del derivado vidrio-titanio tratado con polietilenimina y glutaraldehído, se hace necesaria la realización de ensayos que involucren el empleo de concentraciones mayores al 1,0% de polietilenimina con la finalidad obtener valores superiores de actividad y estabilidad operacional con este tipo de soporte.

Por otra parte, se realizaron ensayos preliminares en relación con la estabilidad en almacenamiento a 4 °C del biocatalizador obtenido al emplear el derivado vidrio-titanio tratado con polietilenimina y glutaraldehído (tratamiento J.

Tabla Nº1). Los resultados obtenidos demostraron que la actividad enzimática de éste biocatalizador se mantiene estable (214,05 UI/g de soporte) al cabo de una semana de almacenamiento en buffer fosfato de potasio pH= 6,6, perdiendo sólo el 3,1% de su actividad original. Una vez finalizado este lapso de tiempo, se determinó la actividad de la enzima soluble presente en el buffer de almacenamiento. Esto se realizó con el propósito de comprobar la posible liberación o desprendimiento de la enzima inmovilizada en este soporte. Los resultados obtenidos indican que es mínima la cantidad de enzima liberada a la porción líquida. En efecto, la actividad en el buffer de almacenamiento alcanzó el valor de 0,365 UI/ml lo cual representa sólo el 0,17% de la actividad lactásica del total de enzima inmovilizada (214,05 UI/g de soporte).

Al considerar la actividad lactásica de la β -galactosidasa inmovilizada en derivado vidrio-titanio y su estabilidad en almacenamiento, resulta favorable el empleo de este sistema en la hidrólisis de la lactosa.

Entre las ventajas de la inmovilización de β -galactosidasa en derivado vidrio-titanio empleando polietilenimina y glutaraldehído cabe destacar: a) el biocatalizador obtenido presenta una mayor actividad enzimática en comparación con la β -galactosidasa inmovilizada en nylon, b) la utilización de una

metodología de activación sencilla y con la potencial
reutilización del soporte.

4. BIBLIOGRAFIA

- Revel-Chion L. (1975), " Fluidized bed enzyme reactor design including methods of enzyme immobilization", Tesis Doctoral. University of Birmingham, Birmingham-Inglaterra.

- Cardoso, P. J., Chaplin, M. F., Emery, A. N. Kennedy, F. J. y Revel-Chion, L.: (1978), " The Immobilisation of Enzymes on Titanium-activated Inorganic Supports." ; J. appl. Chem. Biotechnol. 28: 775-783.

- D'Sousa, S.; Melo, J.; Desphande, A. y Nadkarni, S.: (1986), "Immobilization of yeast cells by adhering using polyethylenimine", Biotechnol. Lett, 8: 643