



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

19501

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE
PNUD/UNESCO/ONU
RLA/83/003**

Contrato No. 89/86

**Proyecto: Desarrollo tecnológico para la obtención de
una enzima que hidroliza la lactosa de leche y suero**

2° Año de Actividades

País: Chile

Segundo Informe Técnico (Final)

**DESARROLLO TECNOLOGICO PARA LA OBTENCION
DE UNA ENZIMA QUE HIDROLICE LACTOSA DE
LECHE Y SUERO**

**PROYECTO ONUDI DP/RLA/83/003
ACTIVIDAD DP/03/321**

SEXTO INFORME DE AVANCE

**PREPARADO POR : ANDRES ILLANES FRONTAURA
ANDREA RUIZ O'REILLY
M. ELVIRA ZUNIGA HANSEN
ERIKA HERLITZ BURGOS**

PRESENTACION

El sexto informe de avance, segundo correspondiente al segundo año de ejecución del proyecto, contiene los resultados de las siguientes actividades, de acuerdo al calendario contenido en el documento de Términos de Referencia:

B: Evaluación preliminar de catalizadores, empleando nylon como soporte. Fue reportada en el Informe de Avance No 5.

C: Evaluación de la hidrofobicidad de lactasa de K.fragilis. Fue reportada en el Informe de Avance No 5.

D: Optimización del protocolo de inmovilización de lactasa comercial en quitina. Fue reportada en el Informe de Avance No 5. Se reporta en este informe los resultados obtenidos en la inmovilización de lactasa comercial en quitina parcialmente deacetilada (quitosano).

E: Se entrega los resultados obtenidos en la inmovilización de lactasa comercial en nylon empleando protocolos nylon-glutaraldehido-enzima y nylon-glutaraldehido-poli(etil)enimina-glutaraldehido-enzima. Se entrega información relativa a tiempos y temperaturas de activación del nylon por hidrólisis ácida y resultados respecto a tiempo y pH de contactación entre la enzima y el soporte activado. Los resultados obtenidos son insatisfactorios en términos de rendimiento de inmovilización y actividad específica y están muy por debajo de los obtenidos en quitina y sus derivados. No ha resultado posible conseguir un nivel aceptable de activación por hidrólisis, obteniéndose niveles de grupos amino libres por debajo de los recomendables; empleando condiciones de activación más drásticas se produce una notable solubilización del soporte lo que no permite obtener un catalizador adecuado. Ello hace aconsejable discontinuar el trabajo en este tipo de soportes; no obstante se concluirá este trabajo variando razones E/S para el caso del derivado nylon-glutaraldehido-poli(etil)enimina-glutaraldehido-enzima y estudiando la etapa de derivatización del nylon activado con glutaraldehido a pH Ácido (4) en lugar del valor alcalino (9) actualmente empleado.

F: Producción de un extracto enzimático crudo, tomando como base la metodología desarrollada en México. Se entrega resultados obtenidos en la permeabilización celular con alcohol isoamílico y recuperación de la lactasa por difusión. Se estudió el efecto de la razón alcohol isoamílico-células y las cinéticas de permeabilización y difusión. Como método alternativo de recuperación de lactasa se estudió la ruptura mecánica en un molinillo con perlas de vidrio, entregándose los resultados obtenidos y haciendo un análisis comparativo entre las dos alternativas estudiadas. Las características del extracto obtenido hacen indispensable su purificación antes de someterlo a inmovilización. Se presenta en este informe resultados obtenidos en la purificación del extracto crudo enzimático hasta valores de

actividad específica superiores a las 100 ui/mg proteína, que hagan razonable intentar su inmovilización. No habiendo sido posible reproducir la metodología de purificación propuesta por el grupo de trabajo en México, se exploró una metodología alternativa, empleando precipitación fraccional con etanol y sulfato de amonio. Los resultados muestran que es posible producir un preparado parcialmente purificado con actividad específica superior a las 100 ui/mg proteína, con el cual se ha iniciado el estudio de inmovilización en quitina (actividad H).

G: Dada la baja actividad específica del crudo, que oscila entre 7 y 10 ui/mg proteína, no resulta justificable intentar su inmovilización, sin someterlo a un proceso previo de purificación. En efecto, la capacidad de inmovilización de proteína de quitina es del orden de 5 a 10 mg/g (ver figura 12 del quinto informe de avance), lo que unido a las pérdidas de expresión de actividad de la proteína inmovilizada, hace virtualmente imposible satisfacer los requerimientos de actividad específica del catalizador, estimados del orden de 300 ui/g de soporte. De los datos entregados, no resultaría factible obtener ni siquiera 100 ui/g de soporte. Esta actividad ha sido en consecuencia eliminada y reemplazada por el estudio de la inmovilización en el preparado parcialmente purificado. El nivel de purificación se ha establecido de manera de poder razonablemente esperar los niveles de 300 ui/g. El factor mínimo de pureza requerido ha sido estimado en 10, con valores de actividad específica en torno a 150 ui/mg proteína.

H: La transferencia de la información obtenida en la optimización de la inmovilización de la lactasa comercial en quitina (punto D) a la enzima parcialmente purificada dentro del marco del proyecto se encuentra en progreso (la actividad está programada para finalizar en el tercer año). Existe un cierto retraso ocasionado por la dificultad de disponer oportunamente de enzima purificada. En el mes de Junio se recibió un preparado purificado proveniente de México que satisfacía las exigencias de pureza. Desafortunadamente el preparado se recibió en malas condiciones según se informa, lo que impidió desarrollar en esa ocasión las experiencias de inmovilización. Con posterioridad, sin embargo, se iniciaron las pruebas de inmovilización utilizando un preparado parcialmente purificado, producido de acuerdo a la metodología desarrollada que se señala en el punto F. Se reportan los resultados obtenidos hasta el momento, los que, aunque promisorios, deben aún considerarse como preliminares.

I: Se entrega información referente a una caracterización cinética preliminar de la lactasa comercial inmovilizada en quitina y estabilidad operacional del catalizador.

J: El envío de un técnico chileno a México, para entrenamiento en extracción y purificación de la enzima no pudo ser realizado al no haberse dispuesto de los recursos originalmente considerados para la actividad. En efecto, de la cifra de US\$ 2100 considerada, se dedujeron US\$ 1600 correspondientes a los gastos

de la reunión de coordinación realizada en CEIINGEBI, Cuernavaca, México, en 1989. Los restantes US\$ 500 se entregarán en el tercer pago y estarían disponibles. A pesar de que esta cifra es insuficiente, existe la posibilidad del viaje de la investigadora Andrea Ruiz en noviembre a CEIINGEBI, con recursos externos al proyecto, en cuyo caso se utilizaría el recurso de US\$ 500 para financiar una extensión de su estadía que permitiera cumplir con esta actividad.

RESULTADOS

D. OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE INMOVILIZACION DE LACTASA COMERCIAL EN QUITINA.

La actividad ha concluido satisfactoriamente y fue completamente reportada en el Quinto Informe de Avance. Se obtuvo una carga enzimática de 313 UI/g con un rendimiento de inmovilización del 36.4%, que está por sobre los valores establecidos como aceptables.

Se entrega los resultados obtenidos en la inmovilización de lactasa comercial en un derivado de quitina parcialmente deacetilado (quitosano).

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Se empleó quitosano grado práctico de SIGMA Chemical Co.

Síntesis del derivado quitosano-glutaraldehído

Se prepara una solución con el tampón fosfato 0.05 M pH 7 y glutaraldehído al 1% v/v de una solución al 25% v/v. 5 ml de esta solución se contactan con 250 mg de quitosano (75% de grupo amino libre). Se deja agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. Luego se lava en un embudo Buchner hasta que no de reacción con el reactivo de Lowry (el glutaraldehído da reacción positiva con el reactivo de Lowry por lo tanto puede ser utilizado para cuantificar el glutaraldehído unido por diferencia).

Inmovilización de lactasa en quitosano

Se pesan 100 mg de quitosano y se contactan diferentes unidades de actividad lactásica (13, 25 y 50 μ l) y se le agrega 5ml de tampón de trabajo 0.05 M, pH 7. Se deja agitando lentamente durante 16 horas a temperatura de 15°C, luego se filtra y se lava con agua desionizada. En el filtrado y las aguas de lavado se mide actividad lactásica y concentración de proteína por el método de Lowry.

Para la inmovilización de lactasa en quitosano-glutaraldehído, se sigue el mismo procedimiento anterior, utilizando como soporte el derivado quitosano-glutaraldehído.

El ensayo de actividad enzimática para la enzima soluble e inmovilizada es el siguiente.

Método enzimático para medir actividad de lactasa soluble

Se preincuban a 40°C durante 3 minutos, 4.75 ml de lactosa 20 g/l preparada en el tampón de trabajo. A continuación se le agregan 250 μ l de lactasa (1:250), también preparada en el tampón de trabajo y se realiza la reacción enzimática.

Cada minuto se saca alicuotas de 1 ml y se vierten en tubos que contienen NaOH 2N, con el cual se detiene la reacción. Se cuantifica la glucosa liberada según el método de glucostat (kit N° 510-A, Sigma Chemical Co.)

Método para determinación de actividad de la enzima inmovilizada

La medida de la actividad de la enzima inmovilizada se realiza en el interior de una celda de vidrio conectada a un baño termostatzado, donde se ajusta la temperatura en el interior de la celda a 40°C. La concentración de lactosa es de 20 o 200 g/l y se agregan 4.75 ml y 0.25 ml de tampón de trabajo para obtener un volumen final de 5 ml, manteniendo una agitación constante en el ensayo. Se toman alicuotas de 1 ml cada 2 minutos hasta los 6, ya que en este rango de tiempo de ensayo la liberación de glucosa es lineal. El resto del ensayo es semejante al descrito en el punto anterior.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la inmovilización de lactasa comercial en quitosano se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1. INMOVILIZACION DE LACTASA COMERCIAL EN QUITOSANO.

ACTIVIDAD CONTACT. UI/g	ACTIVIDAD INMOVIL UI/g	% INMOVIL. ENZIMA	PROTEINA CONTACT. mg/g	PROTEINA INMOVIL. mg/g	% INMOVIL. PROTEINA
256	61	23.8	0.854	0.6	70.3
505	94	18.6	1.68	1.1	65.5
1010	194	19.2	3.36	0.96	28.5
2019	197	9.8	6.73	0.49	7.3

Los resultados obtenidos, aunque claramente inferiores a los obtenidos con quitina, son interesantes, habiéndose obtenido cargas cercanas a las 200 ui/g, con rendimientos del orden del 20%. No obstante, el costo del quitosano es significativamente mayor que el de la quitina y el catalizador resultante es menos estable por cuanto no utiliza glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Cuando se utilizó glutaraldehído para preparar el derivado quitosano-glutaraldehído, se obtuvo rendimientos no superiores al 2 %, existiendo un alto porcentaje de la actividad que no se expresa. Esto podría atribuirse a inactivación provocada al reaccionar el grupo aldehído libre del glutaraldehído con el grupo -SH del sitio activo de la enzima,

tal como se ha detectado en el caso de la enzima soluble donde se ha medido un tiempo de vida media enzimática de siete minutos en presencia de glutaraldehído. Sin embargo, este fenómeno no se ha observado en el caso de quitina, donde la pérdida de actividad durante el proceso de inmovilización está dentro de márgenes razonables.

Aunque aún se encuentran en progreso experiencias de inmovilización de la enzima comercial con el derivado quitosano-glutaraldehído, puede anticiparse que este tipo de catalizador difícilmente competirá con la enzima inmovilizada en quitina-glutaraldehído, en cuyo caso no se realizarían experiencias de inmovilización de la lactasa purificada en este tipo de derivado.

E. INMOVILIZACION DE LACTASA COMERCIAL EN NYLON.

El nylon ha sido empleado como soporte de referencia y está siendo evaluado tanto en Chile como Venezuela. Los resultados obtenidos en la inmovilización de la enzima comercial son insatisfactorios, como queda de manifiesto en el Apéndice 1 que contiene los resultados reportados por el grupo de trabajo de la Universidad de Concepción, trabajando con derivados de nylon en polvo, empleando glutaraldehído como activador y polietilenimina como agente amplificador.

Aún resta por investigar el efecto de la variable E/S a distintos tiempos de contacto y la activación con glutaraldehído a pH ácido (4). Si no se obtuviera mejoras significativas en el rendimiento y actividad específica del catalizador obtenido, se daría por concluida la inmovilización en nylon, descartándolo como soporte.

F. EXTRACCION DE LACTASA DE KLUYVEROMYCES FRAGILIS.

Se presenta los resultados obtenidos en la extracción de lactasa de células de K. fragilis, haciendo un análisis comparativo entre la extracción por permeabilización con alcohol isoamílico y difusión y la extracción por disrupción mecánica en un molinillo de bolas. La permeabilización con alcohol isoamílico se utiliza como procedimiento de referencia y está basado en el trabajo desarrollado por los investigadores mexicanos, si bien se han modificado algunas condiciones con el propósito de disminuir el consumo de alcohol isoamílico.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Producción de la enzima

Células de Kluyveromyces fragilis obtenidas en cultivo por lotes son cosechadas en fase de crecimiento exponencial, centrifugadas y lavadas, según el procedimiento previamente reportado.

Determinación de actividad de lactasa

Se mide sobre 2.27 mM de ONPG a 40°C y pH 6.6 con tampón fosfato 0.1 M (Mg^{+2} 1 mM, Mn^{+2} 0.1 mM).

Determinación de actividad de lactasa en células

Previo a la reacción con ONPG las células son permeabilizadas con alcohol isoamílico, según el procedimiento descrito más adelante.

Determinación de proteínas

Se miden a través del método propuesto por Lowry y col.

Permeabilización celular

Se contactan las células con alcohol isoamílico en presencia de tampón fosfato 0.1 M, pH 6.6, 0.1 mM $MnCl_2$, 0.5 mM $MgSO_4$ y 1mM de ditioeritritol. La mezcla se agita a 200 rpm a temperatura ambiente.

Extracción de lactasa por molienda

Se efectúa en un molino Biospec refrigerado cargado con perlas de vidrio de 0.5 mm. Se estudian distintas concentraciones celulares. A través del tiempo se mide la actividad y proteínas en el sobrenadante.

Extracción de lactasa por permeabilización :Las células permeabilizadas se someten al procedimiento descrito en la fig.1.

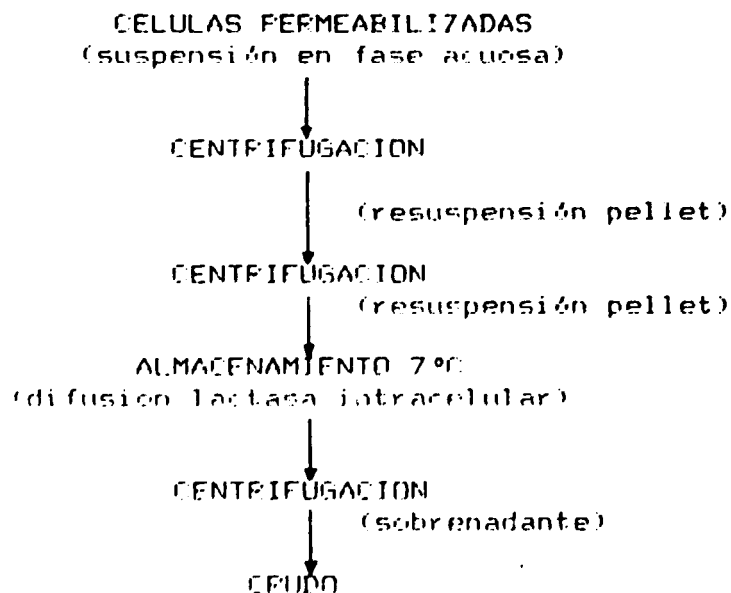


Figura 1 : Procedimiento de extracción de lactasa por permeabilización.

RESULTADOS

Permeabilización

En la Tabla 2 se aprecia el efecto de la concentración de alcohol isoamílico (AI) y el tiempo de contacto en la permeabilización celular al actuar sobre 0.5 g/l de levaduras.

Para concentraciones menores al 0.02% v/v no se obtuvo permeabilización. Con concentraciones de AI de 0.04, 0.12 y 0.16% v/v resultó la misma permeabilización que con 0.02 y 0.08 % v/v.

Se estudió la permeabilización para concentraciones de células mayores (hasta 200 g/l) obteniéndose la misma actividad específica que se aprecia en los resultados de la tabla 2.

TABLA 2 : EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ALCOHOL ISOAMILICO Y TIEMPO DE AGITACION EN LA PERMEABILIZACION

Actividad Especifica (ui/g de células)*10 ⁻³				
AI(% V/V)	0.02	0.08	0.2	0.24
AI(ml/mg células)	0.04	0.16	0.4	0.48
Tiempo (min)				
0	2.1	1.9	2.9	2.8
5	1.9	1.9	2.7	-
10	1.9	2.1	2.8	2.9
15	2.1	2.1	2.8	-
20	1.8	2.0	-	-
30	1.9	2.0	2.9	2.8

Extracción por Permeabilización

En la figura 2 se muestra la cinética de difusión de la enzima a 7°C hacia el seno del líquido para levaduras permeabilizadas con razones AI/células iguales a 0.04 ml/mg y 0.4 ml/mg.

Estabilidad del Crudo

En la figura 3 se aprecia la estabilidad de los crudos obtenidos por permeabilización para razones AI/células de 0.05 y 0.5 almacenados a temperaturas de -10 y 7°C.

En la figura 4 se muestra el efecto del ditioeritritol sobre la estabilidad del crudo enzimático.

Extracción por molienda

En las figuras 5, 6, 7 y 8 se presentan las cinéticas de extracción de actividad y proteínas por molienda con 200 ml de perlas de vidrio y concentraciones celulares de 20, 30, 40 y 60

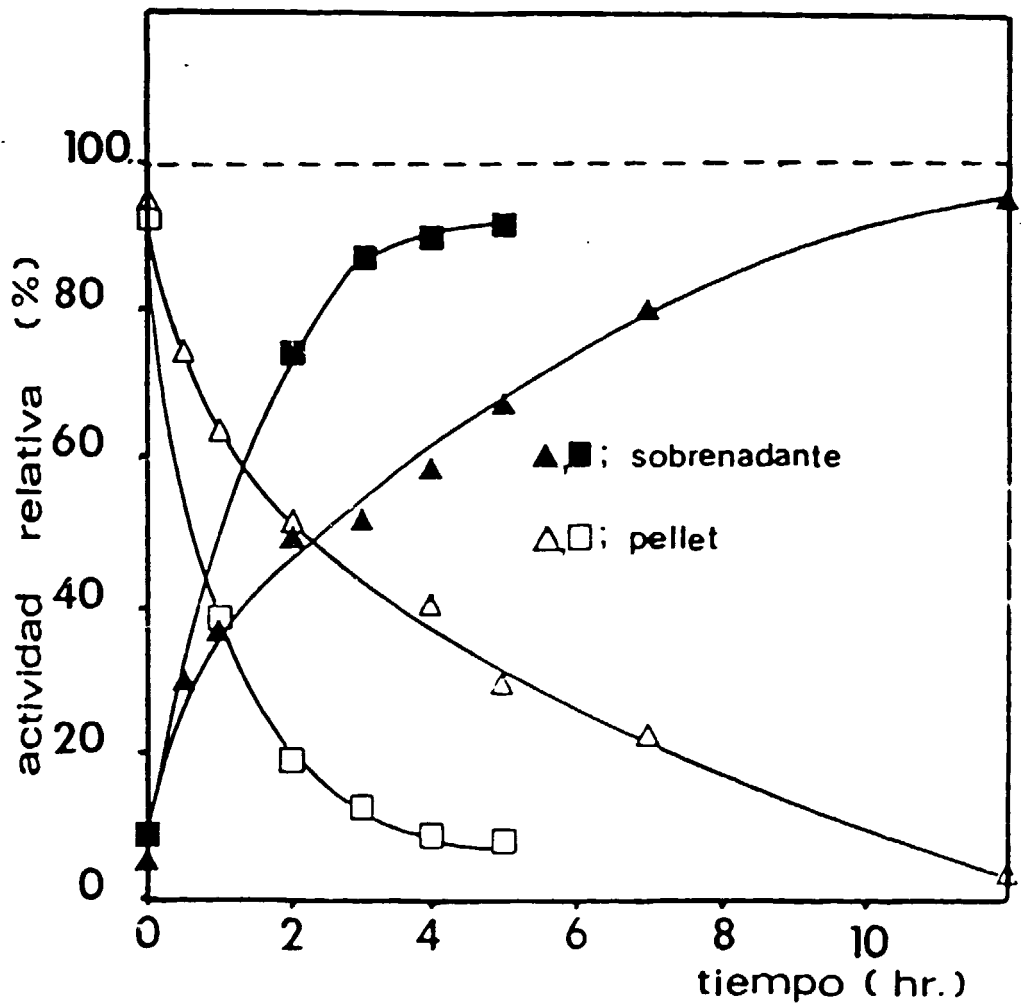


Figura 2 : Difusión de lactasa intracelular de *K.fragilis* permeabilizadas con Al 0.04 ml/mg y 0.4 ml/mg.

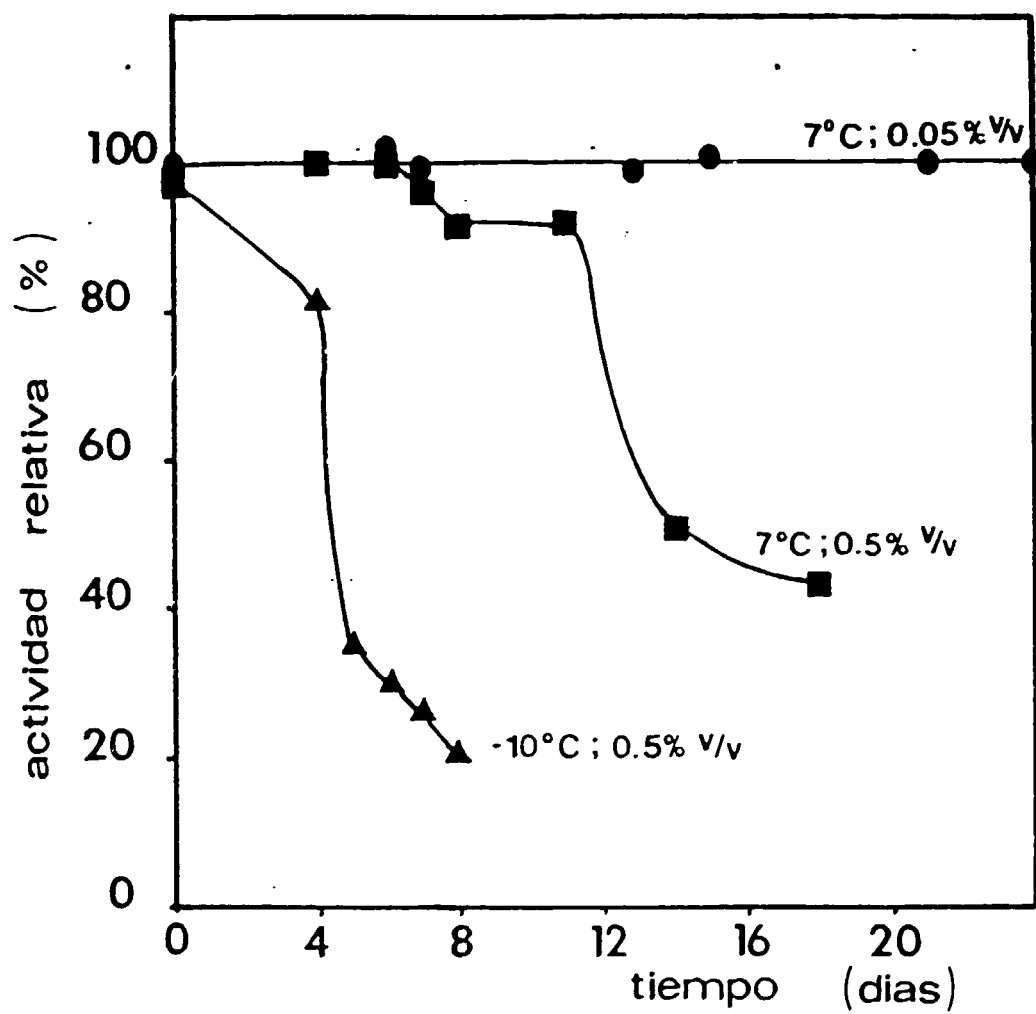


Figura 3 : Estabilidad de los crudos enzimáticos obtenidos de células permeabilizadas con distintos niveles de alcohol isoamílico.

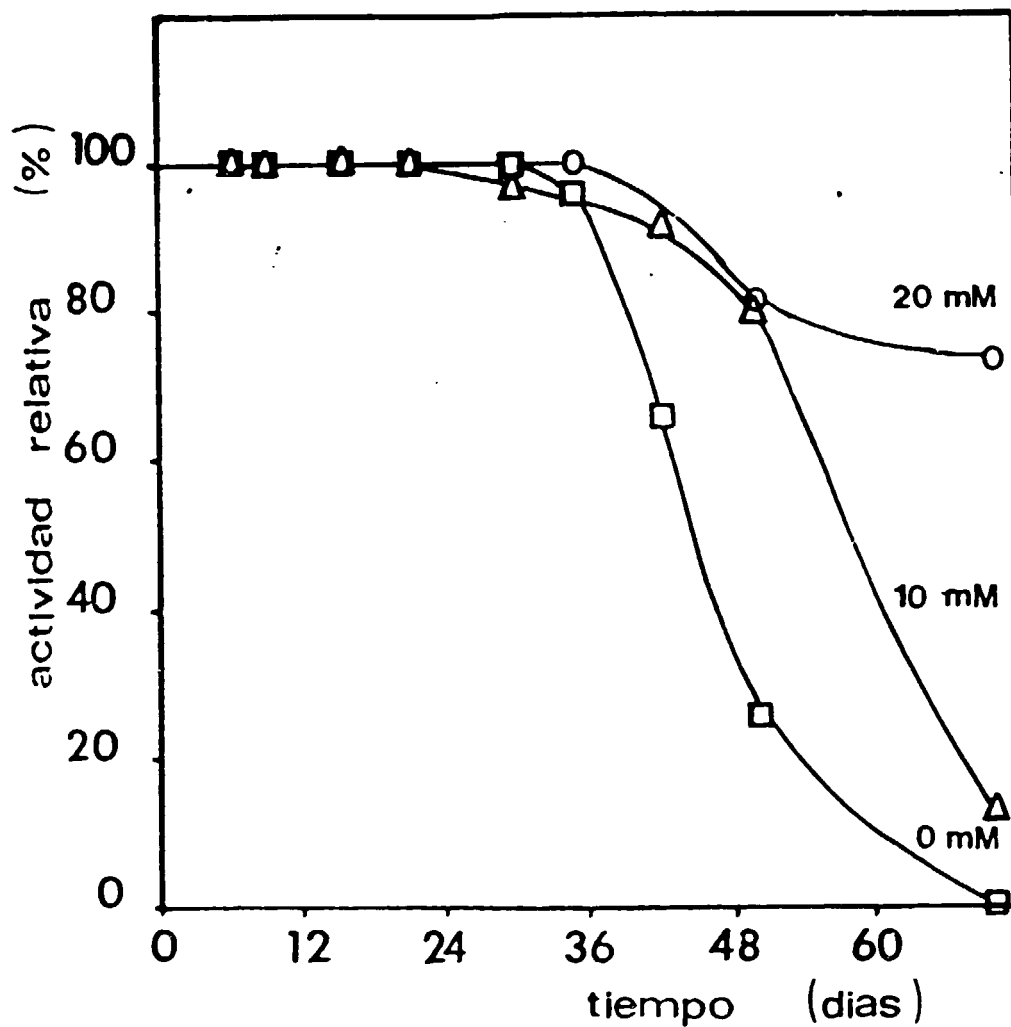


Figura 4 : Efecto del ditioneocritritol sobre la estabilidad del crudo enzimático almacenado a 7°C.

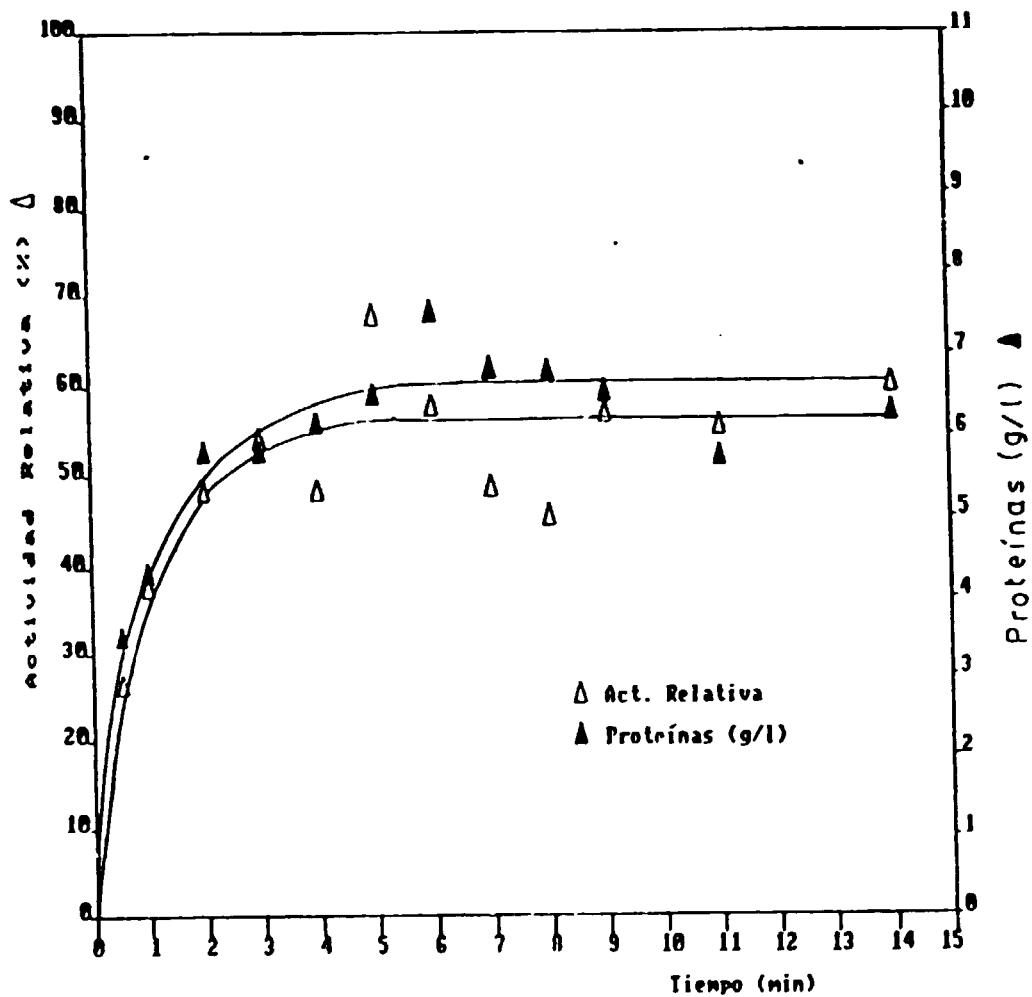


Figura 5 : Cinética de extracción de lactasa y proteínas en molienda con perlas de vidrio para una razón células/perlas de vidrio de 15 mg/g. y una concentración celular de 20 g/l.

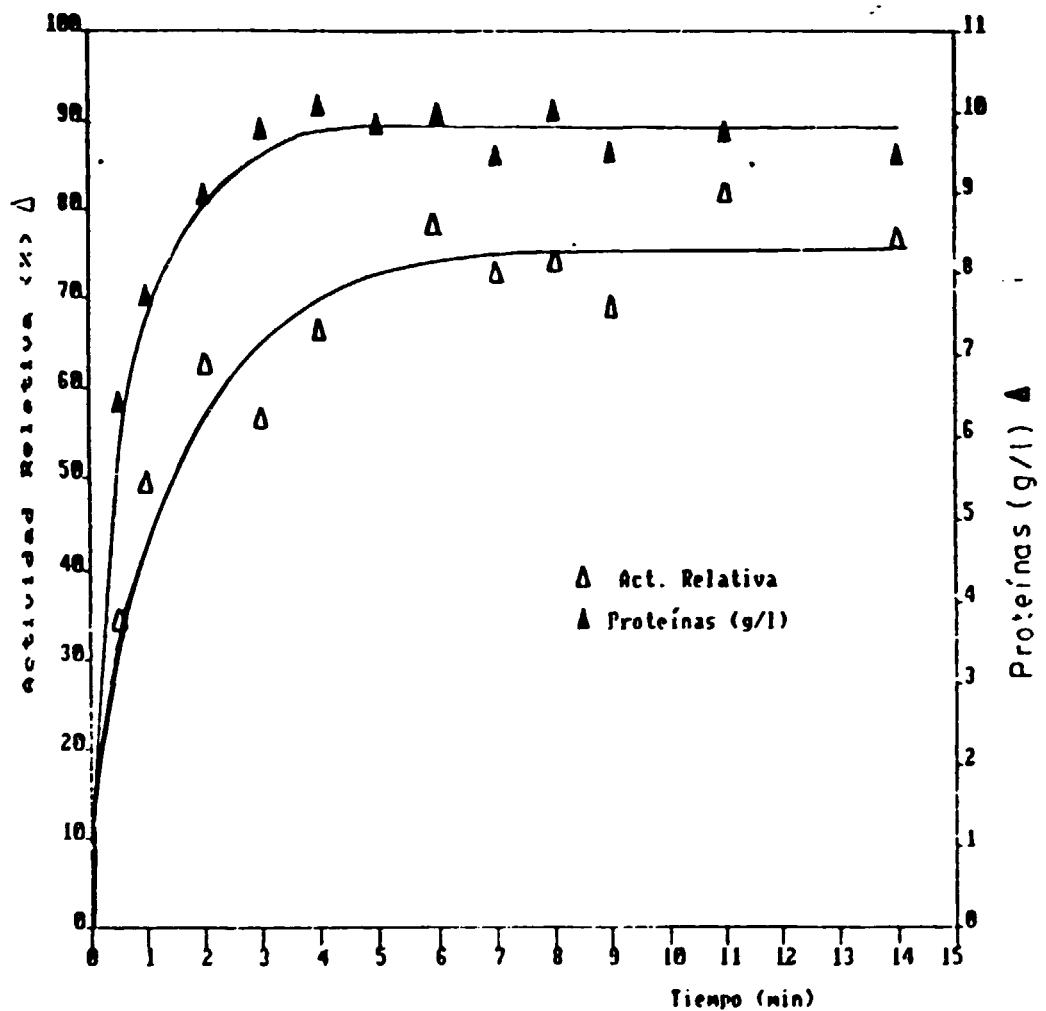


Figura 6 : Cinética de extracción de lactasa y proteínas en molienda con perlas de vidrio para una razón células/perlas de vidrio de 22.1 mg/g y una concentración celular de 30 g/l.

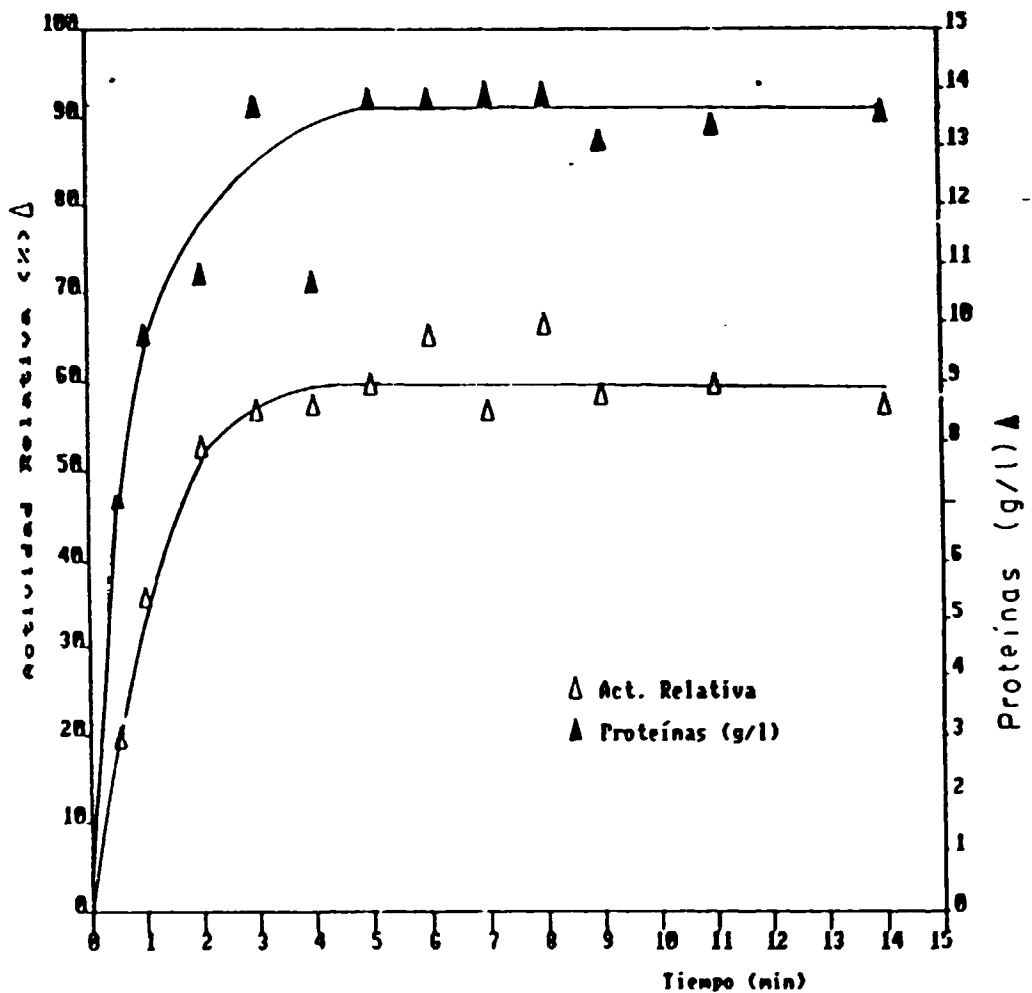


Figura 7 : Cinética de extracción de lactasa y proteínas en molienda con perlas de vidrio para una razón células/perlas de vidrio de 29.7 mg/g y una concentración celular de 40 g/l.

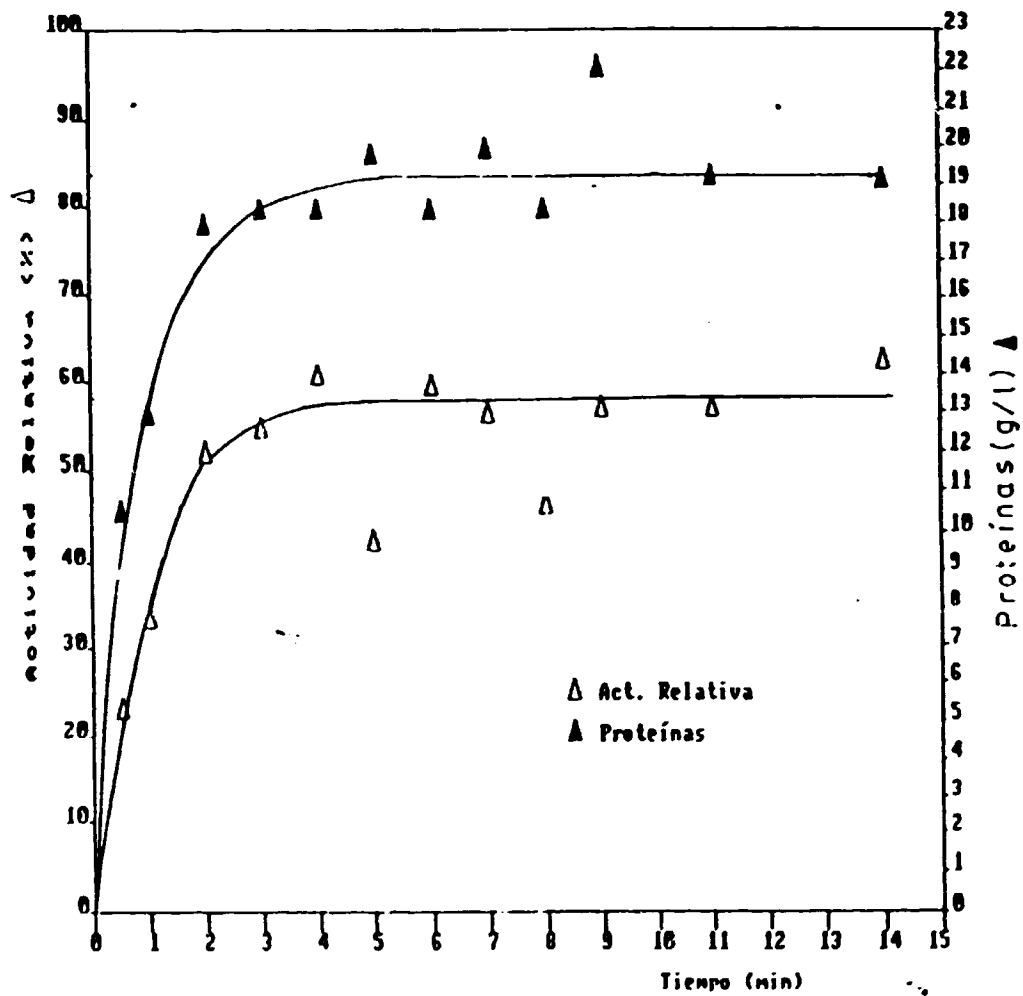


Figura 8 : Cinética de extracción de lactasa y proteínas en molienda con perlas de vidrio para una razón células/perlas de vidrio de 45.3 mg/g y una concentración celular de 60 g/l.

g/l respectivamente, en una cámara de 350 ml. Para moliendas efectuadas con 150 ml de abrasivos se obtuvieron cinéticas similares a las presentadas en las figuras 5 a 8, resultando el máximo de extracción después de 5 minutos de disrupción.

En la figura 9 se muestra el efecto de la concentración de células sobre la actividad extraída para 150 y 200 ml de abrasivo.

En la figura 10 se aprecia el efecto de la concentración de células en disrupción por molienda con 200 ml de perlas de vidrio de 0.5 mm. Se observa una relación lineal con la concentración de proteínas extraídas, lo cual no se presenta con la actividad de lactasa liberada.

En la figura 11 se presenta una comparación del crudo obtenido por permeabilización con solvente y por disrupción celular.

Estudios de extracción de lactasa por molienda que se encuentran en ejecución permiten predecir que es posible obtener rendimientos del 90%, con una estabilidad del crudo del 100% en 18 días a 7°C sin adición de preservantes.

CONCLUSIONES

- La permeabilización de Kluyveromyces fragilis con AI es extremadamente rápida, manteniéndose la actividad hasta los 30 minutos de agitación.
- La actividad específica (ui/g células) máxima, se obtiene a partir de 0.4 ml AI/mg de células manteniéndose dicho valor a mayores razones AI/células.
- Disminuyendo los costos de AI en 10 veces, es decir una permeabilización con 0.04 ml de AI/mg de células se logra un 72% de la actividad considerada como el 100% de permeabilización.
- En Kluyveromyces fragilis permeabilizadas con razones de 0.04 y 0.4 ml de AI/mg de células, la lactasa intracelular difunde casi en un 100% después de 12 y 3 horas respectivamente de mantener las células lavadas a 5°C.
- El crudo obtenido por permeabilización para una razón de AI/células igual a 0.05 ml/mg es más estable que el obtenido con concentraciones mayores de alcohol. El ditioeritritol estabiliza la actividad enzimática del crudo.
- El volumen de abrasivo en la cámara de molienda afecta la extracción de actividad y proteínas, siendo ésta mayor cuando las perlas de vidrio ocupan 200 ml en vez de 150 ml.
- Para los dos volúmenes de abrasivo estudiados, se obtuvo el óptimo de extracción enzimática cuando la concentración de levaduras fue de 30 g/l.

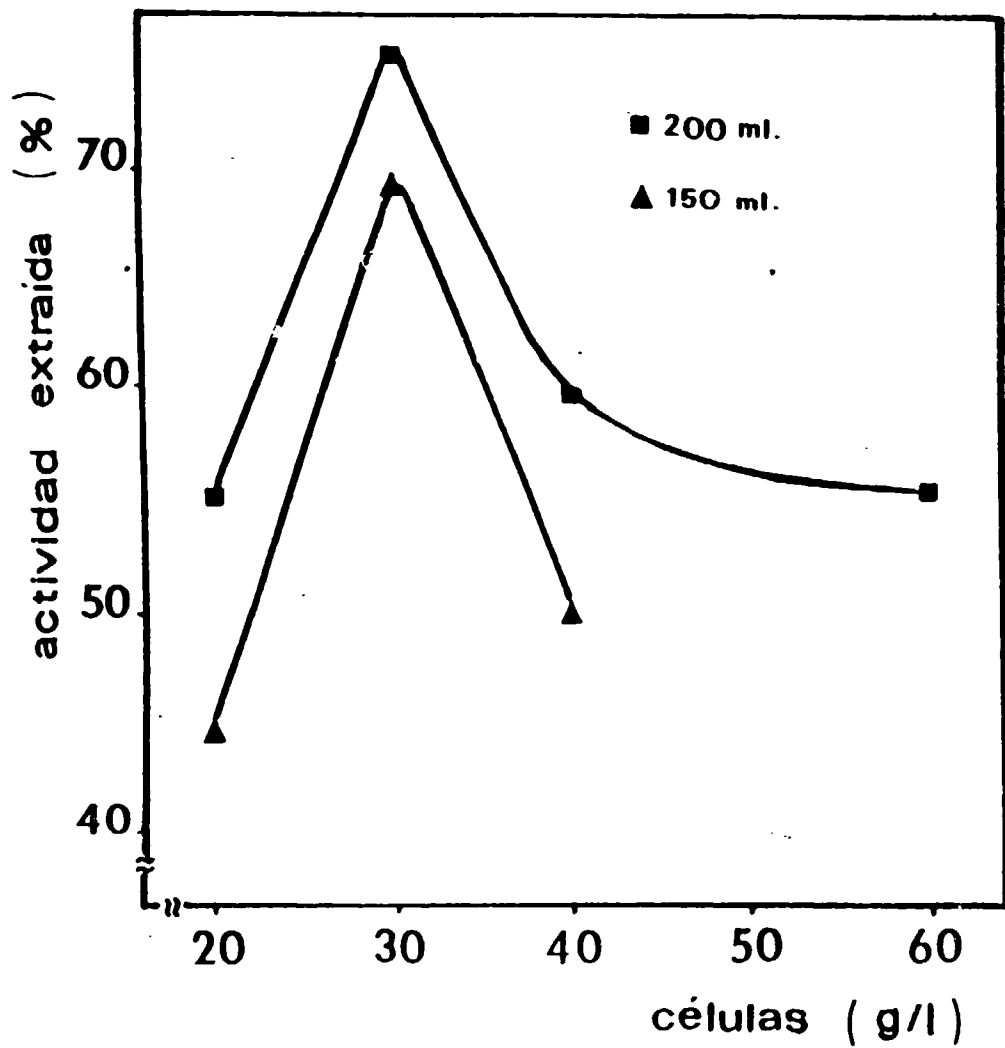


Figura 9 : Efecto de la concentración de células y el volumen de abrasivo en la extracción por molienda de lactasa de Kluyveromyces fragilis .

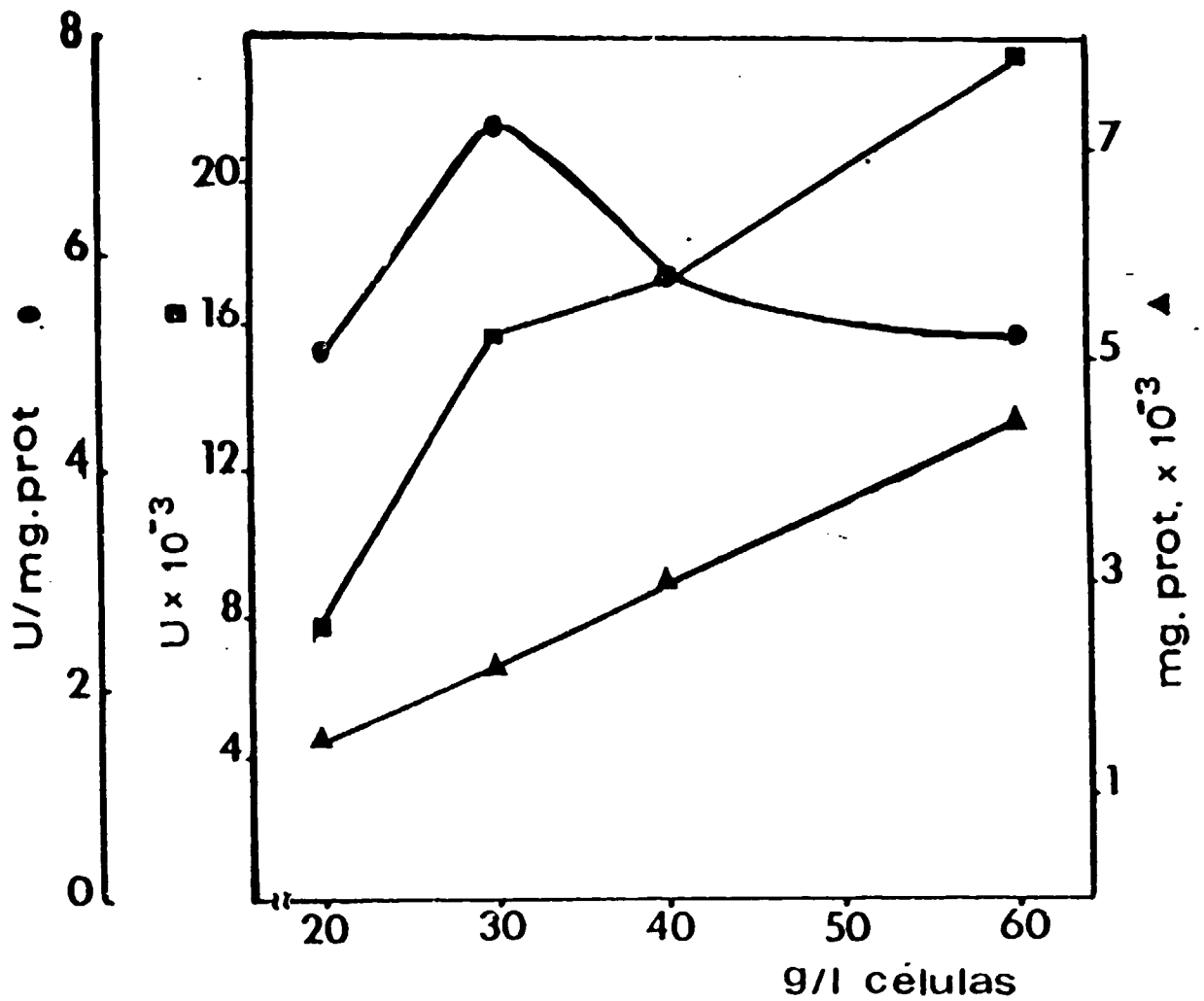


Figura 10 : Efecto de la concentración de células en molienda con abrasivo sobre la actividad total, actividad específica y proteínas liberadas.

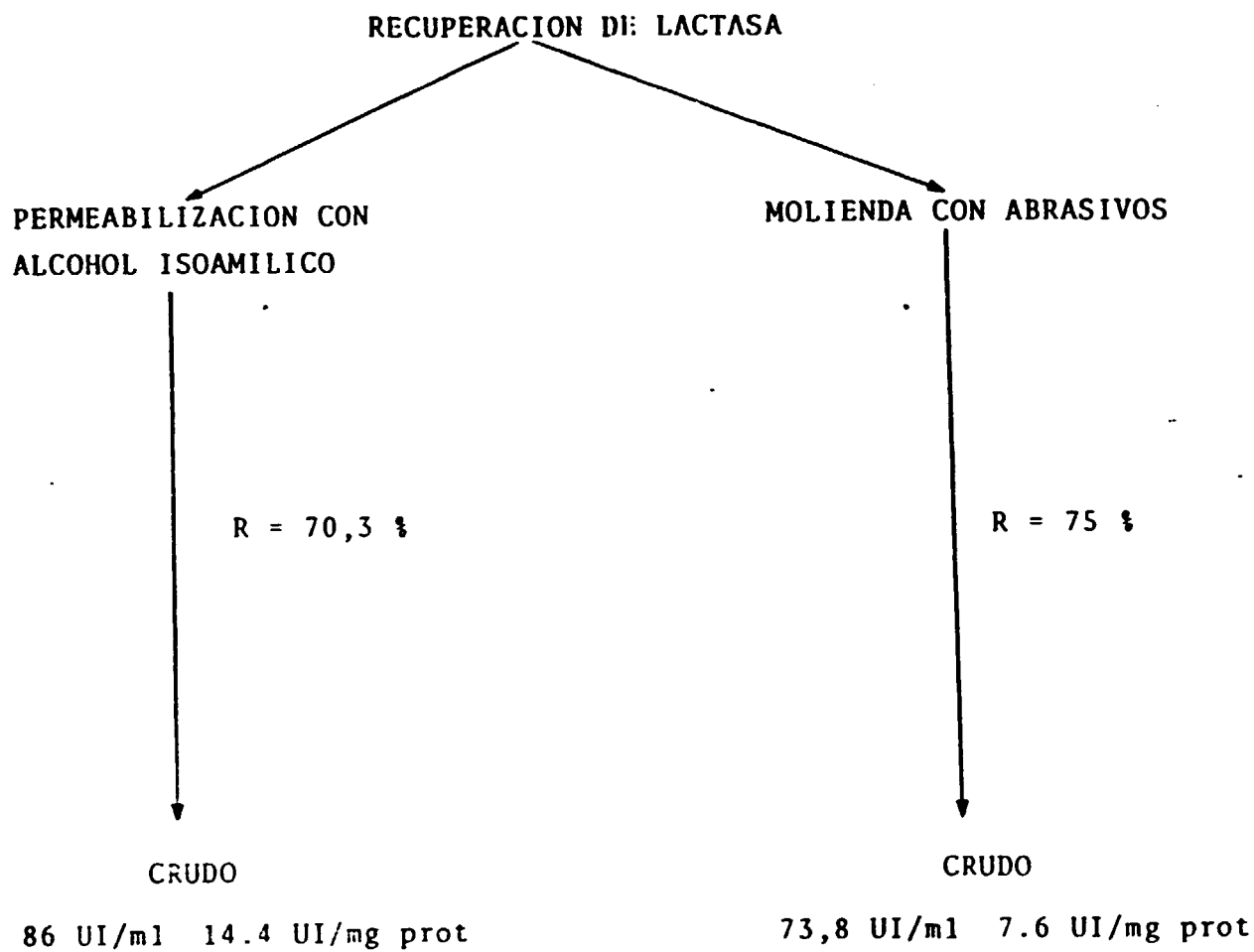


Figura 11 : Extracción de lactasa por permeabilización y disrupción celular.

- Existe una relación lineal entre las proteínas extraídas y la concentración celular presente en la cámara de molienda, no observándose el mismo efecto con la actividad enzimática.
- Bajo las condiciones de molienda estudiadas se obtienen cinéticas de extracción de proteínas y actividad semejantes.
- El rendimiento de extracción de lactasa es levemente superior por molienda que por permeabilización con alcohol isoamilico.
- La extracción por permeabilización es un método de permeabilización más selectivo que la disrupción en molino con abrasivo.
- La extracción por molienda es más simple que la extracción por permeabilización.

PURIFICACION DE EXTRACTO CRUDO DE K. fragilis.

Dada la baja actividad específica del extracto crudo enzimático, se hizo indispensable su purificación como una etapa previa a la inmovilización, según se señaló anteriormente.

Se estudió, como alternativa al procedimiento de purificación con polietilenglicol desarrollado por los investigadores mexicanos, un procedimiento basado en precipitación fraccional con solventes orgánicos y con sales. Los resultados obtenidos por los investigadores mexicanos en la purificación de un crudo enzimático clarificado por partición bifásica, empleando polietilenglicol como agente de precipitación, no han sido posibles de reproducir en el caso de un crudo enzimático clarificado por centrifugación.

La estrategia de purificación desarrollada consiste en dos pasos sucesivos de precipitación fraccional. En el primero se utiliza etanol a baja temperatura como agente de precipitación, el que fue seleccionado entre otros solventes orgánicos miscibles (acetona, metanol) con los que se le comparó en experiencias preliminares. En el segundo paso se emplea sulfato de amonio como agente de precipitación, el que se adiciona a la fracción redisuelta obtenida en la etapa anterior.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

La metodología de obtención del crudo clarificado es la siguiente y aplica tanto al caso de precipitación fraccional con etanol y sulfato de amonio, como al caso de precipitación con polietilenglicol.

Obtención del crudo enzimático

a. **Propagación** : A partir de la cepa en medio sólido se realiza una propagación en medio líquido para obtener el inóculo a

utilizar en el cultivo en matraces.

b. Cultivo en matraces : Inoculando con células provenientes de la etapa de propagación se realiza el cultivo en matraces a las siguientes condiciones:

Temperatura	= 30 °C
Agitación	= 220 rpm
Volumen matraz	= 2 litros
Volumen de medio	= 1 litro
Tiempo	= hasta llegar al final de la fase exponencial.
pH	= 4.2 (con tampón citrato)

Composición del medio de cultivo (g/l) :

Lactosa	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	..59
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0.33
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.286
Ext.levadura	7.5

En el cultivo en matraces se lleva un control de la concentración celular en el tiempo para determinar el tiempo de cosecha de las células, el que se hace coincidir con el tiempo al cual la actividad enzimática específica de las células alcanza su valor óptimo (al final de la fase exponencial de crecimiento). La propagación en medio líquido del inóculo de los matraces se realiza en el mismo medio de cultivo y a las mismas condiciones de pH y temperatura.

c. Separación de las células : Las células cosechadas del cultivo en matraces se separan mediante centrifugación a 6000 rpm por 5 min a una temperatura de 4°C. Las células separadas son lavadas 2 veces con tampón fosfato. Finalmente se obtiene un pellet de células libres de impurezas.

d. Las células lavadas se resuspenden en tampón fosfato pH 6.6 hasta una concentración celular de aproximadamente 20 g/l.

e. Permeabilización : Se adicionan en un matraz de aforo de 250 ml, 12,5 ml de alcohol isoamílico y la suspensión celular hasta alcanzar el nivel de aforo. Esta mezcla se agita por 30 seg en forma manual. La temperatura de la mezcla de permeabilización se mantiene a aproximadamente 12°C.

f. Decantación : Para separar el alcohol isoamílico se introduce la mezcla de permeabilización en un embudo de decantación, donde se separa la fase acuosa que contiene las células permeabilizadas.

g. La fase acuosa, conteniendo aún alcohol isoamílico, se centrifuga por 10 min a 6000 rpm. Se bota el sobrenadante y el pellet se lava 1 vez con tampón fosfato pH 6.6.

h. Las células permeabilizadas lavadas, provenientes de un volumen de 125 ml de la fase acuosa de permeabilización, se resuspenden en 400 ml de tampón fosfato pH 6.6. Con esta dilución se obtiene un crudo enzimático con aproximadamente 7 g/l de proteínas. La difusión de la enzima se realiza a 7°C por un tiempo de 15 horas.

i. Al finalizar la difusión de la enzima se separa el pellet por centrifugación a 6000 rpm por 10 min. El sobrenadante corresponde al crudo enzimático que tiene las siguientes características :

Actividad = 60-70 ui/ml (medida con 2.27 mM de DNPG)
Proteínas = app. 7 mg/ml (Lowry con albúmina de bovino como referencia)

La metodología seguida para la purificación por precipitación fraccional con etanol y sulfato de amonio es la siguiente:

Purificación del crudo enzimático

a. Precipitación con etanol : Se adicionan 100 ml de crudo enzimático en un vaso precipitado en un baño de hielo con sal (app.-20°C). Bajo agitación se adiciona al crudo, dejando escurrir por las paredes del vaso, 100 ml de etanol 95% el que se encuentra en un baño a las mismas condiciones que el baño en que se encuentra el crudo. La temperatura durante la precipitación es de 0-3°C y el tiempo de adición del etanol es de 3-4 min. Al finalizar la adición del etanol se ajusta la temperatura a 0°C. Se centrifuga a 0°C a 10.000 rpm por 8 minutos.

b. Se bota el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 15-100% del volumen inicial del crudo. Se homogeniza y si quedan partículas no disueltas se centrifuga a 10.000 rpm por 10 minutos y se recupera el sobrenadante.

c. La precipitación con sulfato de amonio se lleva a cabo con 100 ml del purificado con etanol, bajo agitación en baño de hielo a 2°C. Se adiciona el sulfato de amonio lentamente, hasta su concentración final equivalente al 70% de saturación a 0°C. Se centrifuga a 10.000 rpm por 10 min y se bota el sobrenadante.

d. Se resuspende el precipitado en tampón fosfato pH 6.6
La metodología seguida para la precipitación fraccional con polietilenglicol fue la siguiente:

45 ml de crudo fueron mezclados con 20 ml de agua y 10 ml de polietilenglicol 6000 al 50%. Se llevó la mezcla a 20°C y se ajustó el pH a 6.0 con ácido fosfórico diluido (volumen de agua más ácido diluido = 27 ml). Luego se dejó agitando por 30 min y 24°C y posteriormente se centrifugó por 40 minutos a 6000 rpm y 5°C. El precipitado formado se redisolvió (parcialmente) en 25 ml de tampón. Finalmente se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos para eliminar el precipitado no redisoluelto.

RESULTADOS

Se realizó un estudio preliminar de precipitación con distintas concentraciones de etanol (% V/V), obteniéndose los resultados que se presentan la Tabla 3 :

TABLA 3 PRECIPITACION DE EXTRACTO CRUDO DE LACTASA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL.

ETANOL (% V/V)	U/ml	mg/ml	U/mg	R (%)	F.P.
0	24.6	7.0	3.5	100	1
20	0	0.2	0	0	0
30	3.5	0.3	11.7	14.2	3.3
40	9.7	0.3	32.3	39.4	9.2
50	18.9	0.3	63.0	76.8	18
60	20.5	1.2	17.1	83.8	4.9

R : rendimiento

FP : factor de purificación

Fuede observarse que la enzima precipita casi completamente a 50% V/V de etanol, y que el grueso de la actividad se recupera entre el 30 y 50 % V/V de etanol, siendo posible obtener una purificación sustantiva con un rendimiento aceptable.

Experiencias preliminares de precipitación con sulfato de amonio, mostraron que la lactasa precipita casi completamente a un 70 % de saturación de la sal. En la Tabla 4 se muestran los resultados de precipitación fraccional con etanol al 50 % V/V y sulfato de amonio al 70 % de saturación, de acuerdo a la metodología propuesta.

Se presenta los resultado obtenidos con dos crudos de distinta calidad (24.6 y 54.9 ui/ml correspondientes a 3.5 y 7.7 ui/mg proteína respectivamente). Fuede observarse que el factor de purificación obtenido no varía significativamente con la calidad inicial del crudo. La precipitación entrega factores de purificación del orden de 14, mientras que la precipitación con sulfato de amonio da una pureza adicional cercana a 2. No obstante, el rendimiento disminuye de aproximadamente un 70 a 80 % a un 40 a 55 % con el paso adicional de salado con sulfato de amonio, por lo que es discutible la conveniencia de incluir este segundo paso de purificación, aunque favorece la redisolución del precipitado para su posterior inmovilización.

TABLA 4 PRECIPITACION CON ETANOL Y SULFATO DE AMONIO

ETAPA	U/ml	mg/ml	U/mg	R (%)	F.P.
CRUDO	24.6(54.9)	7.1(7.1)	3.5(7.7)	100(100)	1(1)
ETANOL	22.3(90.4)	0.45(0.86)	49.6(105.2)	74.7(82.4)	14.2(13.7)
S.AM.	24.8(140.9)	0.24(0.69)	103.4(204.2)	55.4(42.8)	29.5(26.5)

El grado de reproducibilidad de los resultados no ha sido enteramente satisfactorio, obteniéndose variaciones significativas dependiendo de la velocidad de adición del etanol y el control de la temperatura de operación (factores de purificación inferiores a los reportados en la Tabla 4, del orden de 5 a 8, se han obtenido con adición rápida de etanol que permite un mejor control de la temperatura de operación). Este último aspecto parece ser crucial para la reproducibilidad de los resultados por lo que los experimentos recientes se han desarrollado con adición lenta y estricto control de temperatura, mejorándose la reproducibilidad.

Los resultados obtenidos en la precipitación fraccional con polietilenglicol, de acuerdo a la metodología indicada, se presentan en la Tabla 5, para dos crudos de calidad diferente (8.9 y 5.9 ui/mg proteína respectivamente)

TABLA 5 PRECIPITACION CON POLIETILENGLICOL

ETAPA	U/ml	mg/ml	U/mg	F.P.
CRUDO	121.5 (65.5)	13.7 (11.1)	8.9 (5.9)	1 (1)
PPT	183.9 (101.2)	6.0 (4.3)	30.7 (23.5)	3.4 (3.9)

PPT: fracción precipitada redisuelta

Los resultados obtenidos son significativamente inferiores a los obtenidos por el grupo de trabajo mexicano, donde se reportan factores de purificación del orden de 10. Las diferencias podrían deberse a la diferente calidad del crudo, como consecuencia del distinto procedimiento de separación de los fragmentos celulares.

H. TRANSFERENCIA DE LA INFORMACION OBTENIDA EN LA INMOVILIZACION DE LACTASA COMERCIAL EN QUITINA A LA INMOVILIZACION DE LACTASA PRODUCIDA PARCIALMENTE PURIFICADA.

En el mes de junio se recibieron dos muestras de preparado enzimático purificado preparado por el grupo de investigadores mexicanos. Desafortunadamente, el preparado se recibió en malas condiciones, dado el lapso de tiempo que el preparado permaneció sin refrigeración y la ausencia de preservantes. Ello se desprende claramente de los resultados de la Tabla 6.

TABLA 6. CARACTERISTICAS DE PREPARADO DE LACTASA PARCIALMENTE PURIFICADO.

	PREP. 1	PREP. 2
Actividad medida (ui/ml) ^a	1244	1093
Actividad declarada (ui/ml) ^b	2259	2826
Proteínas (mg/ml)	16	18
Proteína declarada (mg/ml)	12	16
Act. específica (ui/mg proteínas)	77	61
Actividad específica declarada	193	176
Conteo microbiológico total (mo/ml)	2.34*10 ⁶	2.05*10 ⁶

a : medida sobre lactosa 20 g/l a 40°C, pH 6.6

b : actividad medida en México, aparentemente empleando ONPG como sustrato.

c : medida por Lowry

d : medida por método de Breed

Posteriormente, en el mes de Septiembre, se recibió una nueva muestra de lactasa parcialmente purificada. Esta vez el preparado llegó en buenas condiciones, con las siguientes características:

Actividad : 770.65 ui/ml (en lactosa 20 g/l, 40°C y pH 6.6)

Proteínas : 9.7 mg/ml (Método de Lowry con albúmina bovina como referencia)

La actividad de la lactasa medida con ONPG es 1.2 veces superior a la medida con lactosa, con lo cual se obtiene una actividad de 924.8 ui/ml valor muy cercano al reportado para esta muestra de 970 ui/ml.

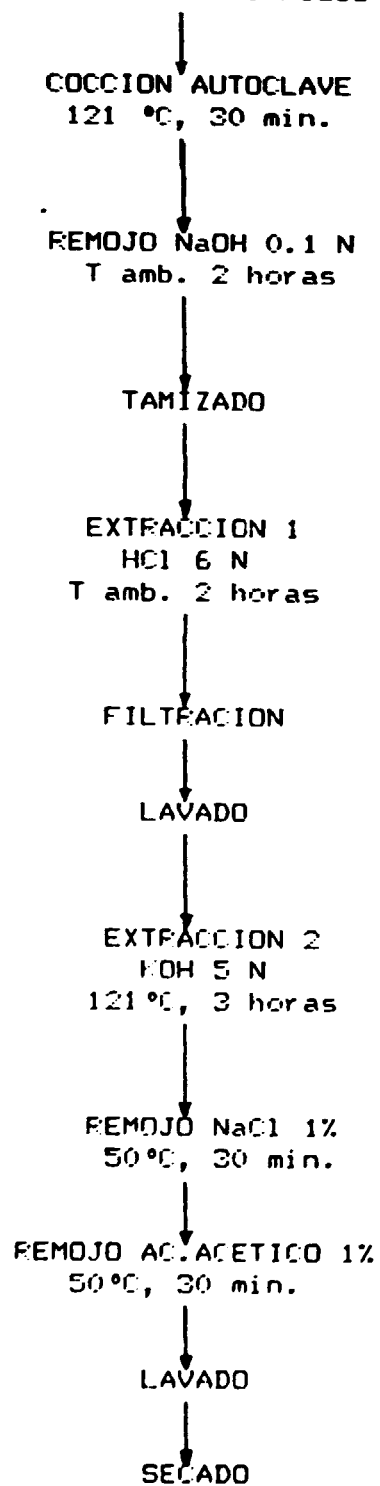
Al momento de iniciar las pruebas de inmovilización de esta enzima se observó que la actividad enzimática de la misma había disminuido significativamente a un 60% del valor inicial reportado. Se realizaron pruebas preliminares de inmovilización, no obstante se considera que la estabilidad del preparado enzimático es aún insuficiente.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Previo al estudio de inmovilización de la lactasa parcialmente purificada, debió ponerse en ejecución un método para producir

quitina de calidad adecuada a la inmovilización, ya que el producto crudo que se adquiría de la empresa nacional BIDAUSTEAL S.A. no se está produciendo actualmente. El esquema de producción se señala a continuación.

CAPARAZON CRUSTACEOS



El rendimiento obtenido es del orden del 18%. El producto obtenido es de alta calidad, obteniéndose escamas libres de pigmentación, de proteínas y carbonato.

La metodología de inmovilización en quitina es la siguiente:

- A 1.25 g de quitina se le adicionan 25 ml de ácido acético 5% v/v y se incuban a 50°C durante 30 minutos. En esta etapa se produce una hidrólisis ácida parcial de la quitina obteniéndose como resultado un aumento de la reactividad de la quitina frente al reactivo bifuncional utilizado en la siguiente etapa.

- A la quitina hidrolizada parcialmente se le retira el ácido presente, a través de lavados sucesivos con agua destilada. Luego se adicionan 0.5 ml de ácido acético, 0.8 ml de glutaraldehído al 25% y 4.2 ml de agua destilada y se incuba la mezcla por 16 horas a temperatura ambiente. En esta etapa se produce la activación del soporte con el reactivo bifuncional glutaraldehído.

- Se eliminan los reactivos de activación mediante lavados sucesivos con agua destilada. Se adicionan 7.5 ml de solución enzimática a pH 8.5 (tampón fosfato 0.1 M) y una concentración de 1 mM de dtioeritritol utilizado como estabilizante enzimático. Se incuba a 4°C por 16 horas.

- Para eliminar la enzima remanente en solución y la enzima adsorbida al soporte se realizan lavados sucesivos con tampón fosfato pH 6.6, NaCl 0.5 M pH 6.6 y tampón fosfato pH 6.6.

- El almacenamiento de la enzima inmovilizada se realiza a 4°C en tampón fosfato 0.1 M a pH 6.6 con 1 mM de dtioeritritol como estabilizante.

Experiencias de inmovilización

Utilizando el protocolo descrito anteriormente se realizaron pruebas de inmovilización con la lactasa extraída de células de K. fragilis y con una lactasa comercial del mismo origen (Lactozym 3000L de NOVO) en quitina purificada a partir de caparzones de camarones con el procedimiento descrito anteriormente. Se realizaron además pruebas de inmovilización con la lactasa extraída de K. fragilis purificada a través de dos procedimientos diferentes.

Para las experiencias realizadas con el fin de comparar la lactasa extraída de K. fragilis con la lactasa comercial, las características de los preparados enzimáticos utilizados fueron las siguientes.

A partir de las células de K. fragilis se realizó la extracción de la enzima mediante permeabilización de éstas con alcohol isoamílico y el extracto enzimático obtenido luego purificado por precipitaciones sucesivas con etanol y sulfato de amonio.

El preparado enzimático así obtenido tenía las siguientes características:

Actividad : 160.7 (ui/ml) (medida en lactosa 20g/l, 40°C, pH 6.6)

Proteínas : 0.55 mg/ml (determinada por el método de Lowry utilizando albúminas bovina como proteína de referencia)

Actividad específica : 295 (ui/mg proteína)

Las características de la enzima comercial utilizada son una actividad de 4880 (ui/ml) y una actividad específica de 325 (ui/mg de proteína), medidas de la misma forma que para el preparado anterior.

Para las experiencias realizadas para comparar las lactasas de K.fragilis obtenidas a través de diferentes metodologías de purificación se utilizaron preparados enzimáticos con las características señaladas a continuación.

Características de lactasa purificada mediante precipitación con etanol

Actividad : 457.5 (ui/ml)

Proteínas : 5.6 (mg/ml)

Actividad específica : 81.7 (ui/mg proteína)

Características de lactasa purificada mediante precipitaciones sucesivas etanol-sulfato de amonio

Actividad : 415.8 (ui/ml)

Proteínas : 4.2 (mg/ml)

Actividad específica : 99 (ui/mg proteína)

En las experiencias realizadas para comparar la enzima extraída de K.fragilis con la lactasa comercial se contactaron 964 y 482 ui de la lactasa de levaduras y 976 ui de la enzima comercial.

En las experiencias realizadas para comparar las dos metodologías de purificación de la lactasa de levadura se contactaron 1012 y 997 ui de la enzima precipitada con etanol y con etanol-sulfato de amonio respectivamente.

Para cada experiencia de inmovilización se determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína contactadas, la proteína remanente en solución después de la inmovilización y la actividad del catalizador de enzima inmovilizada obtenido. La actividad enzimática se midió utilizando lactosa como sustrato (20 y 200 g/l para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente, 40°C y pH 6.6). La concentración de proteínas se determinó a través del método de Lowry utilizando albúmina de bovino como proteína de referencia.

RESULTADOS

En las pruebas de inmovilización realizadas para comparar la enzima comercial con la enzima obtenida de células de K. fragilis, se obtuvieron los resultados entregados en la Tabla 7 .

TABLA 7 INMOVILIZACION DE LACTASA PURIFICADA EN QUITINA

ACTIVIDAD CONTACTADA UI	ACTIVIDAD INMOVILIZADA % (**)	PROTEINA CONTACTADA mg	PROTEINA INMOVILIZADA mg
857	64.8	3.3	1.45
429	50.3	1.65	0.86
867 (*)	100	3.1	1.43

(*) : Experiencia realizada con la enzima comercial

(**) : Se entrega como porcentaje de la máxima actividad inmovilizada obtenida correspondiente a la de la experiencia con la enzima comercial.

Dados los valores de las cargas enzimáticas de los catalizadores obtenidos con la enzima de levadura y la enzima comercial se consideró adecuado el grado de purificación de la enzima obtenida a partir de las células de levadura para realizar las restantes pruebas de inmovilización de la enzima.

En la Tabla 8 se entregan los resultados obtenidos en las experiencias de inmovilización de la lactasa de levadura purificada mediante las dos metodologías diferentes utilizadas.

TABLA 8 INMOVILIZACION DE LACTASAS DE K.Fragilis PURIFICADAS

Método de purificación	Actividad contactada (ui)	Actividad inmovilizada (ui/g)	Proteína contactada (mg)
Etanol	1012	137.3	10.1
Etanol-sulfato de amonio	997	143.7	10.1

De los resultados de la Tabla 8 se puede concluir que la metodología de purificación no afecta a la carga enzimática del catalizador de enzima inmovilizada obtenido. En base a estos resultados es que se seleccionó la metodología de purificación por precipitación con etanol para realizar las pruebas de inmovilización destinadas a optimizar el protocolo de inmovilización de la lactasa de K. fragilis en quitina.

I. CARACTERIZACION CINETICA PRELIMINAR Y ESTABILIDAD OPERACIONAL DE LACTASA COMERCIAL INMOVILIZADA EN QUITINA.

METODOLOGIA

Caracterización cinética

Se realizó una caracterización cinética preliminar de la enzima comercial inmovilizada en quitina utilizando lactosa como sustrato, 40°C y pH 6.6.

Se determinó la velocidad inicial de reacción del catalizador para concentraciones de sustrato en el rango de 10-150 g/l y posteriormente, utilizando el método de linealización de los inversos de Lineweaver Burk se determinó el valor de la constante de afinidad enzima-sustrato de la ecuación cinética de Michaelis Menten (K_m).

Estabilidad operacional

Se realizaron pruebas para determinar la estabilidad de la lactasa comercial inmovilizada en quitina en la operación de reactores continuos de columna empacada, a las siguientes condiciones :

Enzima : Lactasa NOVO (Lactozym 3000L) inmovilizada en quitina, con una actividad de 161 (ui/g) medida en lactosa 200g/l a 40°C y pH 6.6.

Sustrato : Solución de lactosa de concentración 100g/l en tampón fosfato 0.1 M pH 6.6, con iones Mg^{+2} 1 mM y Mn^{+2} 0.1 mM.

Temperatura : se estudiaron 2 temperaturas de operación, temperatura ambiente (20-25°C) y 40°C.

Flujos de operación : para cada temperatura se utilizó un flujo estimado para obtener una conversión inicial teórica del 95%. Los valores utilizados fueron de 0.08ml/min para 40°C y 0.18ml/min para temperatura ambiente.

Dimensiones del reactor : se utilizó un reactor de columna con un diámetro de 2 cm y una altura mayor a la altura alcanzada por la enzima inmovilizada durante la operación.

Carga enzimática del reactor : en cada experiencia se utilizó una

carga de 2.2 g de enzima inmovilizada de las características señaladas anteriormente.

La operación del reactor se realizó con flujo ascendente del sustrato. La temperatura se controló mediante la circulación de agua a la temperatura de operación a través de la chaqueta del reactor.

Durante la operación del reactor se tomaron muestras en el tiempo, a las que se les determinó la concentración de glucosa mediante el método colorimétrico enzimático glucostat (kit N°510-A, Sigma Chemical Co.). Con el valor obtenido en estas determinaciones y las relaciones estequiométricas de la reacción de hidrólisis de la lactosa, se determinó el grado de conversión en función del tiempo.

RESULTADOS

Caracterización cinética

En la gráfica de inversos de Lineweaver Burk de la figura 12 se entregan los resultados obtenidos en la evaluación cinética preliminar del catalizador. De la correlación lineal de los inversos de la concentración de sustrato y velocidad inicial de reacción se obtuvo un valor de K_m de 161.6 mM (55.3 g/l) para la lactasa inmovilizada en quitina, valor que corresponde a aproximadamente 10 veces el valor obtenido para la enzima soluble. Este valor de K_m es aparente y podría estar indicando la presencia de restricciones difusionales de consideración.

Estabilidad operacional

En las figuras 13 y 14 se grafican los grados de conversión, expresados como porcentaje del grado de conversión máximo, obtenidos en función del tiempo de operación del reactor para las temperaturas estudiadas, 20-25°C y 40°C respectivamente.

De la regresión lineal del $\log(\%$ del grado de conversión máximo) versus tiempo de operación se obtuvieron los siguientes tiempos de vida media: 13 horas para 40°C y 35 días para 25°C, considerando como tiempo de vida media al tiempo de operación al cual se tiene un 50% de la conversión inicial.

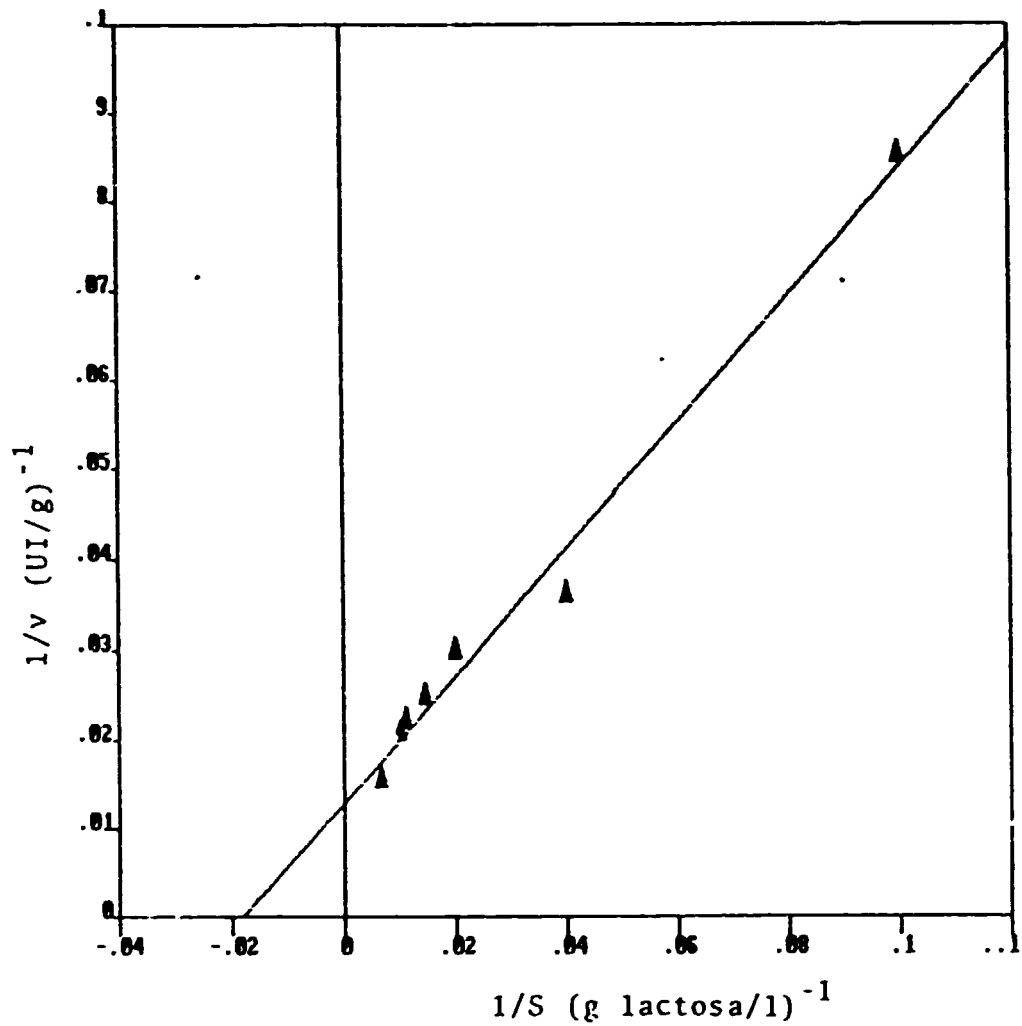


Figura 12 : Efecto de la concentración de lactosa sobre la velocidad inicial de reacción de la lactasa comercial inmovilizada en quitina. (40°C pH 6.6)

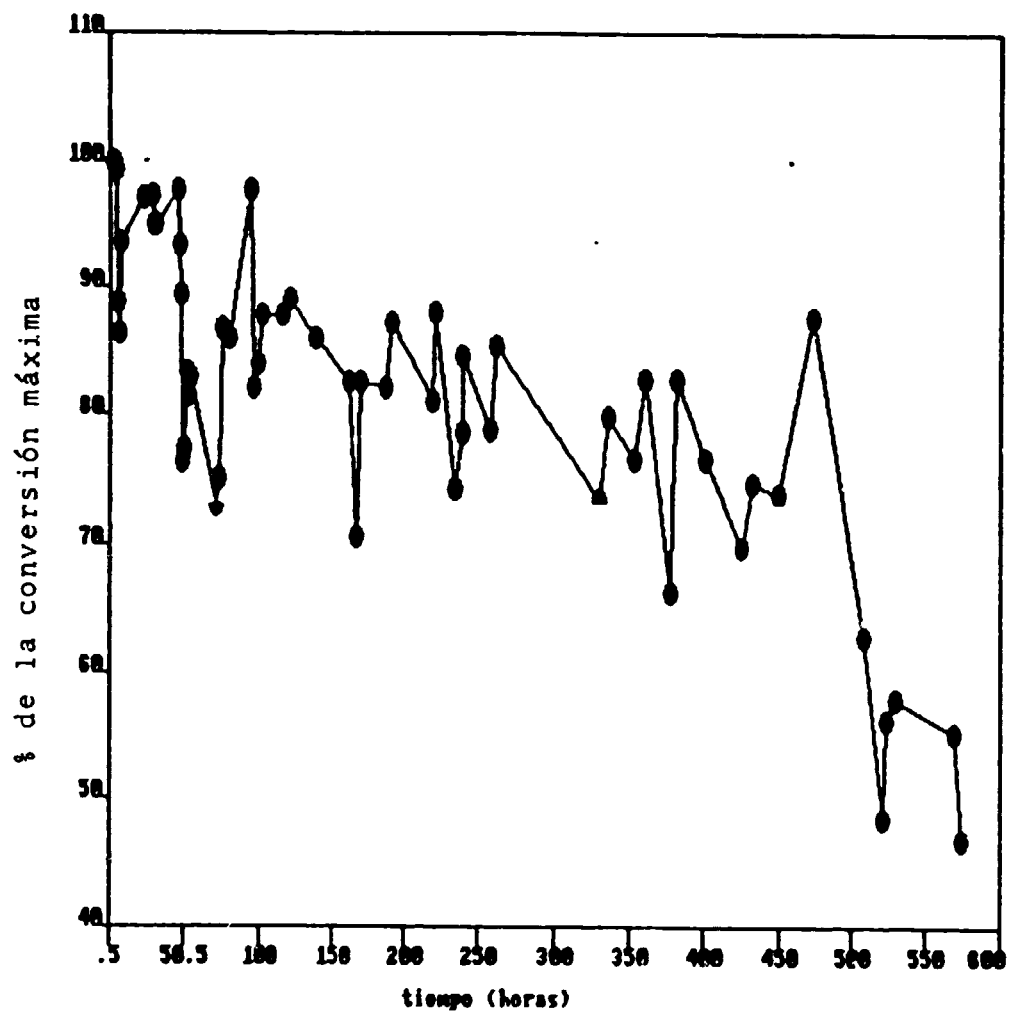


Figura 13 : Estabilidad operacional de la lactasa comercial inmovilizada en quitina a temperatura ambiente (20-25°C).

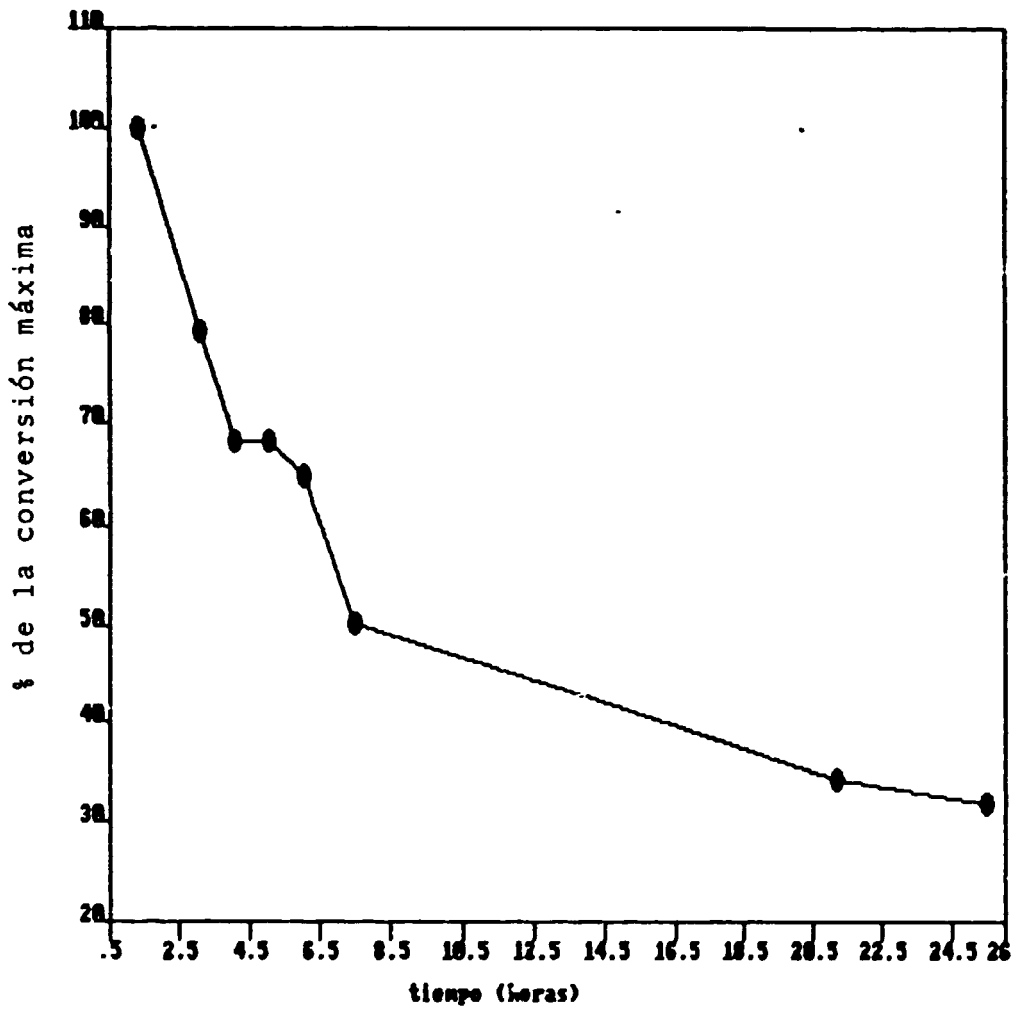


Figura 14 : Estabilidad operacional de la lactasa comercial inmovilizada en quitina a 40°C.

APENDICE 1.

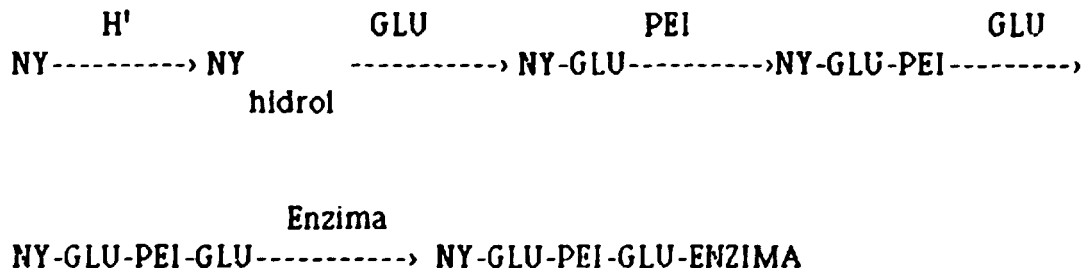
INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA DE KLUYVEROMYCES FRAGILIS SOBRE NYLON.

Uno de los materiales seleccionados como soporte, por diversas razones (costo, disponibilidad, buenas propiedades mecánicas y estabilidad química) fue nylon.

En Chile se dispone sin restricciones de nylon 6 en partículas de tamaño aproximado 0.5 x 0.2 cm.

Aunque la disponibilidad de malla de nylon es menor que para las partículas, también se contempla inmovilizar la enzima sobre ella porque experiencias previas indican que es posible inmovilizar sobre esta forma de nylon.

Se considera la inmovilización de β -Galactosidasa de K. fragilis en forma covalente a nylon en partículas y malla de nylon de acuerdo al siguiente esquema de reacciones:



Las reacciones involucradas pueden resumirse a continuación:

- 1.- Pre-hidrólisis ácida (H') del nylon para exponer mayor cantidad de grupos amino reactivos.
- 2.- Unión de Glutaraldehído (GLU) a los grupos amino expuestos en el nylon.
- 3.- Reacción del complejo anterior con Polietilenimina (PEI) como elemento de entrecruzamiento con el glutaraldehído para lograr mayor superficie de enlace disponible a la enzima.
- 4.- Activación final con Glutaraldehído (GLU) el cual reaccionará finalmente en forma covalente con la enzima.

Las condiciones experimentales de estas cuatro etapas son las mismas descritas en Informe Proyecto FONDECYT 89-0288 de Diciembre 1989.

INMOVILIZACION DE β -GALACTOSIDASA A NYLON EN PARTICULAS

a) MOLIENDA del NYLON.

Las partículas disponibles (0.5 x 0.2 cm) debieron ser reducidas en su tamaño mediante molienda ya que por un lado ellas deben presentar una superficie que sea capaz de unir una cantidad adecuada de enzima y por otro lado al ser usadas en un reactor deben permitir su empleo sin problemas de compactación y caídas de presión.

La molienda del nylon en partículas se realizó en un molino de martillo. A partir de 200 g de nylon se obtuvieron las siguientes fracciones.

Tamaño partícula u	gramos	%
> 500	82.3	41.1
500 - 315	58.3	29.1
315 - 250	8.7	4.4
< 250	11.3	5.7
TOTAL	160.6	80.3

La eficiencia del proceso de molienda fue de un 80.3%. Por el tamaño de partícula y el rendimiento obtenido se continuará trabajando en las etapas posteriores con la fracción de tamaño 500 - 315 u, que es la que más se acerca con un rendimiento aceptable (29%) a un tamaño de partícula adecuado para fines prácticos. El molino empleado da un bajo rendimiento en la fracción de interés, pero no se dispone de otro molino en la Universidad de Concepción que sea capaz de moler las partículas de nylon que son extremadamente duras.

La fracción > 500 u fue sometida a una segunda molienda sin mayor éxito, ya que el rendimiento en la fracción de interés (315 - 500 u) en esta segunda etapa fue muy escaso.

b) PRE-HIDROLISIS del NYLON.

En esta etapa se considera un tratamiento ácido del nylon (fracción 315 - 500 u) para hidrolizar uniones amida secundarias, que liberaran grupos amino y carboxilicos transformando al nylon en un soporte con mayor número de grupos funcionales disponibles para ser activados posteriormente e inmovilizar la enzima de interés covalentemente a él.

De acuerdo a experiencias previas de hidrólisis de nylon en polvo (HCl 3.5 M y temperatura de 50°C durante tiempos cortos de 2 - 6 horas) que no dieron una cantidad de grupos amino libres que permitieran unir una cantidad adecuada de enzima se ensayaron condiciones de hidrolisis mas drásticas.

En base a los resultados obtenidos anteriormente (FONDECYT In. 89) se decidió ensayar las siguientes condiciones. HCl 3.5 M (40 ml/g de nylon) 50 °C y tiempos mayores que 2 -6 horas con agitación mediante una varilla giratoria. A continuación se exponen muestras así tratadas.

HCl 3.5 M
50 °C
Agit. con
varilla

Nylon
 sin hidrolizar

fracción
 500-315µ

3 h
 %recup 91.4
 50 °C

5 h
 %recup 90.6
 50 °C

3 h
 %recup 91.6
 50 °C

15 h
 %recup 86.5
 50 °C

25 h
 %recup 80.1
 50 °C

Durante la hidrólisis del nylon se pierde alrededor del 10% del material porque parte de él se solubiliza y se elimina durante el lavado obteniéndose un líquido turbio que contiene un polvo muy fino no recuperable al filtrar por papel.

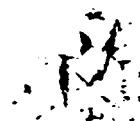
Al ensayar condiciones de hidrólisis más drásticas como HCl 4.17 M (40 ml/g nylon), 50 °C durante 6 y 13 horas (agitación con varilla) el nylon se solubilizó casi completamente obteniéndose un polvo muy fino con escasa recuperación (2.7% y 2.1%).

HCl 4.17 M

50 °C

Agit. con
varilla

6 h	
50 °C	13 h
	50 °C



A las muestras de nylon hidrolizadas obtenidas no se les ha determinado contenido de grupos amino libres después de la hidrólisis. La titulación ácido-base en medio acuoso de los grupos amino libres no ha dado resultados confiables, ya que muestras de nylon hidrolizadas en condiciones muy diferentes con respecto al tiempo, no muestran diferencias notables en el contenido de grupos NH_2 . Probablemente esto se debe a que es una reacción de titulación que ocurre en un medio heterogéneo, donde la reactividad de los grupos titulables con el titulante es demasiado lenta.

La mayoría de los métodos descritos en bibliografía para cuantificar grupos amino implican la solubilización de la muestra, lo que en este caso no es aplicable.

Actualmente se está ensayando un método para cuantificar los grupos $-\text{COOH}$ libres en medio no acuoso. Los grupos $-\text{COOH}$ son equivalentes a los grupos amino presentes en el nylon.

Por razones prácticas no se pudo disponer de la varilla giratoria para agitar las muestras de nylon durante el proceso de hidrólisis por lo que las

muestras que se hidrolizaron a continuación fueron agitadas con una barra magnética.

Las condiciones de hidrólisis fueron HCl 3.5 M , 50 °C , tiempos de 8 y 15 horas , agitación con barra magnética.

HCl 3.5 M

50 °C

Agit. con
barra mag.

Nylon sin hidrolizar

8 h
%recup. 36,6
50 °C

15 h
%recup. 85,0
50 °C

Comparando estas muestras con las anteriores tratadas en forma similar, con excepción de la forma de agitación, se observa que las muestras agitadas con barra magnética presentan a simple vista un tamaño de partícula inferior a las agitadas con varilla. Esto significa que la barra magnética tiene un efecto abrasivo sobre el nylon.

Debido a que la agitación magnética posee un efecto sobre el nylon que es reducir el tamaño de las partículas de éste a simple vista , se decidió disminuir la temperatura de hidrólisis a 40°C manteniendo las otras condiciones (HCl 3.5 M , agitación con barra magnética y tiempos de 3 , 6 y 15 horas).

HCl 3.5 M

40 °C

Agit. con
barra magn.

3 h
%recup. 84,5
40 °C

6 h
%recup. 85,4
40 °C

15 h
%recup. 76,7
40 °C

Al observar estas tres muestras se ve que a las 15 horas de tratamiento ácido se ha reducido el tamaño de las partículas de nylon en forma visible y la recuperación de material después de la hidrólisis es de un 76.7%.

Considerando que para el nylon hidrolizado durante 6 h no se redujo en forma tan notoria el tamaño de las partículas, se emplea esta muestra de nylon hidrolizado para continuar el proceso de inmovilización de la enzima.

El método para evaluar la disponibilidad de grupos reactivos en el nylon está siendo evaluado y con él serán analizadas todas las muestras de nylon hidrolizado hasta ahora obtenidas.

c) OBTENCION DE UN SOPORTE PARA INMOVILIZAR β -GALACTOSIDASA A PARTIR DE NYLON EN POLVO.

Siguiendo el esquema experimental anteriormente descrito se obtiene a partir de nylon molido (partícula 500- 315 u) e hidrolizado con HCl 3.5 M (40 ml/g de nylon) a 40 °C con agitación con barra magnética, ^{durante 6 horas} un soporte para inmovilizar β -Galactosidasa.

Efecto del brazo espaciador.

En primer término se evaluará el efecto que tiene sobre el proceso de inmovilización la longitud del brazo espaciador inmovilizando enzima sobre los siguientes soportes:

Nylon hidrolizado (HCl 3.5 M, 40°C, agitación con barra magnética y t = 6 h) al que se le adosa un brazo espaciador de diferente longitud:

Ny- GLU

Ny- GLU- PEI

Ny- GLU-PEI-GLU

	Ny-GLU	Ny-GLU- PEI	Ny-GLU- PEI-GLU
ENZIMA Contactada			
UI/g soporte seco	3493	3493	3493
ENZIMA REMANENTE			
UI	2712,2	2509,2	2584,0
%	77,7	71,8	74,0
ENZIMA INMOVILIZADA			
UI/g soporte seco	12,1	15,3	38,9
RI %	0,35	0,43	1,1
ENZIMA PERDIDA			
%	22,0	27,7	24,9

El tiempo de contactación en estas experiencias fue de 6 horas, en presencia de ditioeritritol para proteger a la enzima de la inactivación. Las actividades enzimáticas fueron medidas con lactosa (método Glucemia Enzimática).

De la tabla anterior se desprende que la cantidad de enzima que permanece en el remanente es similar para todos los soportes y es alta. Esto significa que la mayor proporción de la enzima contactada (10 mg/g soporte seco) no es unida al soporte.

Para el soporte Ny-GLU-PEI-GLU es mayor la cantidad de enzima que se expresa como actividad inmovilizada (38,9 UI/g de soporte seco), por lo tanto puede afirmarse que la mayor longitud del brazo espaciador posee un efecto beneficioso sobre la actividad que manifiesta la enzima inmovilizada. Teniendo en cuenta estos resultados, donde la mayor parte de la enzima contactada permanece en la solución remanente, se está actualmente obteniendo un soporte Ny-GLU-PEI-GLU a partir del nylon tratado con HCl 3.5 M, 40 °C, agitación con barra magnética durante tiempo más prolongado (15 horas) aún cuando este nylon es reducido a simple vista en su tamaño molecular durante el período de hidrólisis. Estos resultados aún no están disponibles.

De los datos anteriores también se observa que el % de enzima perdida es similar para todos los soportes. La enzima perdida no correspondería a enzima soluble que se inactiva durante el proceso de contactación, ya que se

hizo un experimento BLANCO en que se mantenía enzima soluble bajo las condiciones de contactación (Temperatura, pH, agitación, pero sin presencia de soporte), no observándose para ésta, pérdida apreciable de su actividad. El rendimiento de inmovilización tiene valores muy bajos que probablemente pueden ser optimizados variando la razón E/S (Enzima/Soporte), experimentos que se harán a continuación y que por lo tanto no son incluidos en el presente informe.

Efecto del tiempo y pH de contactación.

Se ensayarán los pH de 6.6 y 8.5 (por ser compatibles con la estabilidad de la enzima) durante la etapa de contactación de la enzima con el soporte NY-GLU-PEI-GLU a diferentes tiempos (6, 15 y 20 horas). El pH 8.5 fue seleccionado por favorecer la reacción química que ocurre durante el proceso de unión covalente de la enzima con los grupos aldehído del glutaraldehído.

A	B	C			E	F		G
		pH 6.6				pH 8.5		
TIEMPO DE CONTACT.	6 h	15 h	20 h	6 h	15 h	20 h		
ENZIMA CONTACTADA								
UI/ g soporte seco	3493	3493	3493	3493	3493	3493	3493	
ENZIMA REMANENTE								
UI	253.4	2609.7	2816.4	3274.7	2957.7	2680.8		
%	7.4	80.4	80.6	93.7	84.7	76.8		
ENZIMA INMOVILIZADA								
UI/ g soporte seco	38.9	23.8	16.1	35.9	20.3	12.7		
RI %	1.1	0.68	0.46	1.03	0.58	0.36		
ENZIMA PERDIDA								
%	24.9	18.9	18.9	5.2	14.7	22.9		

De los resultados de la tabla se desprende que, tanto para pH 6.6 como para pH 8.5 los mejores valores de carga enzimática se logran con tiempos de contactación de 6 horas, siendo en estos casos también mayor el rendimiento de inmovilización.

El pH 8.5 de contactación no favorecería el proceso de inmovilización con respecto al pH originalmente planteado (pH 6.6).