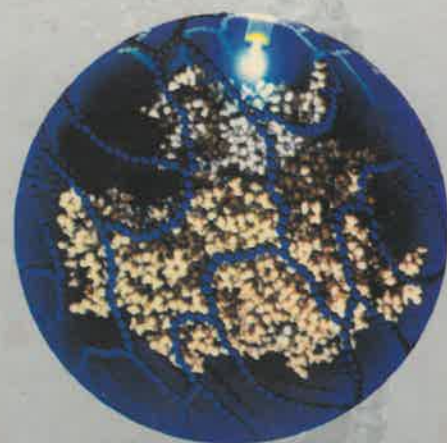


Desactivación del sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa

OPERACIÓN EN REACTOR DISCONTÍNUO

**M^a Dolores Romero Zúñiga
Luis Enrique Romero Zúñiga
Domingo Cantero Moreno**



**Servicio de Publicaciones
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**



DESACTIVACIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO
GLUCOSA OXIDASA-CATALASA
OPERACIÓN EN REACTOR DISCONTINUO

DESACTIVACIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO
GLUCOSA OXIDASA-CATALASA
OPERACIÓN EN REACTOR DISCONTINUO

*Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos
y Tecnologías del Medio Ambiente*

M.^a Dolores Romero Zúñiga
Luis Enrique Romero Zúñiga
Domingo Cantero Moreno



SERVICIO DE PUBLICACIONES
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
2000

Romero Zúñiga, María Dolores

Desactivación del sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa: operación en reactor discontinuo / M.^a Dolores Romero Zúñiga, Luis Enrique Romero Zúñiga, Domingo Cantero Moreno. – Cádiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad, 2000. – 136 p.

ISBN 84-7786-678-3

1. Glucosa. 2. Oxidasa. 3. Enzimas inmovilizadas. 4. Enzimas-Cinética. I. Romero Zúñiga, Luis Enrique. II. Cantero Moreno, Domingo. III. Universidad de Cádiz. Servicio de Publicaciones, ed. IV. Título

577.15

Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz

© M.^a Dolores Romero Zúñiga
Luis Enrique Romero Zúñiga
Domingo Cantero Moreno

Fotocomposición: Consegraf

Diseño: Creasur

I.S.B.N.: 84-7786-678-3

Depósito Legal: H-44-2001

Imprime: Essan Graphic, S.L. Punta Umbría (Huelva).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	15
2.1. GENERALIDADES.	17
2.2. PRODUCCIÓN FERMENTATIVA DE ÁCIDO GLUCÓNICO.	17
2.2.1. Proceso fermentativo.	17
2.2.2. Recuperación del producto.	20
2.3. PRODUCCIÓN BIOQUÍMICA DE ÁCIDO GLUCÓNICO.....	20
2.3.1. Enzimas implicadas en la producción de ácido glucónico.....	20
2.3.2. Ventajas del proceso bioquímico frente al proceso fermentativo.....	20
2.4. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE REACCIÓN.....	21
2.4.1. La enzima glucosa oxidasa (GOD).....	21
2.4.1.1. Características de la enzima.....	22
2.4.1.2. Aplicaciones industriales de la enzima.....	22
2.4.2. La enzima catalasa (CAT).....	23
2.4.2.1. Características de la enzima.....	23
2.4.2.2. Aplicaciones industriales de la enzima.....	24
2.4.3. El producto de reacción: ácido glucónico; gluconatos.....	24
2.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA EN SISTEMA HOMOGÉNEO	24
2.5.1. Cinética de la enzima glucosa oxidasa en solución.....	25
2.5.1.1. Mecanismo de tipo “ping-pong” 1.....	25
2.5.1.2. Mecanismo de tipo “ping-pong” 2.....	28
2.5.1.3. Mecanismo de tipo Michaelis-Menten. (Simplificación monosustrato).....	31
2.5.2. Cinética de la enzima catalasa en solución.....	33
2.5.2.1. Mecanismo de tipo Michaelis-Menten.....	33
2.5.2.2. Mecanismo de Jones.....	35
2.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA	36
2.6.1. Influencia del pH.....	36
2.6.2. Influencia de la temperatura.....	38

2.7. CINÉTICA DE DESACTIVACIÓN ENZIMÁTICA	
EN SISTEMAS HOMOGÉNEOS	41
2.7.1. Desactivación por desnaturalización	42
2.7.2. Influencia de la desactivación en la cinética enzimática.....	44
2.7.3. Cinética de desactivación de la enzima glucosa oxidasa en solución.....	45
2.7.3.1. Mecanismo de tipo “ping-pong”	45
2.7.4. Cinética de desactivación de la enzima catalasa en solución.....	47
2.7.4.1. Mecanismo de tipo Michaelis-Menten.....	47
2.7.4.2. Mecanismo de tipo Jones	48
2.8. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA	48
2.8.1. Métodos de inmovilización para enzimas solubles en medio acuoso	50
2.8.1.1. Métodos físicos	50
2.8.1.1.1. Adsorción	50
2.8.1.1.2. Atrapamiento.....	50
2.8.1.2. Métodos químicos	54
2.8.1.2.1. Entrecruzamiento	54
2.8.1.2.2. Enlace iónico.....	54
2.8.1.2.3. Enlace metálico.....	54
2.8.1.2.4. Enlace covalente	55
2.8.2. Métodos de inmovilización para enzimas insolubles en medio acuoso	58
2.8.2.1. Inmovilización de enzimas insolubles sin derivación.....	58
2.8.2.2. Inmovilización de enzimas insolubles por derivación.....	58
2.9. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA POR ATRAPAMIENTO EN GELES	
DE ALGINATO.....	58
2.9.1. Fuentes de obtención de alginatos	59
2.9.2. Estructura química de los geles de alginato	60
2.9.3. Propiedades funcionales de los geles de alginato.....	61
2.9.4. Partículas de geles de alginato.....	62
2.9.4.1. Tamaño de partícula	62
2.9.4.2. Propiedades mecánicas.....	62
2.9.4.3. Estabilidad química	63
2.9.4.4. Difusión molecular y tamaño de poro.....	63
2.10. FENÓMENOS DE DIFUSIÓN EN LA INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA...	65
2.10.1. Difusión externa. Teoría de la capa límite.....	65
2.10.2. Difusión interna	69
2.10.3. Factor de eficacia	70
3. MATERIALES Y MÉTODOS	71
3.1. ENZIMAS Y MEDIO DE REACCIÓN	73
3.1.1. Enzima glucosa oxidasa.....	73
3.1.2. Enzima catalasa.....	73
3.1.3. Medio de reacción.....	73

3.2. INMOVILIZACIÓN. SOPORTE DE ALGINATO CÁLCICO	74
3.2.1. Técnica de inmovilización y obtención de partículas.....	74
3.2.2. Características de las partículas	75
3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS	76
3.3.1. Determinación de glucosa.....	76
3.3.2. Determinación de peróxido de hidrógeno.....	76
3.4. EQUIPOS	77
3.4.1. Reactor de tanque agitado.....	77
3.4.1.1. Descripción del reactor	77
3.4.1.2. Transferencia de oxígeno en el reactor	77
3.4.2. Equipo de adquisición y control de datos.....	78
3.4.2.1. Variables a detectar.....	79
3.4.2.2. Dispositivo de toma de muestras	79
3.4.2.3. Constitución y disposición del equipo de adquisición y control de datos	79
3.4.2.3.1. Módulo de pH	81
3.4.2.3.2. Módulo de temperatura.....	81
3.4.2.3.3. Módulo de oxígeno disuelto	81
3.4.2.3.4. Módulo de conductividad	81
3.4.2.3.5. Bombas.....	81
3.4.2.3.6. Tomamuestras	82
3.4.2.3.7. Placa de adquisición y ordenador	82
3.4.3. Programa de adquisición y control	83
3.5. PLANIFICACIÓN Y METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN.....	83
3.5.1. Experimentos con glucosa oxidasa en solución	85
3.5.1.1. Plan de trabajo.....	85
3.5.1.1.1. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato.....	85
3.5.2. Experimentos con catalasa en solución	85
3.5.2.1. Plan de trabajo.....	85
3.5.2.1.1. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato.....	85
3.5.3. Experimentos con glucosa oxidasa y catalasa en solución.....	86
3.5.3.1. Plan de trabajo.....	86
3.5.3.1.1. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato.....	86
3.5.4. Experimentos con glucosa oxidasa y catalasa co-inmovilizadas sobre partículas de alginato cálcico	86
3.5.4.1. Plan de trabajo.....	86
3.5.4.1.1. Estudio de la influencia del tamaño de partícula.....	87
3.5.4.1.2. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato..	87
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
4.1. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON GLUCOSA OXIDASA EN SOLUCIÓN	91
4.1.1. Estudio de actividad relativa para distintas concentraciones iniciales de sustrato..	91

4.1.2. Estudio de actividad relativa durante el desarrollo de la reacción	93
4.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON CATALASA EN SOLUCIÓN.....	98
4.2.1. Estudio de actividad relativa para distintas concentraciones iniciales de sustrato ..	98
4.2.2. Estudio de actividad relativa durante el desarrollo de la reacción	100
4.3. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA EN SOLUCIÓN.....	104
4.3.1. Estudio de actividad relativa para distintas concentraciones iniciales de sustrato....	104
4.3.2. Estudio de actividad relativa durante el desarrollo de la reacción	104
4.4. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA CO-INMOVILIZADAS EN PARTÍCULAS DE ALGINATO CÁLCICO	109
4.4.1. Resultados de los experimentos realizados con partículas de 3 mm de diámetro	109
4.4.1.1. Estudio de actividad relativa para distintas concentraciones iniciales de sustrato	109
4.4.1.2. Estudio de actividad relativa durante el desarrollo de la reacción	112
4.4.2. Resultados de los experimentos realizados con partículas de 5 mm de diámetro...	114
4.4.2.1. Estudio de actividad relativa para distintas concentraciones iniciales de sustrato	114
4.4.2.2. Estudio de actividad relativa durante el desarrollo de la reacción	116
4.5. MODELOS CINÉTICOS PROPUESTOS	119
4.5.1. Modelo cinético basado en ecuaciones polinómicas	119
4.5.2. Modelo cinético basado en ecuaciones fenomenológicas	121
4.5.2.1. Ecuación teórica propuesta para la desactivación de la enzima glucosa oxidasa	122
4.5.2.2. Ecuación teórica propuesta para la desactivación de la enzima catalasa	123
4.5.2.3. Ecuación teórica propuesta para la desactivación de ambas enzimas en solución e inmovilizadas en partículas de alginato cálcico	123
4.6. VALIDACIÓN DEL MODELO CINÉTICO PROPUESTO.....	124
4.7. PREDICCIONES DEL MODELO TEÓRICO.....	126
5. CONCLUSIONES	129
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

1. INTRODUCCIÓN

Son muchos los procesos industriales, actualmente desarrollados por fermentación, susceptibles de realizarse en reactores enzimáticos con rendimientos elevados y minimización de las etapas de separación. En este sentido, los procesos fermentativos registran consumo de sustrato, al trabajar con microorganismos, que no es directamente empleado en la formación de producto sino en su propio mantenimiento celular. Debido a la complejidad de las rutas bioquímicas desarrolladas en su interior es posible la formación de productos secundarios cuando se modifican las condiciones de operación: pH, temperatura, etc. Y por otra parte, siempre es preciso emplear etapas de separación del producto de interés.

La utilización de reactores enzimáticos vendría a solventar los problemas de cualquier fermentación convencional, aunque pasarían primero por la necesaria inmovilización de las enzimas en un soporte adecuado y requerirían el mantenimiento de su actividad durante largos periodos de tiempo, dado su elevado coste.

Es precisamente en esta línea donde se inserta el trabajo realizado en la presente memoria, en la que se ha desarrollado el estudio de la cinética de desactivación de las enzimas glucosa oxidasa (GOD) y catalasa (CAT). En dicho sistema, la enzima glucosa oxidasa actúa como enzima principal oxidando glucosa hasta ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, mientras la enzima catalasa favorece la descomposición de dicho compuesto. Ambas enzimas son desactivadas por el peróxido de hidrógeno de forma irreversible.

Se propone un soporte adecuado para la inmovilización de ambas enzimas y se cuantifica cual es su contribución a la estabilidad del conjunto enzimático, proponiendo ecuaciones de desactivación de tipo polinómico (empíricas) y basadas en un mecanismo cinético con significado físico claro.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. GENERALIDADES.

En los seres vivos, los catalizadores que hacen aumentar las velocidades de reacción son unas proteínas, denominadas enzimas^[Brock, 1978]. La enzima glucosa oxidasa cataliza la reacción de oxidación de glucosa para generar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. La enzima catalasa, se encuentra íntimamente relacionada con ésta en la naturaleza, de hecho, ambas enzimas suelen formar parte del conjunto enzimático de aquellos microorganismos capacitados para realizar la oxidación de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) hasta ácido glucónico ($C_6H_{12}O_7$).

El ácido glucónico puede obtenerse utilizando un determinado microorganismo, que desarrollado en un medio adecuado sea capaz de sintetizarlo, esto es, puede obtenerse por vía fermentativa. O bien, empleando directamente, en solución o inmovilizada, la enzima implicada en el proceso de oxidación de la glucosa para obtener dicho compuesto.

2.2. PRODUCCIÓN FERMENTATIVA DE ÁCIDO GLUCÓNICO.

Actualmente el ácido glucónico se está fabricando mediante procesos fermentativos. Concretamente, están utilizándose, sobre todo, cepas de *Aspergillus niger*^[Bu'lock et al., 1991]. Sin embargo, existen otros muchos microorganismos capaces de sintetizarlo, como *Pullularia pullulans*, especies de *Penicillium*, *Gliocladium*, *Scopulariopsis*, *Gonatobotrys* y *Endomycopsis*^[Atkinson y Mavittuna, 1987] entre otros.

En la TABLA 1 se presentan los parámetros característicos de los procesos fermentativos, para la producción de ácido glucónico y gluconatos, en cepas de *Aspergillus* y *Penicillium*. Por ser estos dos géneros los más productivos en este campo.

2.2.1. PROCESO FERMENTATIVO.

Los medios fermentativos para estos procesos, son soluciones de glucosa monohidrato (jarabe de glucosa) que deben contener fuentes de nitrógeno, fosfato, potasio, magnesio, y elementos traza. Utilizándose a veces líquidos de maceración de maíz o extracto de levadura como nutrientes supletorios.

El medio de fermentación es inoculado, generalmente, con una suspensión de esporas de *Aspergillus niger*, pre-crecido por germinación de dicha suspensión de esporas en un medio similar al medio de fermentación.

El proceso fermentativo se lleva a cabo en tanques aireados y agitados de acero inoxidable, con sistemas controladores de temperatura y pH. Si el medio se vuelve demasiado ácido, se inhibe la formación del ácido glucónico, siendo necesario añadir álcalis, como carbonato cálcico al comienzo de la fermentación o hidróxido sódico, durante la fermentación.

Microorganismo	Tipo de fermentación	[glucosa] (%)	Temperatura (°C)	Duración (h)	Productos principales	Producción ^a (%)
<i>Acetobacter gluconicum</i>	superficie	5	30	96	ácido glucónico	71,8 - 77,2
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3	sumergido	24 - 30	33,0 - 34,4	<40	gluconato sódico	—
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 67	sumergido	11,5	30	9	ácido glucónico + gluconato cálcico	—
	sumergido	15,5	30	18	ácido glucónico + gluconato cálcico	97,1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	sumergido	20	30	53	ácido glucónico + gluconato cálcico	80,0
	sumergido	20	30	192	ácido glucónico + gluconato cálcico	80,0 - 87,0
	superficie	20 - 25	30	192 - 240	ácido glucónico + gluconato cálcico	60,0
<i>P. luteum purpurogenum</i> <i>var. rubrisclerotium</i>	superficie	20 - 25	25	216	ácido glucónico	55,0 - 65,0

^a: Basado en glucosa consumida.

TABLA 1. Datos de producción de ácido glucónico y gluconatos a partir de procesos fermentativos con distintas cepas (Akinoson y Meritum, 1987).

Un problema importante del proceso consistía en la cristalización de los gluconatos sódico y cálcico a concentraciones altas de glucosa inicial, lo cual generaba graves problemas, la solución fue dada por Pabst (Patente Británica 1249347). Al principio de la fermentación sólo se añade parte de la glucosa y se controla el pH a 6.5 por adición de hidróxido sódico. Con posteriores adiciones de glucosa desciende el pH hasta 3.8 aproximadamente, produciéndose de este modo una mezcla no cristalizable de ácido gluconico y gluconato sódico.

A continuación se presenta un esquema del proceso de fabricación de gluconato sódico (FIGURA 1).

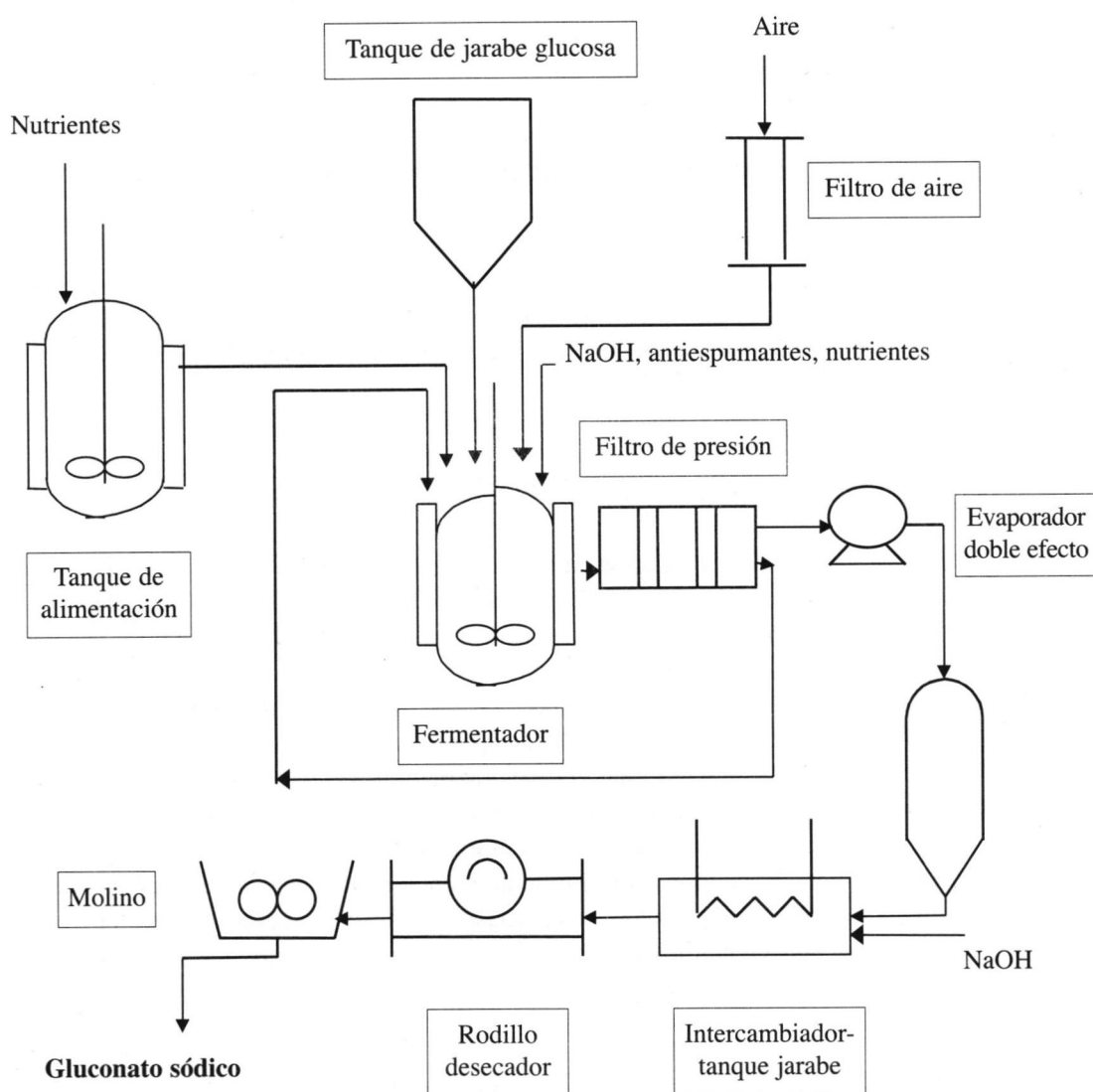


FIGURA 1. Diagrama de flujo del proceso industrial para la obtención de gluconato sódico por fermentación [Bu'lock et al., 1991].

2.2.2. RECUPERACIÓN DEL PRODUCTO.

Cuando se utiliza carbonato cálcico como agente neutralizante la recuperación del ácido glucónico se realiza eliminando el micelio por filtración. Posteriormente se precipita el sulfato cálcico. El ácido glucónico se evapora hasta una solución del 50 % en p/v. En la FIGURA 1 puede verse cómo además del evaporador, son necesarias tres etapas posteriores para conseguir separar completamente el producto de reacción. Así, si lo que se pretende recuperar es glucono- δ -lactona; la lactona cristaliza directamente a partir de soluciones de ácido glucónico, después de la evaporación en condiciones controladas.

Por lo tanto, es posible afirmar que la recuperación del producto en proceso fermentativo encarece sensiblemente los costes de producción, debido a la dificultad que conlleva la separación del producto, en el medio de reacción.

2.3. PRODUCCIÓN BIOQUÍMICA DE ÁCIDO GLUCÓNICO.

La reacción esencial, en la producción del ácido glucónico, es la eliminación por la enzima glucosa oxidasa de dos átomos de hidrógeno de la molécula glucosa para producir glucono- δ -lactona. Ésta se oxida espontáneamente o mediante la enzima gluconolactonasa^[Bu'lock et al., 1991].

2.3.1. ENZIMAS IMPLICADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO.

La posibilidad de realizar la oxidación catalítica de glucosa para la obtención de ácido glucónico y derivados, utilizándose directamente la enzima GOD; en solución o inmovilizada, *sin necesidad de utilizar el microorganismo*, abre un enorme rango de posibilidades aún poco estudiado.

Como se ha indicado anteriormente, la enzima glucosa oxidasa cataliza la reacción de oxidación de glucosa generándose ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este segundo producto de reacción, peróxido de hidrógeno, llega a provocar la desactivación irreversible de la enzima. Una de las opciones para eliminar el peróxido de hidrógeno, es añadir catalasa al medio de reacción, esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno hasta oxígeno y agua^[Romero, 1996]. En este sentido, en la presente memoria se han utilizado, conjuntamente en los experimentos realizados, las enzimas anteriormente mencionadas: glucosa oxidasa y catalasa.

Para la obtención de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa se suelen emplear procesos en los que generalmente intervienen los microorganismos: *Aspergillus niger* y *Penicillium notatum* pudiéndose emplear otros como por ejemplo: *Acetobacter suboxydans*^[Röhr et al., 1983].

2.3.2. VENTAJAS DEL PROCESO BIOQUÍMICO FRENTE AL PROCESO FERMENTATIVO.

A pesar de que en la actualidad la producción del ácido glucónico se lleva a cabo por vía fermentativa, son numerosos los problemas que presenta el proceso:

- Al trabajar con microorganismos, éstos consumen sustrato carbonado no sólo para generar producto, sino también para síntesis de material celular (anabolismo), para producir energía para su propio crecimiento (catabolismo) y para mantenimiento celular. Es obvia la ventaja que presenta la utilización directa de las enzimas implicadas en el proceso, frente a la utilización de los microorganismos. De este modo todo el sustrato consumido es transformado en producto, sin la existencia de consumos adicionales, que repercutan en la conversión.
- Debido a la complejidad de las rutas bioquímicas desarrolladas en los microorganismos, es posible en ciertos casos, la formación de productos distintos del ácido glucónico. Esto ocurre cuando se modifican las condiciones de operación: pH, temperatura, etc.
- El trabajo con microorganismos presenta siempre la incertidumbre de no saber exactamente cuales son las reacciones químicas que están teniendo lugar en su interior, con lo que esto conlleva.
- Se presentan graves problemas hidrodinámicos en el seno del fermentador debido al micelio del hongo, que dificulta seriamente la transferencia de materia en el medio de reacción.
- Cuando el ácido glucónico se obtiene por vía fermentativa, es preciso separarlo del medio de fermentación. Este hecho contribuye a encarecer enormemente el proceso global.

Es posible concluir, que la producción fermentativa del ácido glucónico presenta problemas de operación que podrían eliminarse en gran parte por vía bioquímica empleando técnicas de inmovilización enzimática. Por otra parte, el hecho de que todavía se utilice la producción fermentativa, se debe muy probablemente a la rápida desactivación de la enzima glucosa oxidasa. Este fenómeno implicaría una reposición de la carga enzimática cada vez que finalice un ciclo de trabajo, con el consiguiente incremento de coste.

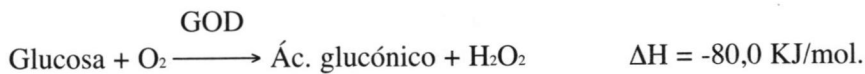
Por todo ello, como se ha comentado en la introducción, el objetivo de la presente memoria es profundizar en el estudio de la cinética enzimática de desactivación del sistema glucosa oxidasa-catalasa. En dicho sistema la enzima catalasa realiza una acción protectora de la enzima principal (GOD); como culminación de los estudios se propondrá un modelo de desactivación de las enzimas GOD y CAT en discontinuo que, junto con el diseño del bio-reactor adecuado permitirá la implantación de este proceso a escala industrial.

2.4. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE REACCIÓN.

A continuación se comentarán las características y aplicaciones industriales más relevantes de las dos enzimas implicadas en el sistema de reacción estudiado; así como del producto de reacción, ácido glucónico.

2.4.1. LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOD).

La enzima glucosa oxidasa (EC.1.1.3.4.), de nombre sistemático β -D-Glucosa: oxígeno-1-oxidoreductasa, cataliza la reacción de oxidación de glucosa hasta ácido glucónico y peróxido de hidrógeno:



2.4.1.1. Características de la enzima.

Los microorganismos que presentan mayor contenido en dicha enzima son: *Penicillium notatum* y *Aspergillus niger*. Dependiendo del microorganismo de procedencia de la enzima, ésta presenta distinto peso molecular; así, cuando procede de *Penicillium notatum* es de 152.000 Da, y cuando proviene de *Aspergillus niger* es de 182.000 Da^[Dixon y Webb, 1979].

Uno de los productos de la reacción que cataliza, el peróxido de hidrógeno, resulta ser un potente inhibidor de la misma, provocando la desactivación irreversible de la molécula. De este hecho se deriva su relación con la enzima catalasa, a la que se dedicará más adelante otro apartado.

2.4.1.2. Aplicaciones industriales de la enzima.

Las aplicaciones industriales de la enzima corresponden a procesos en que se precisa eliminar glucosa u oxígeno^[Bailey y Ollis, 1986].

La glucosa oxidasa pertenece a un amplio grupo de enzimas que catalizan procesos de oxidación: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y colesterol oxidasa; siendo la glucosa oxidasa una de las enzimas más utilizadas en la industria alimentaria como antioxidante. Su utilización previene cambios en el color, aroma y sabor de los alimentos durante su procesado, transporte y almacenamiento. Así pues, se añade a bebidas de cítricos, a la cerveza, al vino, salsas, así como a una gran variedad de alimentos secos, como las mezclas para repostería y a las sopas instantáneas^[Wiseman, 1991].

La vida útil de los alimentos de origen marino puede prolongarse mediante tratamiento con una mezcla de glucosa oxidasa y catalasa. El ácido glucónico que se forma hace descender el pH, inhibiendo así el deterioro microbiano sin afectar las propiedades organolépticas del alimento^[Wiseman, 1991]. Resulta de vital importancia en tecnología de alimentos, aumentar la vida de los productos alimenticios por eliminación continua del oxígeno que difunde a través del envoltorio. Esta aplicación se basa en que la actividad enzimática se mantiene durante largos períodos de tiempo a las temperaturas de almacenamiento de los alimentos, normalmente en frío.

La glucosa oxidasa también se utiliza para eliminar la glucosa residual en los alimentos que contienen huevo y clara batida, previniendo así las reacciones de pardeamiento (reacciones de Maillard, entre glucosa y proteína) y la generación de sabores y olores desagradables^[Wiseman, 1991]. Especialmente se utiliza en el queso en porciones evitándose la formación de compuestos oxigenados asociados con aromas indeseables.

Una de las aplicaciones más relevantes de la enzima es su utilización en análisis clínicos para determinar D-glucosa. Antes de su utilización debe separarse de la catalasa que la contamina, la cual puede catalizar la degradación del peróxido de hidrógeno generado. Esta separación se suele conseguir basándose en el hecho de que la glucosa oxidasa contiene residuos de carbohidratos que pueden ser degradados por la dextranasa o el peróxido de sodio, reduciéndose así la extensión en la que la catalasa interacciona con la glucosa oxidasa, facilitándose la separación de las dos enzimas por cromatografía de columna. Se trata del análi-

sis de un compuesto concreto, D-glucosa, contenida en un medio complejo, fluido fisiológico, que suele realizarse empleando métodos de espectrofotometría o bien electrodos enzimáticos.

Así, la determinación cuantitativa de D-glucosa se realiza por espectrofotometría utilizando GOD (de *Aspergillus niger*) y peroxidasa. Inicialmente la GOD oxida la D-glucosa, dando lugar a la producción de peróxido de hidrógeno, que se ensaya posteriormente por la acción combinada de la enzima peroxidasa y de un colorante redox apropiado, siguiendo espectrofotométricamente la formación del producto coloreado^[Bergmeyer, 1974; Gacesa y Hubble, 1990].

Mediante la utilización de electrodos enzimáticos la determinación se realiza de forma más sencilla, rápida y precisa. Normalmente, estos electrodos suelen estar constituidos por una membrana en la que se encuentra inmovilizada la enzima, utilizando muy diversas técnicas^[Fortier et al., 1991; Tatsuma et al., 1994 y Masuda et al., 1994]. En este sentido, Hornby y colaboradores^[Wiseman, 1991] idearon los primeros reactores enzimáticos heterogéneos tubulares abiertos (OTHERs) en los que la enzima estaba unida covalentemente a la superficie interna de un tubo. Usualmente se utiliza un tubo de nylon de 1 mm de calibre impregnado internamente con uno o más enzimas utilizando diversas técnicas. Las preparaciones de glucosa oxidasa se presentan como una de las más estables; su vida útil oscila entre 1 y 18 meses cuando los tubos se almacenan rellenos con un tampón a 4 °C. Se pueden usar de 1.000 a 30.000 veces antes de que se haga aparente una disminución significativa de su actividad. Sin embargo, deben protegerse de los pH extremos, los metales pesados y otros venenos de enzimas. La longevidad de los tubos puede aumentarse añadiendo un agente antimicrobiano a la solución tampón^[Wiseman, 1991].

2.4.2. LA ENZIMA CATALASA (CAT).

La enzima catalasa (E.C. 1.11.1.6.), de nombre sistemático H₂O₂:H₂O₂ oxidoreductasa, cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno hasta oxígeno y agua^[Atkinson y Mavituna, 1987].



2.4.2.1. Características de la enzima.

Esta enzima se encuentra en los peroxisomas de las células de los microorganismos acompañando a la enzima glucosa oxidasa^[Lodish et al., 1986 y Lehninger, 1989].

Los microorganismos que presentan mayor contenido de dicha enzima son: *Penicillium vitale* y *Aspergillus niger*. Cuando la enzima procede de *Aspergillus niger* presenta un peso molecular de 232.000 Da, estando constituida por cuatro subunidades de peso molecular aproximado 57.000 Da y un grupo prostético de protoporfirina, cuyo átomo central es el hierro^[Lehninger, 1989].

Entre las sustancias químicas que inhiben su actividad catalítica se encuentran la urea y, fundamentalmente, el peróxido de hidrógeno, que puede llegar a desactivar la enzima irreversiblemente^[Tse y Gough, 1987; Tse y Leypoldt., 1987; Do y Hossain, 1987; Vasudevan y Weiland, 1990].

2.4.2.2. Aplicaciones industriales de la enzima.

Sus aplicaciones industriales se refieren normalmente a procesos en los que se requiere eliminar peróxido de hidrógeno. Entre estos deben citarse su utilización en la esterilización en frío de la leche y el queso, así como su empleo con igual fin en el blanqueo de textiles y peluquería.

En la industria láctea se utiliza convencionalmente un 0.05 % de H_2O_2 para pasteurizar en frío la leche destinada a la fabricación de quesos y para la conservación de leche en algunos países que no disponen de medios de refrigeración. Este peróxido tiende a reducir el valor alimentario de la leche o el queso, al oxidar algunos aminoácidos, particularmente la metionina. Por ello tras la pasteurización, el peróxido se elimina mediante el empleo de catalasa^[Wiseman, 1991].

Otras aplicaciones significativas son aquellas en las que se requiere la generación de oxígeno de alta pureza para un fin muy específico. Este es el caso de la producción de oxígeno para esterilización en medicina, como nutriente de crecimiento microbiano en farmacia, en la fabricación de cementos porosos y en la industria de producción de goma espuma^[Gerhartz, 1990].

Otra aplicación, relevante desde el punto de vista de los procesos enzimáticos, es el desarrollo de reactores para la producción de ácido glucónico^[Nakao et al., 1994].

2.4.3. EL PRODUCTO DE REACCIÓN: ÁCIDO GLUCÓNICO; GLUCONATOS.

El ácido glucónico, se presenta, como ya se ha mencionado anteriormente, de muy diversas formas: como gluconato de sodio, de calcio, o de hierro, o glucono- δ -lactona, todos ellos fácilmente transformables a ácido glucónico ($C_6H_{12}O_7$), y presentan un amplio abanico de aplicaciones.

El ácido glucónico es utilizado como agente complejante, particularmente para el calcio en formulaciones de detergentes^[Bu'lock et al., 1991]. Suele comercializarse en soluciones al 50% con aplicaciones en la industria láctea, para evitar la formación de "piedras de leche" y en las industrias conserveras, para la limpieza de botes de aluminio.

Los gluconatos de calcio e hierro tienen su aplicación directa en terapias médicas y veterinarias, solventando deficiencias en estos iones, debido principalmente a su elevada solubilidad y una tolerancia adecuada del organismo humano y animal^[Röhr et al., 1983; Bu'lock et al., 1991].

El gluconato sódico es empleado fundamentalmente como secuestrante de iones calcio e hierro, en el lavado alcalino de botellas, en la industria textil y en la limpieza de superficies metálicas.

Por último, es posible encontrar la forma esterificada intramolecularmente, glucono- δ -lactona, cuya aplicación principal es la de acidulante de acción lenta en panadería.

2.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA EN SISTEMA HOMOGÉNEO.

Seguidamente se describe el comportamiento cinético de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa en solución, por separado. Y posteriormente, se realizará un estudio considerando el sistema conjunto de ambas enzimas.

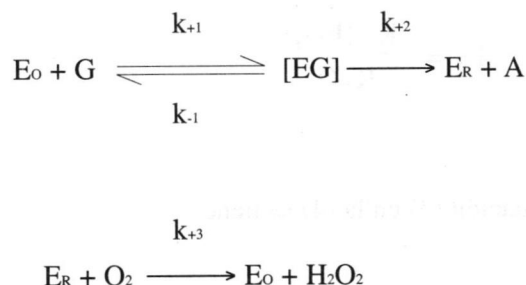
2.5.1. CINÉTICA DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA EN SOLUCIÓN.

El comportamiento de la enzima glucosa oxidasa (GOD) en solución puede explicarse tomando como base dos mecanismos de tipo “ping-pong” simples, conducentes a la misma ecuación de velocidad^[Atkinson y Lester, 1974; Parker y Schwartz, 1987]. Por otra parte, cuando se trabaja en condiciones de saturación de oxígeno, es posible aplicar la ecuación de Michaelis-Menten directamente, obteniendo buenos resultados en la predicción del comportamiento cinético del sistema^[Parker y Schwartz; 1987].

En un mecanismo de tipo “ping-pong”, el producto se obtiene mediante la intervención de dos sustratos, siendo éste un mecanismo típico de reacciones de transferencia de grupos mediante enzimas sustituidas. En el caso concreto del sistema estudiado, la enzima glucosa oxidasa pasa de una forma totalmente oxidada a un estado totalmente reducido y vuelve al estado totalmente oxidado, cerrando el ciclo catalítico.

2.5.1.1. Mecanismo de tipo “ping-pong” 1.

El primero de los mecanismos propuestos^[Parker y Swartz, 1987] es el siguiente:



Donde se tiene:

E_0 : concentración de la forma oxidada de la enzima;

E_R : concentración de la forma reducida de la enzima;

G: concentración de glucosa (reactivo);

A: concentración de ácido glucónico (producto);

[EG]: concentración del complejo enzima-sustrato;

O: concentración de oxígeno disuelto.

Supuesta la hipótesis de estado estacionario, es decir, supuesto que la concentración del complejo enzima-sustrato y enzima reducida en el medio permanecen constantes.

La concentración total de enzima es, E_T :

$$\text{E}_T = \text{E}_0 + \text{E}_R + [\text{EG}]$$

Ecuación 1

y también:

$$\frac{d[EG]}{dt} = K_{+1} E_o G - (K_{-1} + K_{+2}) [EG] = 0$$

Ecuación 2

Por tanto, la concentración de complejo [EG] será:

$$[EG] = \frac{K_{+1} E_o G}{K_{-1} + K_{+2}}$$

Ecuación 3

De la misma forma, la concentración de enzima reducida es la siguiente:

$$\frac{dE_R}{dt} = K_{+2} [EG] - K_{+3} E_R O = 0$$

$$E_R = \frac{K_{+2} [EG]}{K_{+3} O}$$

Ecuación 4

Y sustituyendo la ecuación (3) en la (4) se tiene:

$$E_R = \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}} \right) \left(\frac{K_{+2}}{K_{+3}} \right) \left[\frac{E_o G}{O} \right]$$

Ecuación 5

Si de la ecuación (1) se despeja la concentración de enzima oxidada y se sustituye [EG] y E_R , se tiene:

$$E_o = E_T - \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}} \right) \left(\frac{K_{+2}}{K_{+3}} \right) \frac{E_o G}{O} - \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}} \right) E_o G$$

Ecuación 6

Tomando factor común E_o y agrupando los términos:

$$E_o = \frac{E_T}{\left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}}\right) \left(\frac{K_{+2}}{K_{+3}}\right) \frac{G}{O} + \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}}\right) G + 1}$$

Ecuación 7

Y dividiendo numerador y denominador por G se tiene:

$$E_o = \frac{E_T}{G} \left[\left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}}\right) \left(\frac{K_{+2}}{K_{+3}}\right) \frac{1}{O} + \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}}\right) + \frac{1}{G} \right]$$

Ecuación 8

Por otra parte, la velocidad de formación del producto A será:

$$\frac{dA}{dt} = K_{+2} \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}}\right) E_o G$$

Ecuación 9

Y sustituyendo la expresión de E_o obtenida:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{K_{+2} E_T \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}}\right)}{\left[\frac{1}{G} + \left(\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}}\right) \left(\frac{K_{+2}}{K_{+3}}\right) \frac{1}{O} + \frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}} \right]}$$

Ecuación 10

Simplificando dicha expresión se obtiene la ecuación de velocidad para la formación de ácido glucónico.

$$\frac{dA}{dt} = \frac{K_{+2} E_T}{\left[\frac{\left(\frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}\right)}{G} + \left(\frac{K_{+2}}{K_{+3}}\right) + 1 \right]}$$

Ecuación 11

O también:

$$r_A = r_{\max} \frac{1}{\frac{\beta_G}{G} + \frac{\beta_O}{O} + 1}$$

Ecuación 12

Si se denomina r_A a la velocidad de formación de producto y se tiene en cuenta que $k_2 E_T$ corresponde a la velocidad máxima de la catálisis para la enzima (r_{\max}).

La expresión de las constantes es la que se indica:

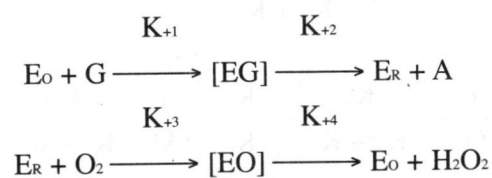
$$\beta_G = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}$$

$$\beta_O = \frac{K_{+2}}{K_{+3}}$$

Ecuación 13

2.5.1.2. Mecanismo de tipo "ping-pong" 2.

El segundo de los mecanismos propuestos^[Atkinson y Lester, 1974] para explicar el comportamiento de la enzima GOD en solución conduce a la misma ecuación cinética que en el primer mecanismo se obtiene, pero se basa en el siguiente esquema de reacción:



Donde se tiene:

- E_o : concentración de la forma oxidada de la enzima;
- E_R : concentración de la forma reducida de la enzima;
- G : concentración de glucosa (reactivo);
- A : concentración de ácido glucónico (producto);
- $[EG]$: concentración del complejo enzima-sustrato;
- $[EO]$: concentración del complejo enzima-oxígeno;
- O : concentración de oxígeno disuelto.

Al igual que en caso del mecanismo 1, la concentración de enzima total es la siguiente:

$$E_T = E_o + E_R + [EG] + [EO]$$

Ecuación 14

Aplicando la hipótesis de estado estacionario:

$$\frac{d[EG]}{dt} = K_{+1}E_oG - K_{+2}[EG] = 0$$

Ecuación 15

$$\frac{d[EO]}{dt} = K_{+3}E_oO - K_{+4}[EO] = 0$$

Ecuación 16

$$\frac{dE_R}{dt} = K_{+2}[EG] - K_{+3}E_RO = 0$$

Ecuación 17

De donde:

$$[EG] = \frac{K_{+1}}{K_{+2}} E_oG$$

Ecuación 18

$$[EO] = \frac{K_{+3}}{K_{+4}} E_RO$$

Ecuación 19

$$E_R = \frac{K_{+1}}{K_{+3}} \frac{E_oG}{O}$$

Ecuación 20

Despejando de la ecuación (14) E_O y sustituyendo las expresiones de $[EG]$, $[EO]$ y E_R se tiene:

$$E_O = \frac{\frac{E_T}{G}}{\left[\frac{K_{+1}}{K_{+3}O} + \frac{K_{+1}(K_{+2} + K_{+4})}{K_{+2}K_{+4}} + \frac{1}{G} \right]}$$

Ecuación 21

La expresión de la velocidad de formación de producto será:

$$r_A = \frac{dA}{dt} = K_{+1}E_O G$$

Ecuación 22

Y si se sustituye la ecuación (21), se tiene:

$$r_A = \frac{K_{+1}E_T}{\left[\frac{1}{G} \frac{K_{+1}}{K_{+3}O} + \frac{K_{+1}(K_{+2} + K_{+4})}{K_{+2}K_{+4}} \right]}$$

Ecuación 23

La transformación de numerador y denominador multiplicando por el factor $((k_{+2}k_{+4}) / (k_{+1}(k_{+2}+k_{+4}))$ tiene como resultado:

$$r_A = \frac{\Gamma_{\max}}{\left[\frac{\beta_G}{G} + \frac{\beta_O}{O} + 1 \right]}$$

Ecuación 24

Donde las constantes toman las expresiones que se indican:

$$\Gamma_{\max} = \frac{K_{+2} K_{+4}}{K_{+2} + K_{+4}} E_T$$

$$\beta_G = \frac{K_{+2} K_{+4}}{K_{+1} (K_{+2} + K_{+4})}$$

$$\beta_O = \frac{K_{+2} + K_{+4}}{K_{+3} (K_{+2} + K_{+4})}$$

Ecuación 25

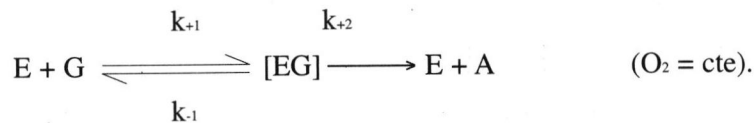
Como es posible observar, los dos mecanismos ping-pong conducen a la misma expresión de velocidad, si bien los significados físicos de los parámetros son diferentes en cada caso, puesto que difieren las expresiones de las constantes.

En la bibliografía se encuentran algunos valores de los parámetros de la ecuación cinética para ambos mecanismos. Así, en el caso del mecanismo 1^[Parker y Swartz, 1987], se tiene que $k_{+1} = 14.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{-1} = 0 \text{ s}^{-1}$; $k_{+2} = 1,000 \text{ s}^{-1}$ y $k_{+4} = 1,95 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por otra parte, para el mecanismo 2^[Atkinson y Lester, 1974] se tiene que: $k_{+1} = 11,944 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{+2} = 0,093 \text{ s}^{-1}$; $k_{+3} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{+4} = 1,171 \text{ s}^{-1}$.

La forma matemática de la ecuación cinética bisustrato es una superficie cuya geometría depende de los valores de las constantes β_G y β_O , y que tiende a valores nulos cuando las concentraciones de glucosa u oxígeno son nulas.

2.5.1.3. Mecanismo de Michaelis-Menten (Simplificación monosustrato).

Aunque en el caso de la oxidación de glucosa hasta ácido glucónico por la enzima GOD se encuentran implicados dos sustratos, es posible simplificar sustancialmente el tratamiento matemático cuando se trabaja a saturación de oxígeno. En ese caso, la cinética de la enzima deja de depender de la concentración de oxígeno, pudiendo simplificarse hasta la ecuación de Michaelis-Menten.



Donde se tiene:

- E: concentración neta de enzima, en este modelo no se consideran formas oxidada y reducida;
- G: concentración de glucosa (reactivo);
- A: concentración de ácido glucónico (producto);
- [EG]: concentración del complejo enzima-sustrato.

La concentración total de enzima es:

$$E_T = E + [EG]$$

Ecuación 26

Aceptando como válida la hipótesis de estado estacionario.

$$\frac{d[EG]}{dt} = K_{+1}E \cdot G - (K_{-1} + K_{+2}) [EG] = 0$$

Ecuación 27

Y también:

$$[EG] = \frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}} E \cdot G$$

Ecuación 28

Realizando las sustituciones oportunas, la concentración de enzima libre puede escribirse como:

$$E = \frac{E_T}{\frac{K_{+1}}{K_{-1} + K_{+2}} G + 1}$$

Ecuación 29

En consecuencia, la velocidad de formación de producto toma la forma:

$$\begin{aligned} r_A &= K_{+2}[EG] \\ r_A &= \frac{K_{+2}E_T G}{\frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} + G} \end{aligned}$$

Ecuación 30

O, como normalmente se expresa dicha ecuación:

$$r_A = \frac{\Gamma_{\max} G}{K_M + G}$$

Ecuación 31

Donde:

$$r_{\max} = K_{+2}E_T$$

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}$$

Ecuación 32

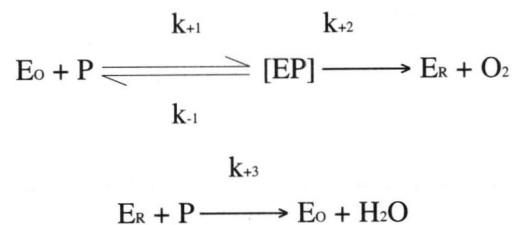
Expresión que puede deducirse de la ecuación bisustrato cuando se sustituye la concentración de oxígeno por un valor constante. En este caso, tanto r_{\max} como K_M dependen del valor de dicha constante.

2.5.2. CINÉTICA DE LA ENZIMA CATALASA EN SOLUCIÓN.

2.5.2.1. Mecanismo de Michaelis-Menten.

Los modelos propuestos para la enzima catalasa son del tipo Michaelis-Menten^[George, 1947], puesto que, aunque inicialmente se pueden formular según un mecanismo de tipo ping-pong, el sustrato que toma parte en las dos semirreacciones es el mismo, de modo que resulta posible la simplificación de la expresión cinética.

En este caso, el mecanismo tipo Michaelis-Menten podría exponerse como sigue:



Donde se tiene:

E_o : concentración de la forma oxidada de la enzima;
 E_R : concentración de la forma reducida de la enzima;
 P : concentración de peróxido de hidrógeno (reactivo);
 $[EP]$: concentración del complejo enzima-sustrato;
 O : concentración de oxígeno disuelto.

La concentración total de enzima es:

$$E_T = E_o + [EP] + E_R$$

Ecuación 33

A partir del mecanismo propuesto se pueden definir las velocidades de formación de oxígeno, así como la variación en la concentración de cada una de las formas de la enzima, del siguiente modo:

$$\begin{aligned}\frac{dO}{dt} &= K_{+2}[EP] \\ \frac{dE_o}{dt} &= -K_{+1}E_oP + K_{-1}[EP] + K_{+3}E_RP \\ \frac{d[EP]}{dt} &= K_{+1}E_oP - (K_{-1} + K_{+2}) [EP] \\ \frac{dE_R}{dt} &= K_{+2}[EP] - K_{+3}E_RP\end{aligned}$$

Ecuación 34

Si se considera válida la hipótesis de estado estacionario, la ecuación de producción de oxígeno puede expresarse como sigue:

$$\frac{dO}{dt} = \frac{K_{+2}E_T P}{K_M + P}$$

Ecuación 35

Donde K_M agrupa ahora una serie de constantes diferentes a las anteriores para la otra enzima:

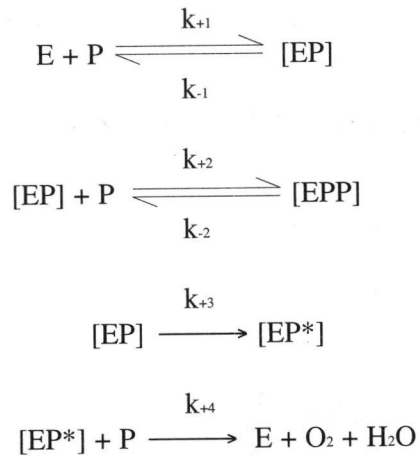
$$K_M = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} + \frac{K_{+2}}{K_{+3}}$$

Ecuación 36

Aunque los modelos propuestos inicialmente para el comportamiento cinético de la enzima catalasa eran de tipo Michaelis-Menten simple, se ha comprobado que dicha aproximación es válida solamente cuando se opera a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno [Vasudevan y Weiland, 1990].

2.5.2.2. Mecanismo de Jones.

En la bibliografía se puede encontrar otro modelo para la cinética de catalasa en solución, que contempla la existencia de compuestos (o complejos) conocidos desde hace tiempo. Dicho mecanismo^[Jones y Wynne-Jones, 1962] puede formularse como sigue:



Donde se representa:

E: concentración de enzima;

P: concentración de peróxido de hidrógeno (reactivo);

[EP]: concentración del primer complejo catalasa-peróxido;

[EP*]: concentración del segundo complejo catalasa-peróxido;

[EPP]: concentración del complejo catalasa-diperóxido, no activo;

O: concentración de oxígeno disuelto.

La variación de la concentración de las diferentes especies es posible formularla como sigue:

$$\frac{dE}{dt} = -K_{+1}E \cdot P + K_{-1}[EP] + K_{+4}[EP^*]P$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = K_{+1}E \cdot P - (K_{-1} + K_{+3} + K_{+2}P)[EP] + K_{-2}[EPP]$$

$$\frac{d[EPP]}{dt} = K_{+2}[EP]P - K_{-2}[EPP]$$

$$\frac{d[EP^*]}{dt} = K_{+3}[EP] + K_{+4}[EP^*]P$$

$$\frac{dO}{dt} = K_{+4}[EP^*]P$$

Ecuación 37

A partir del mecanismo propuesto, y teniendo en cuenta la aproximación de estado estacionario es posible deducir la ecuación de producción siguiente:

$$r_o = \frac{dO}{dt} = \frac{r_{\max}P}{P + K_M + \frac{P^2}{K_i}}$$

Ecuación 38

Siendo E_T la concentración total de enzima, los coeficientes toman la forma matemática siguiente:

$$r_{\max} = 2K_{+3}E_T$$

$$\frac{1}{K_i} = \frac{K_{+2}}{K_{-2}}$$

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_{+3}}{K_{+1}} + \frac{K_{+3}}{K_{+4}}$$

Ecuación 39

Los valores más ajustados de las coeficientes cinéticos encontrados en la bibliografía son los siguientes: $0,087 \pm 0,002$ M, para K_M ; $0,56 \pm 0,02$ M, para K_i y $295 \pm 5,0$ $\mu\text{mol}/\text{min g}$, como valor de r_{\max} [Vasudevan y Weiland, 1990].

2.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA.

Son numerosos los factores que influyen en la actividad enzimática; concentraciones de sustrato, producto y enzima, existencia de inhibidores en el medio, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. En concreto, en los siguientes apartados se va a estudiar en el caso de las enzimas sometidas a estudio, la influencia del pH, la fuerza iónica y la temperatura sobre la actividad de las enzimas estudiadas.

2.6.1. INFLUENCIA DEL PH.

En general, las enzimas son activas en un rango limitado de pH. Usualmente cada enzima presenta un pH óptimo porque, al igual que otras proteínas, poseen muchos grupos ionizables, de forma que los cambios de pH pueden alterar su conformación, su capacidad de unión con el sustrato y la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo. Los efectos pueden ser, bien un cambio en la velocidad de reacción máxima (V_{\max}) o un cambio de la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m), bien una alteración en la estabilidad de la enzima [Wiseman, 1991]. La TABLA 2 muestra los pK_a de grupos que suelen encontrarse en el centro activo, sensibles a la concentración de protones en el medio [Segel, 1986].

GRUPO	pK _a	ΔH _{ionización} (Kcal/mol)
α-carboxilo (final de cadena polipeptídica)	3,0 - 3,2	1,5
β o γ-carboxilo (de ácido aspártico o glutámico)	3,0 - 5,0	1,5
Imidazol (de histidina)	5,5 - 7,0	6,9 - 7,5
α-amino (final cadena polipeptídica)	7,5 - 8,0	10,0 - 13,0
Amino terminal (de lisina)	9,5 - 10,6	10,0 - 13,0
Sulfhidrilo (de cisteína)	8,0 - 8,5	6,5 - 7,0
OH fenólico (de tirosina)	9,8 - 10,5	6,0
Guanidinio (de arginina)	11,6-12,6	12,0 - 13,0

TABLA 2. pK_a y entalpías de ionización para los grupos más significativos del centro activo. Los valores concretos dependen de la temperatura y otros factores del medio.

Del mismo modo, los grupos ionizables del sustrato pueden verse afectados por el pH del medio, lo cual puede ser decisivo a la hora de constituirse el complejo enzima-sustrato. Así, cuando se observa una gran amplitud de rango de pH óptimo, esto se debe normalmente a que el sustrato no puede ionizarse.

En la realidad, en gran cantidad de reacciones enzimáticas industriales, el pH cambia a lo largo de la reacción, dependiendo de la capacidad tamponante de los sustratos y los productos implicados. Además, el pH afecta a la estabilidad de la enzima. Por tanto, podemos concluir que generalmente el pH óptimo de trabajo se calcula estableciendo un compromiso entre los efectos en la actividad y en la estabilidad de la enzima.

En el caso concreto de la enzima glucosa oxidasa, su pH óptimo es de 5,8^[Atkinson y Mavituna, 1987]. En la bibliografía se recogen datos acerca de su comportamiento frente al pH. Así, en la FIGURA 2 se observa cómo el porcentaje de actividad es de un 10% del máximo para pH 3, aumentando según la secuencia típica en forma de campana hasta pH entre 5,5 y 5,8, disminuyendo nuevamente hasta niveles del 10% a pH 8^[Fortier y Bélanger, 1991].

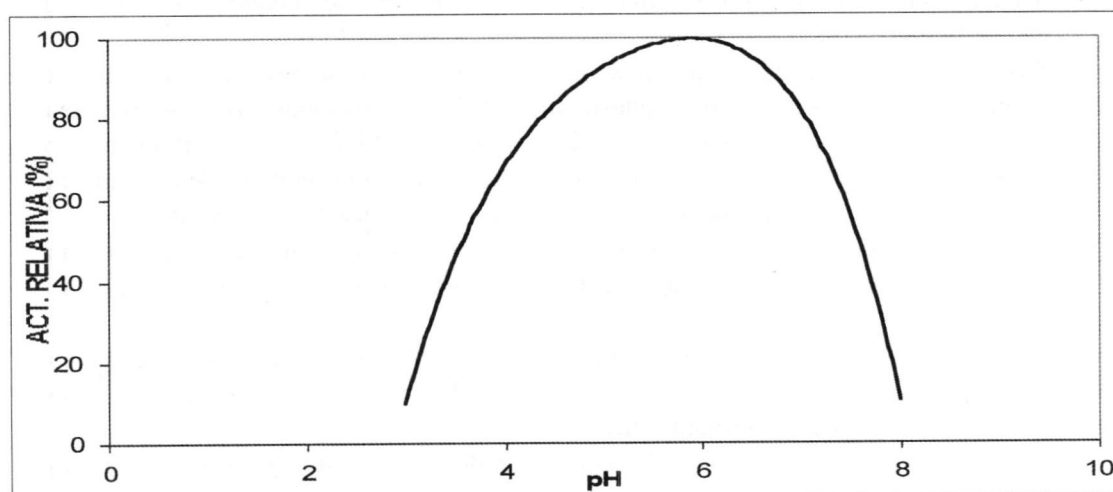


FIGURA 2. Comportamiento de la enzima GOD frente al pH^[Fortier y Bélanger, 1991].

Por otra parte, como puede observarse en la FIGURA 3, la enzima catalasa presenta un comportamiento diferente respecto al pH. Su pH óptimo se presenta aproximadamente en 7,4^[Jiang y Zhang, 1993]. Inicialmente, para pH 5,0 se observan actividades del 20%, el máximo de actividad se alcanza para pH entre 7 y 7,5; para posteriormente disminuir totalmente su actividad por encima de pH 8,5.

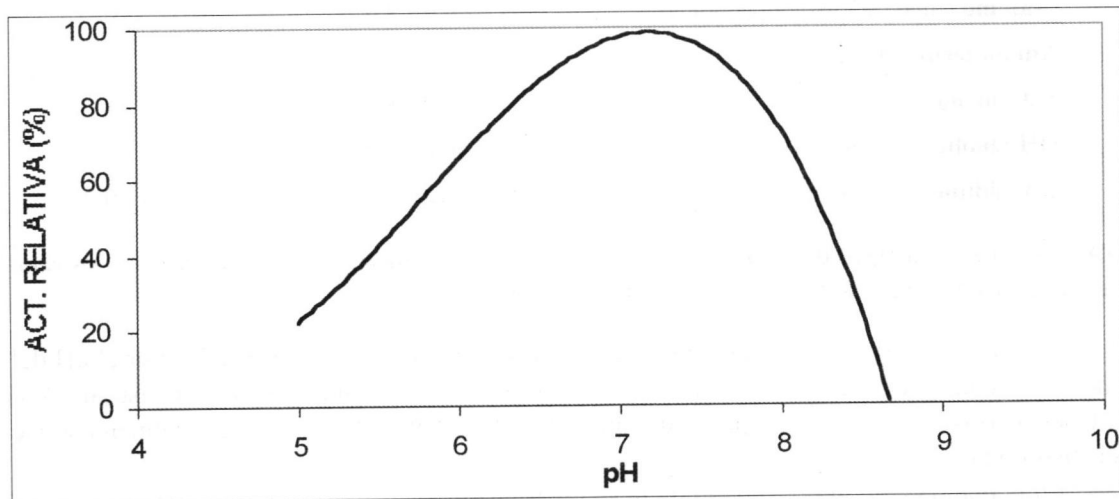


FIGURA 3. Comportamiento de la enzima CAT frente al pH^[Jiang y Zhang, 1993].

2.6.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

A medida que aumenta la temperatura se observan dos fenómenos:

- La mayoría de las reacciones químicas transcurren con mayor velocidad, debido a que su incremento trae como consecuencia un aumento de la energía cinética de las moléculas reaccionantes, teniendo como resultado un mayor número de choques eficaces por unidad de tiempo.
- Sin embargo, la reacción catalítica se pone en peligro. La estabilidad de la enzima disminuye por inactivación térmica, puesto que se trata de moléculas proteicas complejas y su actividad catalítica es consecuencia de su estructura frágil, precisa y altamente ordenada. Dicha estructura yuxtapone grupos R de aminoácidos específicos de tal manera que conforman los lugares de anclaje estereoespecíficos del sustrato y el centro activo. Así, cuando una molécula de enzima absorbe mucha energía, la estructura terciaria se rompe y la enzima queda desnaturalizada, perdiendo completamente su actividad catalítica.

De modo que, conforme aumenta la temperatura, el incremento esperado de la velocidad de reacción se produce como consecuencia del incremento en las colisiones, aunque también se incrementa la velocidad de desnaturalización.

Las consideraciones teóricas acerca de la influencia de la temperatura, realizadas anteriormente, pueden expresarse en forma matemática más o menos compleja, para cualquier cinética enzimática. A continuación se realiza el desarrollo para el caso de una cinética de Michaelis-Menten.

Como se ha indicado anteriormente (ecuación 31), la cinética de Michaelis-Menten propone que la velocidad de reacción enzimática es:

$$r_A = K_{+2}[EG]$$

Ecuación 40

Por tanto, la velocidad de reacción va a depender de la concentración de complejo [EG] y del valor de k_{+2} . En un esquema simplificado, la variación de la velocidad de reacción enzimática con la temperatura puede ser descrita en términos de los cambios en el valor de k_{+2} , según la ecuación de Arrhenius.

$$K_{+2} = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

Ecuación 41

Donde se tiene:

A: constante de Arrhenius;

E_a : energía de activación;

R: constante de los gases;

T: temperatura.

Si se conocen A y E_a , es posible evaluar k_{+2} para una temperatura dada. Si son desconocidos, pueden determinarse fácilmente midiendo r_{\max} para dos temperaturas diferentes.

Tomando logaritmos en la ecuación (41), tenemos que:

$$\text{Ln}k_{+2} = \text{Ln}A - \frac{E_a}{RT}$$

Ecuación 42

Por tanto, para dos temperaturas diferentes:

$$\text{Ln}r_{\max}^2 = \text{Ln}A - \frac{E_a}{RT_2}$$

$$\text{Ln}r_{\max}^1 = \text{Ln}A - \frac{E_a}{RT_1}$$

Ecuación 43

y restando ambas expresiones, se obtiene:

$$\text{Ln} \frac{r_{\max}^2}{r_{\max}^1} = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2} \right)$$

Ecuación 44

En la práctica, es más preciso realizar experimentos en un amplio rango de temperaturas y representar $\ln r_{\max}$ frente a $1/T$. En el caso de las enzimas, la relación de Arrhenius es válida sólo en un rango estrecho de temperaturas^[Gacasa y Hubble, 1990], debido a los efectos anteriormente comentados.

En el caso concreto de la enzima glucosa oxidasa, la bibliografía recoge la curva de actividad relativa de la enzima cuando ésta se encuentra en solución; FIGURA 4. Las medidas se realizaron tomando un tiempo de ensayo de 10 minutos en buffer acetato de pH 5,8. Como puede observarse, el máximo de actividad se encuentra entre los 30°C y 40°C, con una caída muy rápida a partir de los 40°C y desactivación progresiva de la enzima^[Kozhukharova et al., 1988].

Por otra parte, la enzima catalasa presenta poca dependencia respecto de la temperatura, FIGURA 5, es decir, no se observan cambios muy significativos en la actividad relativa de la enzima hasta pasados los 40°C^[Jiang y Zhang, 1993]. Su temperatura óptima de operación se encuentra en el entorno de los 30°C, apreciándose desactivación significativa de los 60°C en adelante.

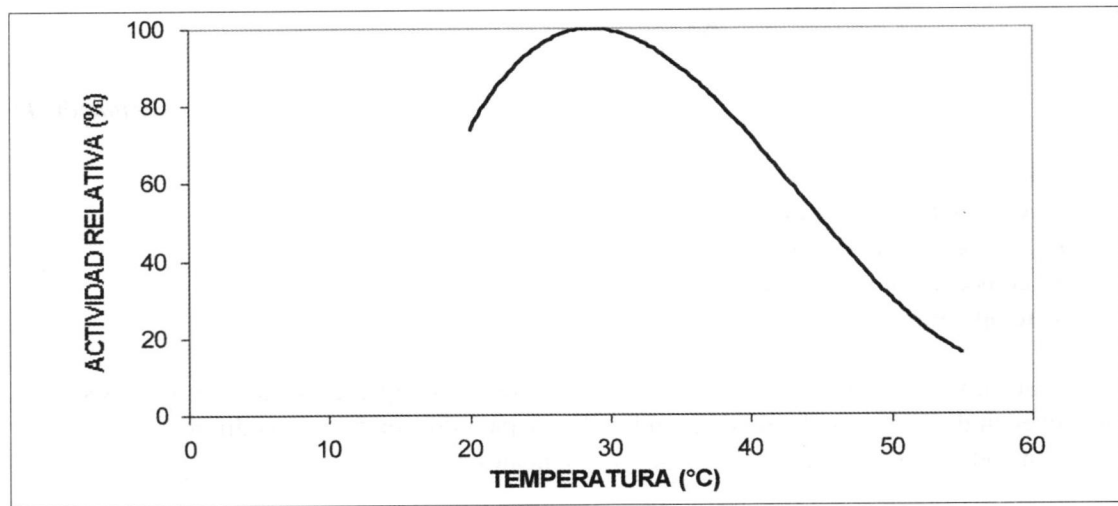


FIGURA 4. Comportamiento de la enzima GOD frente a la temperatura^[Kozhukharova et al.1988].

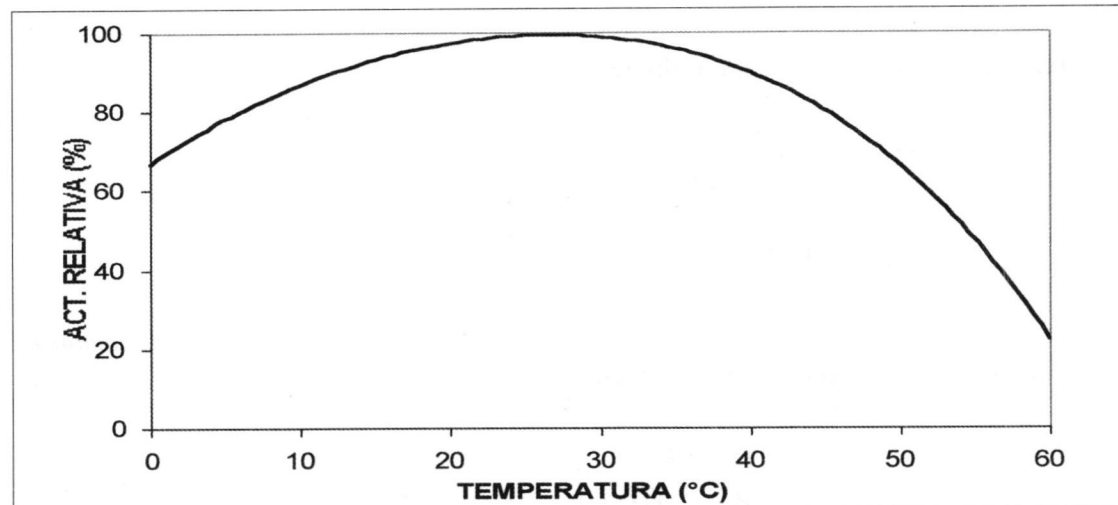


FIGURA 5. Comportamiento de la enzima CAT frente a la temperatura^[Jiang y Zhang, 1993].

2.7. CINÉTICA DE DESACTIVACIÓN ENZIMÁTICA EN SISTEMAS HOMOGÉNEOS.

La mayor parte de la bibliografía sobre cinética enzimática se refiere a datos de velocidades iniciales de reacción y a los efectos reversibles del comportamiento de las enzimas. Sin embargo, un aspecto de vital importancia cuando se pretende un uso a largo plazo de la enzima, para trabajar en continuo, es el conocimiento de la cinética de desactivación de las enzimas implicadas en el proceso. En tal situación, la viabilidad económica del proceso dependerá fundamentalmente de la vida del biocatalizador.

En la desactivación de una enzima pueden estar implicados factores como:

- Las posibles conformaciones alostéricas que pueda presentar la enzima, de manera que en función de las condiciones del medio, la enzima se presentará en su forma más activa o no.
- La desnaturalización de las proteínas que conforman la enzima.
- Inhibición por producto de reacción, como ocurre con las dos enzimas estudiadas en la presente memoria.
- Y, por supuesto, serán decisivos los factores pH y temperatura del medio, en la posible desactivación de las enzimas.

Así pues, se han hallado en la bibliografía, datos referentes a la desactivación de la enzima GOD con respecto al pH y la temperatura. No habiendo sido posible en el caso de la enzima CAT.

En lo que respecta a la influencia del pH en la desactivación de la enzima GOD, en la FIGURA 6 se observa que la gráfica característica de desactivación a pH 8, presenta una primera pendiente muy acusada hasta las primeras 10 horas, siendo la disminución posterior más gradual, y siempre con valores por debajo del 10%^[Kozhukharova et al., 1988].

Por otra parte, en la FIGURA 7, se muestran las curvas de desactivación térmica de la enzima GOD a 50°C y 60°C^[Fortier y Bélanger, 1991]. Puede observarse que, en el caso de 50°C la desactivación es bastante lenta, para los 60°C la desactivación es muy rápida, pasándose en 30 minutos de actividad 100% a 30%.

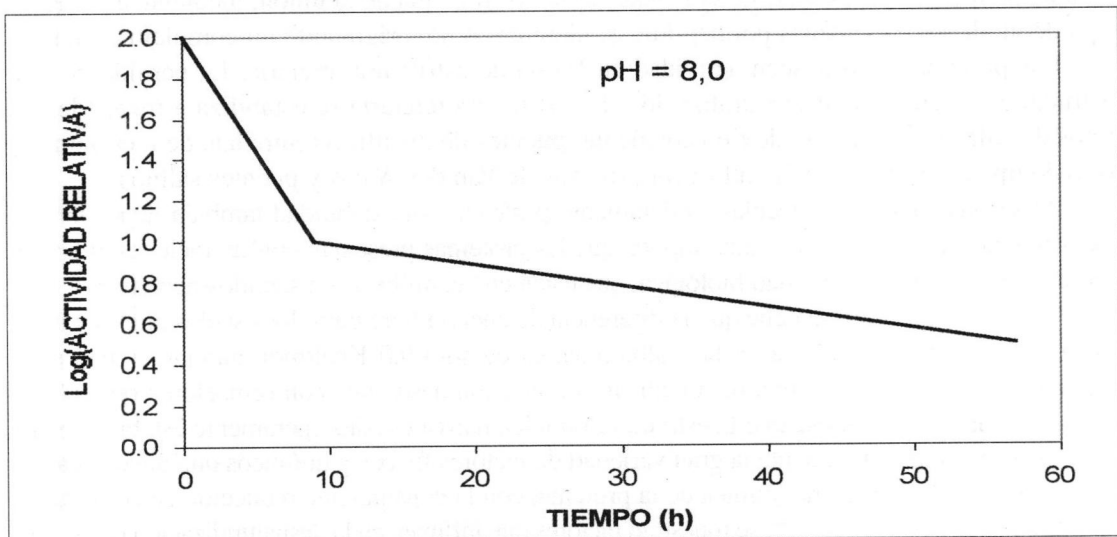


FIGURA 6. Desactivación de la enzima GOD frente al tiempo para un pH = 8,0^[Kozhukharova et al., 1988].

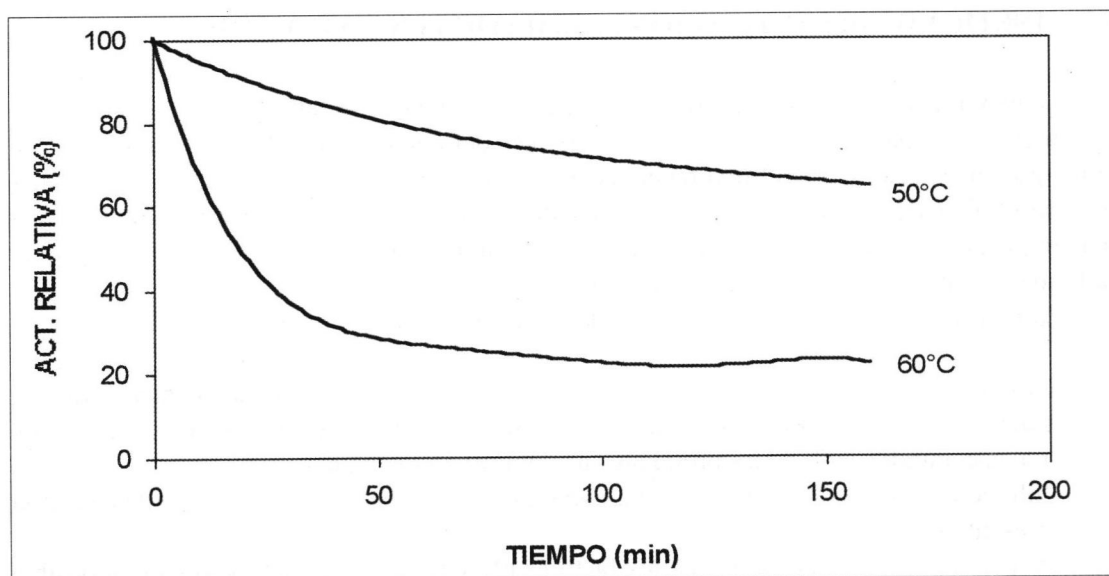


FIGURA 7. Desactivación de la enzima GOD para distintas temperaturas^[Fortier y Bélanger, 1991].

2.7.1. DESACTIVACIÓN POR DESNATURALIZACIÓN.

La composición y forma de una proteína viene definida por cuatro estructuras; estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La estructura primaria nos informa de la secuencia y orden en que se encuentran los aminoácidos que la constituyen. La secundaria, nos informa de la posición espacial que ocupan dichos aminoácidos. Conociéndose tres tipos principales de estructuras secundarias: la α -hélice, la estructura β o de lámina plegada y la hélice del colágeno. La estructura terciaria, informa sobre la disposición de la estructura secundaria en el espacio y, por tanto, del tipo de conformación que poseen. La estructura cuaternaria nos informa de la unión, mediante enlaces de tipo débil, de varias cadenas polipeptídicas, idénticas o no, originando un complejo proteico.

Las proteínas sólo poseen actividad en forma de estructura terciaria. La pérdida de esta estructura se denomina desnaturalización. La estructura terciaria se estabiliza a través de dos tipos de enlaces: uno fuerte de tipo covalente: puentes de disulfuro (entre a.a. de metionina) y otro de tipo débil: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y puentes salinos.

Al ser las enzimas moléculas estrictamente proteicas, su estabilidad también dependerá de estas fuerzas de carácter débil, que implica que las proteínas presentan configuraciones alternativas de mayor o menor actividad biológica, que están en "equilibrio" en sentido energético^[Bailey y Ollis, 1986]. A modo de ejemplo, se tiene que la diferencia de energía libre entre los estados nativo y completamente desnaturalizado de la lactoalbúmina, es de sólo 9,0 Kcal/mol; aunque es necesario pasar varias barreras de energía para realizar la transición desde una conformación a otra. Como consecuencia, puede decirse que la estructura proteica nativa es sólo ligeramente estable. De ahí, que no nos resulte sorprendente la gran variedad de factores físicos y químicos que puedan causar alteraciones en la estructura química de la proteína, con la consiguiente reducción de actividad.

En la TABLA 3^[Bailey y Ollis, 1986], se muestran factores que influyen en la desnaturalización de las proteínas. Sin embargo, es necesario indicar que son sus combinaciones las que determinan la veloci-

dad de desactivación de la enzima. Por ejemplo, la sensibilidad de una proteína a la desnaturalización a temperaturas elevadas puede variar ampliamente con el pH de la solución, y la influencia de varias combinaciones temperatura-pH es normalmente diferente de una proteína a otra. En este sentido, es posible identificar un gran conjunto de propiedades diferentes de las proteínas, a menudo relacionadas, que pueden quedar afectadas por los factores fisico-químicos mostrados en la Tabla.

DES NATURALIZADOR	BLANCO	PROCESO	PRODUCTO FINAL
DES NATURALIZACIÓN FÍSICA			
Calor	Enlaces de hidrógeno	Aumento del contenido energético	Agregados altamente desordenados
Frío	Enlaces hidrofóbicos	Alteración de la estructura del disolvente.	Agregados altamente desordenados
Fuerzas mecánicas	Grupos solvatados Grupos solvatados	Deshidratación Cambios en la solvatación	Monómeros inactivos Agregados altamente desordenados
Radiación	Grupos funcionales(enlaces peptídicos,etc)	Fotooxidación o ataque por radicales	Agregados altamente desordenados
DES NATURALIZACIÓN QUÍMICA			
Ácidos	Enlaces peptídicos (his, por ejemplo)	Disminución interacciones iónicas estructurales	Desnaturalización total
Bases	Enlaces peptídicos (tyr,cySH, por ejemplo)	Disminución interacciones iónicas estructurales	Desnaturalización total
Compuestos orgánicos rompedores de enlaces de hidrógeno	Enlaces de hidrógeno	Disminución de las interacciones de hidrógeno	Desnaturalización total
Sales	Grupos polares y no polares	Aumento en la fuerza iónica del medio	Agregados altamente desordenados
Disolventes	Grupos no polares	Solvatación de los grupos no polares	Regiones peptídicas con regiones helicoidales
Tensioactivos	Zonas hidrofóbicas (todos) y grupos cargados (t. iónicos)	Formación de regiones micelares	Estructura parcialmente desordenada
Oxidantes	Grupos funcionales (cySH, met, try, etc.)	Disminución de los enlaces estructurales	Estructura parcialmente desordenada
Metales pesados	Grupos funcionales (cySH, his, y otros)	Disminución de los enlaces estructurales	Enzima inactiva
Agentes quelatantes	Cationes importantes para su estructura o función	Sustitución del ligando o expulsión del catión	Enzima inactiva
DES NATURALIZACIÓN BIOLÓGICA			
Proteasas	Enlaces peptídicos	Hidrólisis de enlaces peptídicos terminales	Oligopéptidos, aminoácidos.

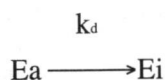
TABLA 3. Resumen de los posibles desnaturalizadores de proteínas y sus efectos^[Bailey y Ollis, 1986].

Normalmente, los datos de desactivación de enzimas suelen obtenerse exponiendo la enzima a condiciones desnaturalizantes durante algunos intervalos de tiempo, en ausencia de sustrato, para luego hacer un ensayo de actividad en presencia de sustrato.

2.7.2. INFLUENCIA DE LA DESACTIVACIÓN EN LA CINÉTICA ENZIMÁTICA.

En los modelos cinéticos de desactivación, casi siempre cabe pensar que la aproximación de primer orden es válida, puesto que la ruptura de un sólo enlace en el centro activo puede implicar la desactivación de la molécula^[Bailey y Ollis, 1986].

En el modelo más simple, la forma activa de la enzima (E_a) sufre un cambio químico o estructural irreversible a una forma inactiva (E_i), a una velocidad " r_d " proporcional a la concentración de enzima activa $r_d = k_d E_a$.



En consecuencia, en un sistema de reacción homogéneo la variación de la concentración de enzima activa (E_a) con el tiempo puede expresarse como:

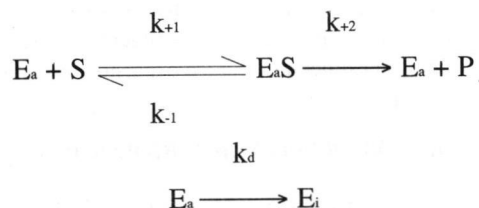
$$\frac{dE_a}{dt} = -K_d E_a;$$

$$\ln \frac{E_a(t)}{E_a(0)} = -K_d t$$

Ecuación 45

Como ya se ha indicado con otras constantes de velocidad, la variación de la constante de desactivación con la temperatura puede ser descrita, en primera aproximación, por la ecuación de Arrhenius.

Si se incluye el modelo de desactivación anteriormente expuesto en la ecuación de Michaelis-Menten, es posible obtener una expresión global que recoja las velocidades de reacción y desactivación de la enzima.



Donde S representa al sustrato de reacción y P al producto.

Asumiendo que el proceso de desactivación suele ser mucho más lento que la reacción de catálisis, y considerando la aproximación de estado estacionario, se tiene que:

$$r_p = \frac{K_{+2}E_{aT}S}{K_M + S}$$

Ecuación 46

Siendo E_{aT} la cantidad total de enzima activa presente, y desaparece exponencialmente en el tiempo.

2.7.3. CINÉTICA DE DESACTIVACIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA EN SOLUCIÓN.

2.7.3.1. Mecanismo tipo "ping-pong".

La enzima glucosa oxidasa es bastante estable frente a las temperaturas elevadas y los cambios de pH, por ello, el factor principalmente responsable de su desactivación es el peróxido de hidrógeno, uno de los productos de reacción^[Tse y Gough, 1987]. La desactivación por peróxido de hidrógeno es irreversible, siendo la forma reducida de la enzima más sensible que la forma oxidada y desactivándose casi 100 veces más rápida. La bibliografía propone en este caso un mecanismo cinético de tipo "ping-pong" para la desactivación por peróxido de hidrógeno. De forma que éste ataca a todas las especies implicadas en el esquema de reacción del tipo "ping-pong" 2, desactivándolas mediante una reacción de primer orden.

Como se indicó en el apartado 2.5.1.2., para un mecanismo del tipo "ping-pong" 2, la ecuación de producción depende de tres parámetros: r_{max} , β_G , β_O (ecuación 24). Asimismo la concentración de las especies intermedias E_R y $[EO]$ se puede calcular como se indicó (ecuaciones 19 y 20).

Si de dichas ecuaciones se despejan $[EO]$ y E_R en función de E_O , y se sustituyen en la ecuación (14), se pueden deducir expresiones particulares para cada especie, como la mostrada en la ecuación (21):

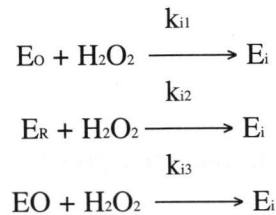
$$E_O = E_T \left(\frac{\beta_G O}{GO + \beta_G O + \beta_O G} \right)$$

$$E_R = E_T \left(\frac{\beta_O G}{GO + \beta_G O + \beta_O G} \right)$$

$$[EO] = E_T \left(\frac{GO}{GO + \beta_G O + \beta_O G} \right)$$

Ecuación 47

Por otra parte se piensa en un esquema de desactivación de primer orden, en el que cada una de las formas de la enzima manifiesta cierta inhibición por peróxido de hidrógeno, se tiene el esquema de desactivación siguiente:



Donde E_i , representa la concentración de enzima desactivada.

A partir de dicho mecanismo y las expresiones de la ecuación (47), es posible deducir las ecuaciones cinéticas de desactivación:

$$\begin{aligned} \frac{dE_o}{dt} &= K_{i1}PE_T \left(\frac{\beta_G O}{GO + \beta_G O + \beta_O G} \right) \\ \frac{dE_R}{dt} &= K_{i2}PE_T \left(\frac{\beta_O G}{GO + \beta_G O + \beta_O G} \right) \\ \frac{d[E_O]}{dt} &= K_{i3}PE_T \left(\frac{GO}{GO + \beta_G O + \beta_O G} \right) \end{aligned}$$

Ecuación 48

Dicho conjunto de ecuaciones podría simplificarse en el caso de sistemas que trabajen con concentraciones de oxígeno a saturación. Asimismo, es preciso tener en cuenta que el valor de β_o suele ser muy pequeño y, por tanto, de poco peso en las expresiones. Por tanto, la expresión simplificada podría adquirir la siguiente forma:

$$\frac{dE_{aT}}{dt} = K_i PE_{aT}$$

Ecuación 49

Donde E_{aT} representa la concentración total de enzima activa en cada instante. La integración nos llevaría al siguiente esquema exponencial para la actividad observada, suponiendo ésta proporcional a la concentración de enzima activo:

$$a = e^{-K_i P t}$$

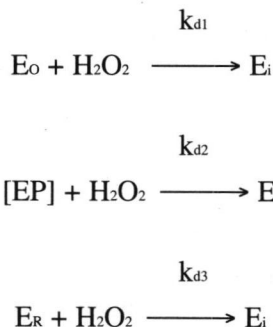
Ecuación 50

Siendo "a" la fracción de actividad específica inicial que queda en el instante t.

2.7.4. CINÉTICA DE DESACTIVACIÓN DE LA ENZIMA CATALASA EN SOLUCIÓN.

2.7.4.1. Mecanismo tipo Michaelis-Menten.

El primero de los mecanismos que recoge la bibliografía para la desactivación de catalasa^[Tse y Gough, 1987] sigue el mecanismo que se expone a continuación:



Donde E_i es la forma inactiva de la enzima y sus correspondientes velocidades de desactivación son las siguientes:

$$\frac{dE_T}{dt} = - \left(\begin{array}{c} K_{d1} \left(\frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} \right) P \frac{E_T}{K_M + P} \\ K_{d2} P^2 \frac{E_T}{K_M + P} \\ K_{d3} \left(\frac{K_{+2}}{K_{+3}} \right) P \frac{E_T}{K_M + P} \end{array} \right)$$

Ecuación 51

Dependiendo del mecanismo preponderante de desactivación, la expresión global puede adquirir diferentes formas. En la práctica, sin embargo, sería difícil distinguir entre las tres ecuaciones, que suelen agruparse en la expresión siguiente:

$$\frac{dE_T}{dt} = \left(\frac{aP}{K_M + P} + \frac{bP^2}{K_M + P} \right) E_T$$

Ecuación 52

En aquellos casos en los que la concentración de peróxido sea mucho menor que el valor de K_M , la desactivación de catalasa puede considerarse de primer orden respecto del peróxido de hidrógeno. Lo que nos llevaría a una ecuación de velocidad de la forma siguiente:

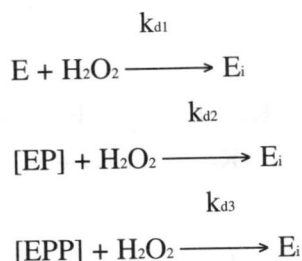
$$a = e^{-k_0 \cdot t - k_p P t}$$

Ecuación 53

Donde "a" es la fracción de la actividad específica inicial que queda en el tiempo t; k_0 es la constante de velocidad de desactivación en ausencia de peróxido de hidrógeno; y k_p es la constante de desactivación en presencia del mismo.

2.7.4.2. Mecanismo de tipo Jones.

Además del mecanismo comentado anteriormente para la desactivación de catalasa, se ha propuesto otro más reciente^[Vasudevan y Weiland, 1990]. En dicho mecanismo se considera que cada uno de los complejos que intervienen en la catálisis de tipo Jones, se desactiva por peróxido de hidrógeno.



Donde la E_i es la forma inactiva de la enzima, que ha sido desactivada irreversiblemente. La expresión de desactivación que resulta de aplicar la cinética formal a este caso es la siguiente:

$$\frac{da}{dt} = \frac{K_d P^n a}{P + K_M + \frac{P^2}{K_i}}$$

Ecuación 54

En dicha expresión; "n", puede tomar los valores 1, 2 ó 3; aunque, según la bibliografía, los mejores ajustes se obtienen para n=1.

2.8. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.

Las enzimas son generalmente catalizadores mucho más sensibles que los catalizadores químicos inorgánicos tradicionales, suelen presentar ciertas dificultades en su utilización con

disolventes orgánicos (generalmente hidrófobos) o en condiciones de temperatura o pH elevados. La posibilidad de operar con reactores catalíticos enzimáticos viene dada por la utilización de técnicas de inmovilización de enzimas. De otra forma, trabajar en continuo con la enzima en solución es inviable debido a la pérdida de enzima por lavado y la necesidad de su continua reposición. Este hecho conllevaría costes económicos insostenibles.

Así pues, el desarrollo de la tecnología de inmovilización enzimática ha eliminado muchos de estos inconvenientes y posibilitado la operación continua, la reutilización de las enzimas, el mejor control de la reacción, la obtención de productos más específicos y rendimientos mayores, con el consiguiente incremento de su rentabilidad.^[Kennedy y Melo, 1990]

Las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre una gama muy amplia de soportes. En los últimos años, se ha incrementado drásticamente el número de métodos disponibles para la inmovilización de enzimas, pudiéndose utilizar para tal efecto una gran variedad de técnicas de inmovilización. Se podrá, por tanto, clasificar de muy diversas formas los distintos tipos de enzimas inmovilizados. A pesar de ello, podemos clasificar de manera general las técnicas de inmovilización según sean o no, las enzimas, solubles en agua y según exista o no enlace químico en la inmovilización.

En la FIGURA 8, se presenta un esquema de la clasificación de técnicas de inmovilización enzimática, adoptado en la presente memoria.

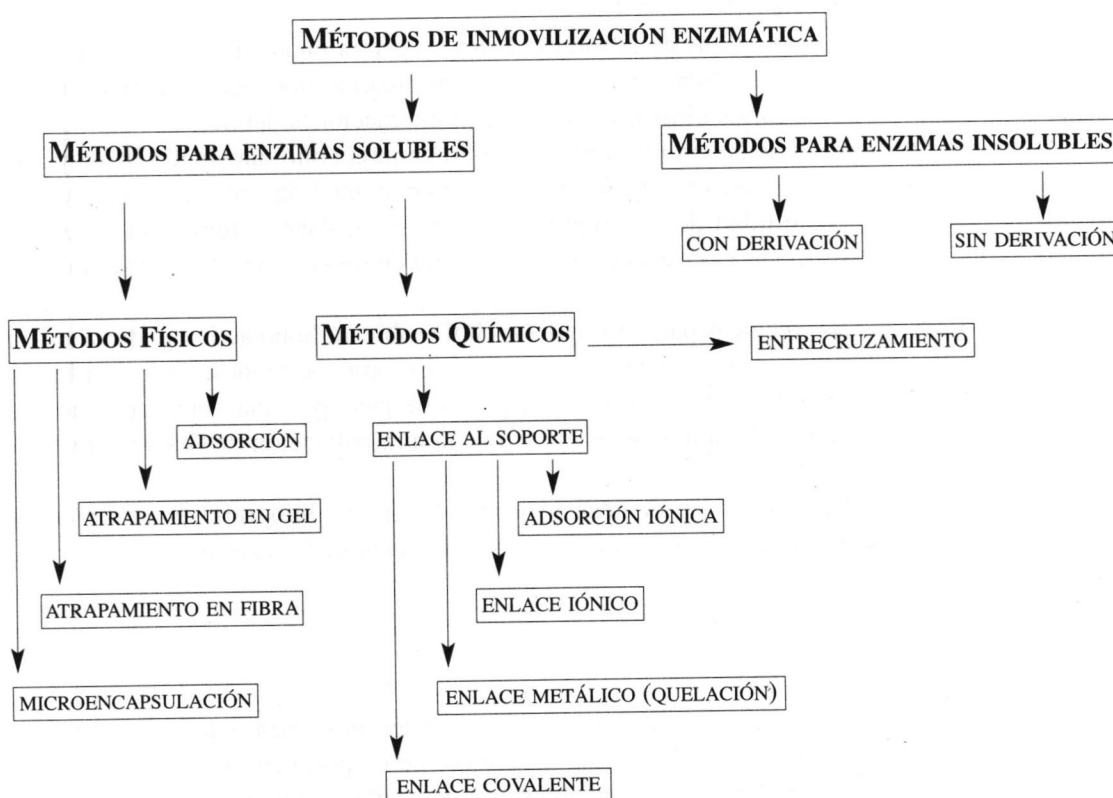


FIGURA 8. Clasificación de los métodos de inmovilización de enzimas.

2.8.1. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN PARA ENZIMAS SOLUBLES EN MEDIO ACUOSO.

2.8.1.1. Métodos físicos.

Los métodos físicos se basan en la inmovilización de la enzima a través de fenómenos físicos e interacciones de tipo débil.

2.8.1.1.1. Adsorción.

El procedimiento de preparación es tan simple como mezclar la enzima y el material de soporte bajo condiciones adecuadas y, después de un período de interacción, separar el derivado de enzima insoluble del material en solución.

Es el método clásico más simple utilizado en la inmovilización de enzimas. Para que se produzca adsorción es preciso establecer un contacto adecuado entre la enzima y la superficie del soporte. Dependiendo de la naturaleza del soporte, el enlace con la enzima puede ser resultado de interacciones físicas, hidrofóbicas, de van der Waals o iónicas, considerándose esta última una interacción fuerte^[Greenough et al., 1994; Koopal y Nolte, 1994].

La gran ventaja de las técnicas de adsorción física se centra en su simplicidad. Pero, su principal inconveniente es la facilidad de desorción de las enzimas del soporte durante su utilización, al tratarse de equilibrios dinámicos basados en interacciones débiles.

En caso de utilización de adsorción iónica, su gran ventaja continúa siendo la simplicidad de trabajo. Este tipo de adsorción interactúa en mayor medida con la enzima y hay menos problemas de posibilidad de desorción, sin embargo al darse interacciones de tipo iónico, sí que se puede afectar a la estructura de la enzima de manera negativa, disminuyendo su actividad.

Se han utilizado estas técnicas para inmovilizar GOD sobre carbono activo platinizado en la construcción de electrodos o biosensores^[Greenough et al., 1994]. En otras ocasiones, suele emplearse una técnica mixta que inicialmente es adsorción, pero que pasa por una etapa posterior de entrecruzamiento con glutaraldehído. Este es el caso de la inmovilización de GOD sobre esferas de látex^[Koopal y Nolte, 1994].

En la inmovilización de CAT las técnicas de adsorción, en la bibliografía, aparecen como poco aconsejables, probablemente por la facilidad de lixiviación que presenta.

2.8.1.1.2. Atrapamiento.

Los métodos de atrapamiento consisten en el bloqueo del movimiento de las enzimas en una estructura molecular cerrada, pudiendo ser ésta la red de un polímero; o bien membranas semipermeables que presentan poros lo suficientemente pequeños como para evitar la lixiviación, aunque permitan la difusión de sustrato y producto.

La inmovilización por atrapamiento puede ser por: atrapamiento en gel, atrapamiento en fibra, porosa o trenzada, y microencapsulación.

La inmovilización por atrapamiento en gel implica la ubicación de las enzimas en los huecos intersticiales de la red de un polímero insoluble. Dichas redes pueden obtenerse a partir de sus precursores: monómeros, oligómeros o poliméricos, mediante cambios en las variables de solubilidad (disolvente, temperatura, fuerza iónica, y pH), y teniendo en cuenta las características de la reacción de gelificación.

La principal ventaja de estas técnicas de atrapamiento en gel se encuentra en que una vez ubicada la enzima en el soporte, no hay ningún tipo de problema por posible reacción química soporte-enzima que pueda alterar las características de ésta última. Sin embargo, muchas de estas técnicas precisan de la presencia de las enzimas en el medio, durante las reacciones químicas de la preparación de los polímeros y este período sí que puede representar una desventaja. Otro posible problema lo puede constituir el hecho de que las redes generadas presentan normalmente una distribución de tamaño de poros muy amplia, de modo que cuando se opera con el biocatalizador durante períodos de tiempo muy largos se registra cierta lixiviación en el medio de reacción.

Una de las técnicas más empleadas para la inmovilización de GOD, fundamentalmente para la construcción de electrodos, es su inmovilización por atrapamiento en películas de polipirrol^[Fortier et al., 1991; Fortier et al., 1990; Bélanger et al., 1989; Bélanger et al., 1990; Bélanger et al., 1992; Centonze et al., 1992]. También son muy utilizados los derivados del metacrilato.

La inmovilización de CAT puede realizarse por atrapamiento mediante la polimerización de epoxidiacrilato sobre membranas de celulosa [Selli et al., 1993], cuando se pretende construir electrodos; y también por atrapamiento en geles de alginato o c-carragenato^[Akertek y Tarhan, 1995].

En segundo lugar, en el atrapamiento en fibra, las enzimas son inmovilizadas en las microcavidades de ciertas fibras sintéticas. Este método ofrece ventajas derivadas de las características funcionales de estos soportes, como son: su resistencia frente a los ácidos y bases débiles, frente a valores elevados de fuerza iónica, y frente a algunos disolventes orgánicos. Por otra parte, el número de enzimas a inmovilizar mediante esta técnica es pequeño, puesto que sólo es efectivo para enzimas con pesos moleculares altos. Su inconveniente principal radica en la necesidad de utilizar medios inmiscibles con el agua, como disolventes poliméricos y agentes precipitantes, que pueden originar cierta desactivación parcial del catalizador^[Gemeiner, 1992].

También es posible inmovilizar GOD por atrapamiento sobre fibras compuestas de celulosa-óxido de titanio hidratado^[Kurokawa y Ohta, 1993]. Para CAT no se suele emplear esta técnica.

Por último, las técnicas de microencapsulación implican la inmovilización de las enzimas dentro de membranas esféricas semipermeables al paso sustratos y productos. Siendo las reacciones generadoras del encapsulamiento, generalmente, reacciones de coacervación o de interfase.

Entre las ventajas de la microencapsulación se encuentra el proporcionar una elevada relación superficie/volumen, que posibilita un contacto adecuado entre el sustrato y la enzima, y la posibilidad de inmovilizar varias enzimas en un sólo paso. Las principales desventajas radican en que la técnica no es aplicable a sustratos de elevado peso molecular, y suele producirse cierta desactivación del catalizador durante el proceso de inmovilización. En algunos casos, además se registra lixiviación.

La microencapsulación de GOD puede realizarse fácilmente formando membranas semipermeables de poliurea, mediante un proceso de polimerización interfacial, partiendo de toluendiisocianato y tetrametilenpentamina^[Hoshino et al., 1993].

Se presentan dos tablas, TABLAS 4 y 5, en las que se recogen los métodos físicos y soportes más utilizados para inmovilizar las enzimas GOD y CAT, respectivamente.

GOD	Técnica	Soporte	Grupos implicados	Aplicación	Observaciones	Referencia Bibliográfica
MÉTODOS FÍSICOS	ADSORCIÓN	Carbono activo platinizado		Construcción electrodos o biosensores		Greenough et al., 1994.
	Mixta: ADSORCIÓN + ENTRECruzamiento	Esferas de latex	Glutaraldehído		Inicialmente adsorción, luego entrecruzamiento con glutaraldehído.	Koopal y Nolte, 1994.
	ATRAPAMIENTO EN GEL	Películas de polipirrol		Construcción de electrodos.	Muy empleada. Polimerización por corriente eléctrica.	Fortier et al., 1990; 1991. Belanger et al., 1989; 1990; 1992. Centonze et al., 1992.
			Gel de polimetacrilato (PMMA)		Muy empleada. polimerización.	Masuda et al., 1993; 1994.
		Derivados del metacrilato.	Gel de polihidroxietilmetacrilato (PHEMA).		Polimerización.	Mercer y O'Driscoll, 1981.
	GELIFICACIÓN IONOTRÓPICA.	Alginato cálcico.	Cargas iónicas.		Técnica muy simple.	Nakao et al., 1994.
	ATRAPAMIENTO SOL-GEL.	Red de gel de sílice.	Tetrametoxiortosilicato (TMOS)		Técnica innovadora. Polimerización.	Brinker y Scherer, 1990. Yamanaka et al., 1992. Braun et al., 1992.
	ATRAPAMIENTO SOBRE FIBRAS.	Fibras: celulosa-óxido de titanio hidratado.				Kurokawa y Ohta, 1993.
	MICROENCAPSULACIÓN.	Membranas semipermeables poliurea.	Partiendo de: toluendiosulfonato y tetrametilpentamina.		Técnica muy simple. Polimerización interfaccial.	Hoshino et al., 1993.

TABLA 4. Métodos físicos empleados para la inmovilización de GOD.

CAT	Técnica	Soporte	Grupos implicados	Aplicación	Observaciones	Referencia Bibliográfica
M É T O D O S F Í S I C O S	ADSORCIÓN	Piel sintética.	N-acetilgalactosamina y glucosamina.		Es uno de los menos empleados, por los problemas de lixivia- ción que presenta.	Solas et al, 1994.
	ATRAPAMIENTO EN GEL	Geles de alginato. χ-carragenato.		Construcción de electrodos. Construcción de electrodos.		Akertek y Tarhan, 1995. Akertek y Tarhan, 1995.
	ATRAPAMIENTO SOBRE FIBRAS	Membranas de celulosa.	Polimerización epoxi- diacrilato sobre las membranas de celulosa.	Construcción de electrodos.		Selli et al., 1993.

TABLA 5. Métodos físicos empleados para la inmovilización de CAT.

2.8.1.2. Métodos químicos.

2.8.1.2.1. Entrecruzamiento.

Los métodos de entrecruzamiento están basados en la formación de enlaces entre las moléculas de enzima, en ausencia de soporte, o entre las enzimas y un soporte. Este tipo de inmovilización suele realizarse mediante el uso de reactivos bi- o multifuncionales, denominados brazos espaciadores, tales que en sus extremos poseen grupos funcionales, que reaccionan por un extremo con un grupo funcional de una enzima y por el otro con otro grupo, bien de otra enzima, bien de un soporte. Entre los reactivos más empleados para este tipo de inmovilización destaca el glutaraldehído [Hossain y Do, 1985; Tse et al., 1987; Thompson y Kim, 1988; Wu y Weng, 1990; Dalvie y Baltus, 1992; Murakami, et al., 1994; Matuszewski et al., 1994].

Existen algunas técnicas para inmovilizar GOD por entrecruzamiento. Uno de los principales reactivos para dicha técnica son los derivados de la acrilamida, como es el caso del copolímero acrilamida-metacrilamida [Rishpon et al., 1990]. También se ha inmovilizado glucosa oxidasa por entrecruzamiento en un soporte mixto: polivinilalcohol-algodón [Kozhukharova et al., 1988].

Las enzimas GOD y CAT han sido inmovilizadas por entrecruzamiento sobre espuma de clara de huevo mediante reacción con glutaraldehído [Marolia y D'Souza, 1994], fundamentalmente con objeto de eliminar glucosa. Otros dos soportes para inmovilización por entrecruzamiento son el gel de poliacrilamida, por reacción con glutaraldehído [Tarhan y Uslan, 1991], y el alcohol polivinílico, mediante reacción con tereftaldicarboxialdehído y 2-amino-4,6-dicloro-s-triazina [Tarhan, 1991].

2.8.1.2.2. Enlace iónico.

Método basado en fijar las enzimas a soportes que contienen residuos cambiadores de iones, diferenciándose de la adsorción en que la unión es mucho más fuerte. La fortaleza que adquiera la unión enzima-soporte depende fundamentalmente del pH y la fuerza iónica del medio. Esta dependencia hace que pequeños cambios en dichos factores puedan provocar la lixiviación de la enzima [McLaren y Packer, 1970; Gemeiner, 1992].

Los soportes utilizados normalmente son resinas cambiadoras de iones, bien catiónicas (carboximetil, sulfopropil y derivados de sulfato), bien aniónicas (dietilaminoetil, amonio cuaternario, y derivados de trietanolaminas).

2.8.1.2.3 Enlace metálico.

La unión enzima-soporte mediante enlace metálico implica el uso de compuestos químicos que contengan metales de transición. La utilización de dichos compuestos tiene por objeto activar la superficie del soporte y permitir el acoplamiento directo de la enzima [Gemeiner, 1992].

Entre dichos compuestos se encuentran, fundamentalmente, las sales amónicas de titanio y circonio, obtenidas mediante neutralización de las sales de los metales de transición

con amoníaco. En algunas ocasiones se utilizan como soportes óxidos hidratados metálicos.

Un ejemplo muy representativo de este tipo de inmovilización lo constituyen los iones titanio, que se coordinan fundamentalmente con los grupos nucleófilos (hidróxidos, tioles, amino, etc.) de las enzimas y soportes, proporcionando enlaces adecuados. Los mejores soportes para este tipo de inmovilización son aquellos que contienen grupos hidroxilos susceptibles de ser intercambiados, como es el caso de la celulosa.

Dentro de las técnicas para inmovilizar CAT mediante enlace metálico, destaca su inmovilización en cerámicas que contienen ZrO_2 ^[Jirstein et al., 1992].

2.8.1.2.4. Enlace covalente.

Los métodos de enlace covalente se basan en la promoción, en las condiciones de reacción adecuadas, de la unión covalente de la enzima con el soporte. Estos métodos presentan algunos inconvenientes importantes, como son la dificultad en la selección de las condiciones de inmovilización y la escasez de soportes que posean grupos reactivos adecuados para el enlace directo a las enzimas. Entre los soportes adecuados se encuentran copolímeros derivados del anhídrido maleico, y copolímeros basados en anhídridos del ácido metacrílico y derivados fluorados, yodoalquilmetacrilatos, etc.^[Means y Feeney, 1971; Srere y Uyeda, 1976]

La mayoría de los soportes no poseen estos grupos reactivos, aunque sí contienen otros grupos como hidroxilo, amino, amido o carboxilo, que requieren activación previa a la formación del enlace covalente enzima-soporte. En la elección del método de inmovilización, es preciso tener en cuenta que el soporte no utilice para su enlace con la enzima, grupos reactivos pertenecientes al centro activo, puesto que se registraría una disminución en su actividad catalítica.

Las mayores ventajas de las técnicas de inmovilización covalente consisten en que no se registra lixiviación de las enzimas fuera del soporte; además, dada la amplia variedad de reacciones y soportes con grupos funcionales adecuados (o susceptibles de ser activados), se trata de un método de inmovilización de aplicabilidad general.

Los casos de inmovilización de la enzima GOD por enlace covalente son los más numerosos dentro del conjunto de referencias bibliográficas. Entre los soportes más empleados para esta enzima se encuentran todos aquellos derivados que proceden de la sílice, o la inmovilización sobre esferas de vidrio o alúmina, láminas de nylon, etc.

La enzima CAT también ha sido inmovilizada en partículas de vidrio activadas por gaminopropiltriétoxisilano, que luego anclan a la enzima mediante reacción con glutaraldehído; y sobre alumina y perlita.

En la bibliografía también se han encontrado datos acerca de la inmovilización conjunta de GOD y CAT sobre DEAE-Sephadex^[Tarhan, 1991] y sobre membranas de colágeno^[Tse et al., 1987], utilizando glutaraldehído como reactivo.

En las TABLAS 6 y 7 se presentan los métodos químicos y soportes más utilizados para inmovilizar GOD y CAT, respectivamente. Además, al final de la TABLA 7 se recogen las dos técnicas halladas en la bibliografía para inmovilizar GOD y CAT a la vez en un mismo soporte.

GOD	Técnica	Soporte	Grupos implicados	Aplicación	Observaciones	Referencia Bibliográfica	
MÉTODOS QUÍMICOS	ENTRECRUZAMIENTO.	Derivados de la acrilamida.	Copolímero: acrilamida-metacrilamida	Construcción de electrodos.		Rishpon et al., 1990.	
			poli (N-isopropilacrilamida-co-vinilferroceno) (PAF).	Construcción de electrodos.		Tatsuma et al., 1994.	
		SopORTE mixto.		polivinilalcohol-algodón.	Construcción de electrodos.		Kozhukharova et al., 1988.
		Derivados de la sílice.		Derivado carbonilo de gel de sílice (Spherosil XOB015)		Activado mediante Cloruro de titanio (IV).	Gonçalves et al., 1991.
		Esferas de vidrio				Activado con γ -aminopropiltriethoxisilano. Posterior reacción con glutaraldehído.	Hossain y Do, 1985. Thompson y Kim, 1988. Wu y Weng, 1990. Murakami et al., 1994.
		Derivados de sílice y esferas de vidrio.				Técnicas complejas. Reacción con clorhidrato de carbodiimida.	Mikkelsen y Lemox, 1991.
		Alumina				Activado γ -aminopropiltriethoxisilano, reacción con glutaraldehído	Dalvie y Batus, 1992.
		Silicohome				Se activa con borohidruro sódico.	Abraham et al., 1993.
		Láminas de nylon					Thompson y Kim, 1988.
		Membranas de poliéster					Reacción con glutaraldehído.
		Gel de poliacrilamida con terephthalato de polietileno.			Activado con hipobromito sódico.	Carvalho et al., 1986.	

TABLA 6. Métodos químicos empleados para la inmovilización de GOD.

CAT	Técnica	Soporte	Observaciones	Referencia Bibliográfica
MÉTODOS QUÍMICOS	ENTRECRUZAMIENTO	Gel de poliacrilamida.	Por reacción con glutaraldehído.	Tarhan y Uslan, 1991.
	ENLACE COVALENTE	Alcohol polivinílico	Por reacción con tereftalaldehído y 2-amino-4,6-dicloro-s-triazina.	Tarhan, 1991.
		Esferas de vidrio	Activado con g-aminopropiltriétilsilano. Posterior reacción con glutaraldehído.	Vasudevan y Weiland, 1990. Hossain y Do, 1992. Akertek y Tarhan, 1995.
		Alúmina	Usando los mismos reactivos.	Vasudevan y Thakur, 1994.
		Perlita	Usando los mismos reactivos.	Tarhan y Telefoncu, 1992.
		Dextrano		Krusteva et al., 1992.
	ENLACE METÁLICO	Poli(tetrafluoroetileno)-co-ác. acrílico.		Brett et al., 1992.
		Cerámicas que contienen ZrO ₂	Tratadas inicialmente con ác. 6-amino-1-hidroxi-1,1-bifosfónico y luego con glutaraldehído.	Jirstetein et al., 1992.
GOD + CAT	ENTRECRUZAMIENTO	Espuma de clara de huevo.	Reacc. con glutaraldehído. Usado para eliminar glucosa.	Marolia y D'Souza, 1994.
	ENLACE COVALENTE	DEAE-sephadex		Tarhan, 1991
		Membranas de colágeno		Tse et al., 1987.

TABLA 7. Métodos químicos empleados para la inmovilización de CAT.

2.8.2. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN PARA ENZIMAS INSOLUBLES EN MEDIO ACUOSO.

2.8.2.1. Inmovilización de enzimas insolubles sin derivación.

Las técnicas de inmovilización de enzimas insolubles se basan en el confinamiento físico en membranas semipermeables, fibras huecas o membranas de ultrafiltración, con objeto de ser utilizadas durante largos períodos de tiempo^[Kennedy y Melo, 1990].

Entre sus ventajas más relevantes cabe destacar que se trata de un método simple, que permite la inmovilización simultánea de varias enzimas, y que no existe lixiviación. Además, en raras ocasiones se produce ataque bacteriano a este tipo de sistemas.

Por otra parte, las desventajas que presenta son inherentes a la técnica de inmovilización, registrándose reducción de las velocidades de reacción debido a la resistencia a la permeabilidad de las membranas. Otras desventajas son la desactivación parcial de la enzima, debido a fuerzas de agitación intensas, y dificultades para trabajar con bajas concentraciones de sustrato, debido a fenómenos de absorción en la membrana.

2.8.2.2. Inmovilización de enzimas insolubles por derivación.

Las enzimas insolubles pueden ser modificadas químicamente por reacción con compuestos de elevado peso molecular. Sin embargo, se pueden utilizar compuestos de bajo peso molecular en aquellas situaciones en las que éstos aumentan la estabilidad de la enzima o el peso molecular del complejo. Una vez derivada la enzima insoluble y transformada en soluble, es posible su inmovilización, fundamentalmente en membranas semipermeables.

Las reacciones empleadas en la preparación de derivados solubles poliméricos suelen ser análogas a las utilizadas para inmovilización covalente de las enzimas a soportes insolubles^[Kennedy y Melo, 1990].

Este método permite el uso de membranas de ultrafiltración con porosidades elevadas, posibilitando una difusión más rápida de los productos, y reduciendo los efectos de la inhibición por producto.

El mayor inconveniente para la preparación de derivados insolubles estriba en la gran laboriosidad de los procesos de purificación requeridos en la etapa final de separación.

2.9. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA POR ATRAPAMIENTO EN GELES DE ALGINATO.

La algina y los alginatos son polímeros orgánicos conocidos y utilizados desde hace 60 años en la industria alimentaria, debido a su capacidad para estabilizar, emulsificar, suspender, formar películas y producir geles^[Gemeiner, 1992]. Otra de sus principales ventajas es que constituye un extenso grupo de soportes no tóxicos adecuados para la administración de medicamentos, mediante liberación controlada^[Lee et al., 1979]. Además de sus aplicaciones en medicina, los geles de alginato cálcico presentan un gran interés en la agricultura como medio para dosificar herbicidas^[Leng et al., 1983] y pesticidas^[Sutton y Gaddy, 1980 y, Schacht y Vandichel, 1988] mediante liberación controlada.

Podemos afirmar que la inmovilización en geles de alginato presenta sensibles ventajas ante otros procedimientos, Así, se trata de una técnica:

- Segura: se trabaja con moléculas de procedencia orgánica y suelen ser inertes, por tanto se trata de técnicas factibles en un gran número de campos de aplicación.
- Rápida: al tratarse de técnicas de inmovilización por métodos físicos, son técnicas de fácil y rápida aplicación.
- Versátil: hemos visto anteriormente cómo se pueden aplicar a la medicina, a la agricultura, etc.
- Barata: ya que estos polímeros son obtenidos fácilmente y en cantidades apreciables a partir de una gran variedad de plantas o también suele aislarse alginato bacteriano de muy diversas cepas.

Sin embargo, no todos son ventajas, el alginato posee ciertas características desfavorables^[Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990]:

- Baja estabilidad: los geles son muy sensibles frente a agentes quelatantes de los iones Ca^{2+} , como fosfato o citrato; o también a la presencia de altas concentraciones de iones que no inducen la gelificación, como pueden ser Na^+ y Mg^{2+} .
- Alta porosidad: suelen poseer redes de tamaño de hueco elevado limitando su utilización a células enteras, orgánulos y proteínas de elevado peso molecular (enzimas). Presentan, además, una distribución de tamaño de poros heterogénea, haciendo difícil el controlar posibles problemas de lixiviación; siendo esto, en muchos casos, una ventaja al permitir elevadas velocidades de difusión de sustratos y productos.
- Biocompatibilidad: aunque los alginatos reúnen todas las características requeridas para los aditivos alimentarios y farmacéuticos, algunos tipos de polímeros algínicos contienen polifenoles que pueden dañar las células sensibles. Su utilización como material de implantación requiere una total ausencia de pirógenos y materiales inmunogénicos.

Así pues, las características óptimas deseables en los geles de alginato para su uso en inmovilización deben ser: elevada estabilidad mecánica y química; propiedades de esponjamiento adecuado; bajo contenido en contaminantes pirogénicos e inmunogénicos; y tamaño de poro controlado, dentro de una estrecha distribución.

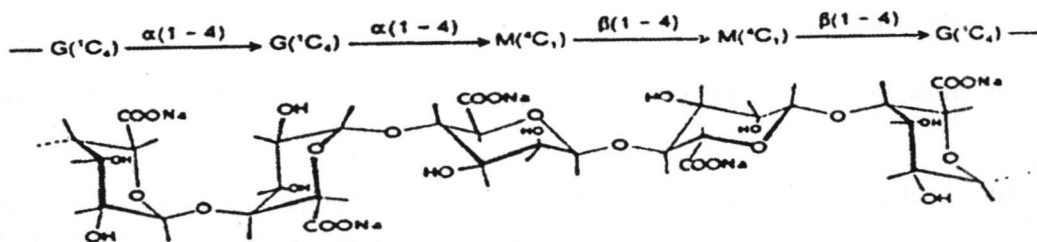
2.9.1. FUENTES DE OBTENCIÓN DE ALGINATOS.

Los alginatos comerciales se obtienen fundamentalmente de *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* y *Ascophyllum nodosum*; y en menor medida, de *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negrescens* y *Sargassum* sp. Normalmente las plantas *L. hyperborea* suelen presentar los contenidos más elevados en residuos de ácido α -L-gulurónico. Los alginatos obtenidos de *A. nodosum* y *L. japonica* se caracterizan por un bajo contenido en ácido α -L-gulurónico originando geles débiles.

El alginato bacteriano, suele aislarse de *Azotobacter vinelandii* que, en contraste con otras especies de *Pseudomonas*, producen polímeros que contienen ácido α -L-gulurónico.

2.9.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ALGINATOS.

En términos moleculares, los alginatos constituyen una familia de copolímeros binarios no ramificados de ácido β-D-manurónico (M) y ácido α-L-gulurónico (G) que presentan uniones (1→4) (FIGURA 9). Los polímeros de alginato presentan una composición química y una secuencia muy variables dependiendo del organismo y, en concreto, del tejido del que han sido aislados. Los monómeros se agrupan en bloques que siguen un patrón a lo largo de la cadena, con regiones homopoliméricas (bloques M y G) espaciados por regiones de estructura alterante (bloques MG)^[Smidsrfd y Skjåk-Bræk, 1990].



G: ácido gulurónico.

M: ácido manurónico.

FIGURA 9. Detalle de la secuencia de la estructura química del alginato sódico; dímeros F_{GG} , F_{GM} , F_{MM} , F_{MG} .

La estructura y composición de los bloques condicionan en gran medida las propiedades funcionales del alginato como matriz de inmovilización. Los alginatos no tienen ninguna unidad regular que se repita y, excepto en el caso de *Ascophyllum nodosum*, la distribución de monómeros a lo largo de la cadena polimérica no sigue una secuencia estadística. De acuerdo con esto, la secuencia característica no es determinada por la repetición de los monómeros (frecuencia de monómeros), solamente, sino por la frecuencia de dímeros, trímeros y grupos de mayor orden. En este sentido, las técnicas de análisis por RMN se presentan como la herramienta ideal para determinar la frecuencia de los cuatro dímeros vecinales más próximos F_{GG} , F_{GM} , F_{MG} y F_{MM} y la frecuencia de los ocho trímeros posibles F_{GGG} , F_{GGM} , F_{MGG} , F_{MGM} , F_{MMM} , F_{MMG} , F_{GMM} y F_{GMG} .

Una vez conocidas las frecuencias de aparición de dímeros y trímeros es posible el cálculo del número promedio de bloques G y M:

$$\bar{N}_G = F_G / F_{MG}$$

Ecuación 55

$$\bar{N}_M = F_M / F_{MG}$$

Ecuación 56

Para bloques constituidos al menos por dos unidades contiguas, las longitudes medias de bloque son:

$$\bar{N}_{G>1} = (F_G - F_{MGM}) / F_{MGG}$$

Ecuación 57

$$\bar{N}_{M>1} = (F_M - F_{GGM}) / F_{MGG}$$

Ecuación 58

Como puede apreciarse en la TABLA 8, tanto la composición como la estructura del bloque pueden variar para los diferentes tipos de alginato.

Fuente	F _G ^a	F _{GG} ^b	F _{GGG} ^b	N _{G>1} ^c
<i>A. nodosum</i>	0,10	0,04	0,02	3,0
<i>D. antarctica</i>	0,29	0,15	No determinado	No determinado
<i>L. japonica</i>	0,34	0,16	No determinado	No determinado
<i>M. pyrifera</i>	0,39	0,16	0,12	5,0
<i>E. maxima</i>	0,45	0,22	0,17	5,4
<i>L. digitata</i>	0,41	0,25	0,20	6,0
<i>L. hyperborea</i>	0,75	0,66	0,62	17,5

^a:F_G: fracción molar de ácido gulurónico;

^b:F_{GG} y F_{GGG}: frecuencias de diadas y triadas, respectivamente;

^c:N_{G>1}: número promedio de unidades G consecutivas.

TABLA 8. Composición y parámetros de frecuencia para distintos alginatos.

2.9.3. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS GELES DE ALGINATO.

La rigidez intrínseca de las moléculas de alginato en solución aumenta según la relación: MG<MM<GG, aunque la viscosidad depende fundamentalmente del tamaño molecular. Por el contrario, el enlace de cationes y las propiedades gelificantes dependen de la composición y la secuencia^[Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990]. Así, los cationes bivalentes como Ca²⁺, Sr²⁺ y Ba²⁺ se unen preferentemente a los bloques G de forma altamente cooperativa; alcanzándose tamaños de unidad cooperativa por encima de los 20 monómeros. Es precisamente este enlace selectivo de cationes el que proporciona al alginato su capacidad de formar geles ionotrópicos.

Los residuos G unidos diaxialmente forman cavidades que funcionan como sitio de enlace para los iones (FIGURA 10). Los enlaces formados entre estos sitios y secuencias similares en otras cadenas poliméricas, dan lugar a zonas de unión en la red del gel. Puede decirse, por tanto, que la longitud de los bloques G es, sin embargo, la característica estructural más importante que contribuye a la formación del gel^[Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990].

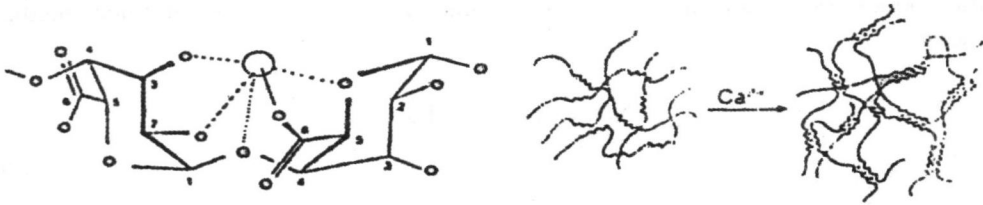


FIGURA 10. Esquema de la formación de la red de alginato cálcico.

2.9.4. PARTÍCULAS DE GELES DE ALGINATO.

La forma más frecuente de inmovilización en geles de alginato se basa en la obtención de partículas esféricas gelificadas sobre una solución que debe contener los cationes adecuados. A continuación, se expone un conjunto de características importantes relativas a este tipo de partículas.

2.9.4.1. Tamaño de partícula.

Los estudios experimentales demuestran^[Martinsen et al., 1989] que las propiedades mecánicas y el aumento de tamaño en las esferas de gel, dependen en gran medida de la composición monomérica, la estructura de los bloques, y el tamaño molecular de las moléculas de alginato.

Para el caso concreto de la generación de partículas de geles de alginato cálcico, el tamaño y la esfericidad de las partículas es función principalmente de la viscosidad de la solución de alginato sódico y de la distancia entre el dispersador de reactivo y la solución de CaCl_2 .

Por otra parte, en los geles de alginato cálcico se dan ciertos fenómenos de contracción durante la formación del gel, originando una pérdida de agua y un aumento de concentración de alginato respecto de la solución de partida. Normalmente, las mayores contracciones suelen darse en los geles que contienen bajas proporciones en grupos G.

2.9.4.2. Propiedades mecánicas.

En el caso de polímeros con peso molecular muy elevado, la resistencia mecánica de los geles de alginato viene determinada fundamentalmente por su composición química y la estructura del bloque, y es independiente del peso molecular. Este, sin embargo, no es el caso de los alginatos con bajo peso molecular, puesto que, por debajo de un peso molecular crítico, la capacidad para formar geles se reduce.

Por otra parte, la turbidez de los geles de alginato cálcico se relaciona habitualmente de manera inversa con la fuerza del gel. Los geles transparentes fuertes se consiguen utilizando alginatos con un contenido en bloques G mayores del 60%. Una propiedad fundamental de los geles de alginato cálcico, en contraste con otros hidrogeles, es su aplicabilidad en un amplio rango de disolventes orgánicos, pudiendo utilizarse para inmovilizar enzimas en disolventes no acuosos sin pérdida apreciable de fortaleza.

2.9.4.3. Estabilidad química.

La limitación más importante para el uso de alginato cálcico como matriz de inmovilización es su sensibilidad frente a compuestos quelatantes como fosfato, citrato y lactato, o cationes antigelificantes como Na^+ o Mg^{2+} .

Se han sugerido varias vías para intentar solucionar este problema, siendo la más simple mantener las partículas de gel en una solución que contenga una pequeña concentración de iones calcio libres y mantener la relación de iones $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por debajo de 25:1, para alginatos con elevado contenido en grupos G, y en 3:1, para alginatos con bajo contenido en grupos G^[Martinsen et al., 1989]. Sin embargo, los geles de alginato pueden estabilizarse además reemplazando los iones calcio por otros cationes bivalentes más afines por el alginato que confieran una mayor fuerza a la red.

La serie de afinidad para cationes bivalentes es: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} = \text{Ni}^{2+} = \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. En este sentido, los estudios de correlación^[Smidsrød, 1974] entre la resistencia mecánica del gel y su afinidad por los cationes mostraron que la rigidez de los geles de alginato, en general, se incrementa con la afinidad: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} = \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$.

Normalmente, debido a la elevada toxicidad de algunos cationes, en aplicaciones biotecnológicas sólo suele emplearse Sr^{2+} además del Ca^{2+} , aunque recientemente se ha inmovilizado fenol oxidasa en alginato cúprico^[Palmieri et al., 1994] con muy buenos rendimientos oxidativos. En algunos casos también se han empleado iones multivalentes tales como Ti^{3+} y Al^{3+} , e incluso Fe^{3+} .

Una propiedad empleada para aumentar la estabilidad de los geles de alginato es su capacidad para formar complejos fuertes con algunos policationes, como los polipéptidos o los polímeros sintéticos como la polietilenimina. Se trata de complejos insolubles en presencia de secuestrantes de cationes Ca^{2+} o cationes no gelificantes, que suelen emplearse para estabilizar los geles y para reducir su porosidad.

Otra forma de estabilizar los geles de alginato es el entrecruzamiento covalente, que puede realizarse mediante técnicas tales como el entrecruzamiento directo de los grupos carboxilos o por unión covalente del alginato con polímeros sintéticos. Como consecuencia se obtienen geles con una gran estabilidad y resistencia mecánica.

Sin embargo, todas estas técnicas presentan los graves inconvenientes que se derivan de tratamientos con reactivos químicos, no muy aconsejables en aplicaciones biotecnológicas.

2.9.4.4. Difusión molecular y tamaño de poro.

Uno de los aspectos fundamentales en el estudio de todo soporte de inmovilización es el tamaño de poro y la distribución de tamaños de poro. En el caso de los geles de alginato, la difusión de las moléculas pequeñas no se afecta de manera apreciable por la matriz de alginato, mientras que el transporte de moléculas grandes se ve seriamente restringido.

Se han realizado numerosos estudios acerca de la porosidad de los geles de alginato utilizando diferentes técnicas; una de ellas es la microscopía electrónica, que predice un tamaño de poro de entre 5nm y 200nm de diámetro, para los geles de alginato cálcico al 2%. Otra técnica para determinar la porosidad de las partículas de geles de alginato consiste en empaquetar-

las en columnas y registrar los volúmenes de exclusión (cromatografía de exclusión por tamaños) para macromoléculas estándar. Los resultados indican un valor de corte de 6,8 a 16,6 nm para geles de alginato cálcico al 2%^[Klein y Kressdorf, 1985].

La comparación entre resultados conduce a pensar que existe una red más cerrada en la parte superficial de la partícula que en el interior de la misma. Por otra parte, el tamaño efectivo de poro puede modificarse por interacción electrostática entre la matriz de alginato, cargada negativamente, y las proteínas inmovilizadas^[Smidsrfd y Skjåk-Bræk, 1990].

Hasta hace poco tiempo se pensaba que las partículas de alginato podían caracterizarse por una concentración específica de alginato y que esta concentración era la misma en todas las partes del gel. Esto, sin embargo, no es exactamente así presentando los geles diversos grados de anisotropía, en función de la forma de adición de los iones calcio. Así, la concentración de polímero suele ser mayor en la interfase polímero-Ca²⁺, decreciendo hacia el centro del gel. Esta no homogeneidad se debe, muy probablemente, a un mecanismo de gelificación irreversible caracterizado por fuertes uniones entrecruzadas de iones. Dicho proceso parece estar gobernado por la velocidad de difusión de los iones Ca²⁺ y la velocidad de difusión de las moléculas de polímero, a través de las zonas gelificadas previamente. Esto suele venir determinado, en parte, por las dimensiones de las partículas de gel. Así, cuanto mayores son las partículas, mayor es el gradiente de concentración de polímero. De hecho se han conseguido geles con una concentración del 10% en superficie y menos del 0,2% en el interior^[Smidsrfd y Skjåk-Bræk, 1990].

Podría decirse que la estructura del gel de alginato está gobernada no sólo por la concentración, las fuerzas electrostáticas, y la estructura química, sino por la cinética de formación del gel. Por ello, normalmente, no son totalmente comparables los datos de varios investigadores que hayan trabajado en diferentes condiciones experimentales^[Martinsen et al., 1992].

En el caso concreto de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, sus dimensiones esféricas promedio son 8,4 nm y 18,3 nm de diámetro respectivamente^[Messing, 1974]; por tanto, si se considera que las enzimas en solución presentan un tamaño aproximadamente doble, parece razonable pensar que la enzima glucosa oxidasa podría difundir al exterior sólo en una pequeña proporción, mientras que la enzima catalasa no difundiría. En este sentido, existen estudios que aseguran que la enzima glucosa oxidasa no difunde en absoluto desde las partículas de gel de alginato cálcico; fundamentalmente debido a interacciones de tipo electrostático con el soporte^[Kierstan y Bucke, 1977].

Un aspecto de importancia crucial, cuando se pretende inmovilizar enzimas que requieren oxígeno para el desarrollo de su actividad catalítica, es la transferencia de oxígeno a través del gel. Por ello, se hace preciso elegir un soporte que presente una elevada difusividad de oxígeno. En concreto, para el alginato cálcico al 2%, dicho coeficiente de difusión vale $2,11 \cdot 10^{-9}$ m²/s; es decir, el 77% del valor correspondiente al coeficiente de difusión en agua pura^[Hulst et al., 1989], mientras que en la mayoría de los soportes poliméricos resulta ser sensiblemente más bajo. Así, por ejemplo, en el caso de agar a 30°C dicho valor es $1,94 \cdot 10^{-9}$ m²/s, correspondiente al 70% del coeficiente de difusión en agua pura^[Hulst et al., 1989] e incluso para el alginato de bario al 2% dicho coeficiente toma el valor $0,7 \cdot 10^{-9}$ m²/s a 37°C (el 25% del coeficiente de difusión en agua pura)^[Hulst et al., 1989].

En consecuencia, del amplio estudio reflejado en la bibliografía se deduce que, el alginato cálcico se muestra como uno de los mejores soportes para la inmovilización de enzimas que requieren oxígeno para su actividad catalítica.

2.10. FENÓMENOS DE DIFUSIÓN EN LA INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.

Cuando el catalizador, en nuestro caso la enzima, queda inmovilizada en el interior de una partícula, hemos de tener en cuenta que antes y después de la reacción catalítica en sí, han de existir otra serie de etapas que aparecen como consecuencia del transporte de la materia hacia dentro y hacia fuera de las partículas catalíticas. Los reactivos han de ser transportados desde el seno de la disolución hasta la superficie de la partícula catalítica, posteriormente ser transportados a través de los poros hasta los centros activos, donde se llevará a cabo la reacción catalítica. Una vez finalizada ésta, es necesario el transporte de los productos a través de los poros y del seno de fluido^[Smith, 1977]. A continuación se presenta un esquema de las etapas que han de tener lugar en la reacción catalítica heterogénea (FIGURA 11).

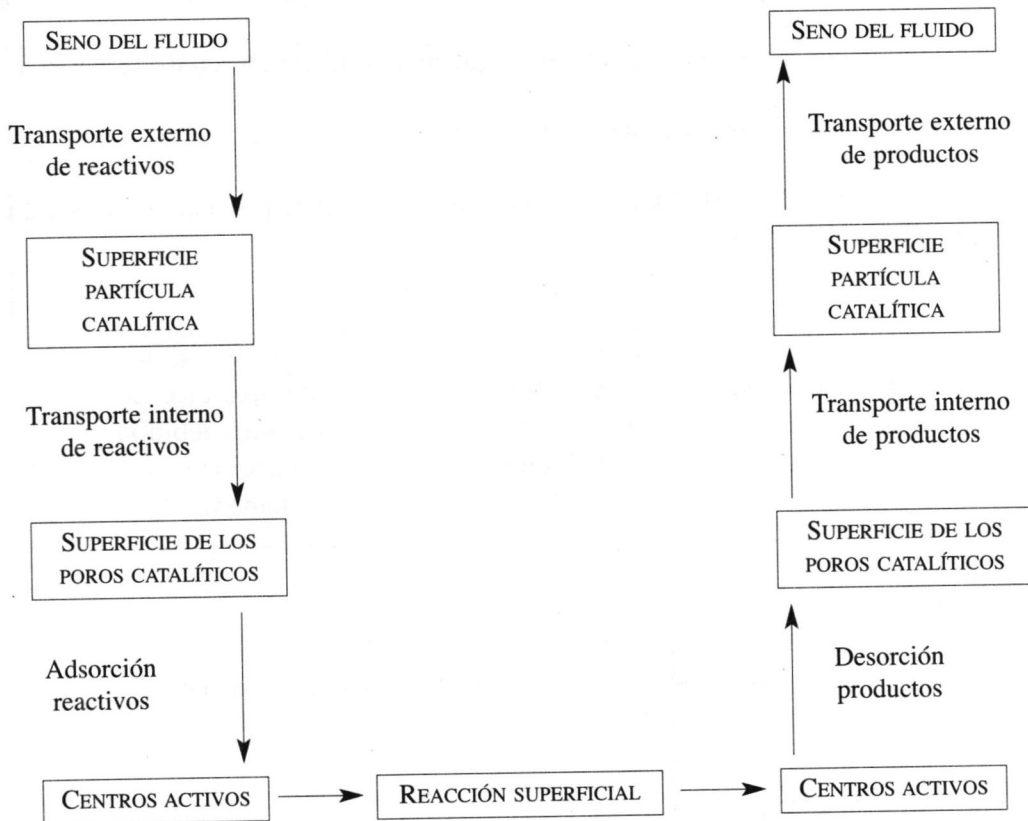


FIGURA 11. Esquema de las distintas etapas dadas en una reacción catalítica heterogénea^[Smith, 1977].

2.10.1. DIFUSIÓN EXTERNA. TEORÍA DE LA CAPA LÍMITE.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, las moléculas de sustrato situadas en el seno del fluido deben ser transportadas en primer lugar hasta la interfase con la superfi-

cie de la partícula de catalizador, a través de la capa límite que se origina sobre la superficie de la misma. Esta etapa de transferencia de materia es lo que se conoce como “difusión externa”.

La fuerza impulsora de la difusión externa es el gradiente de concentración entre el medio de reacción y la superficie de la partícula catalítica. Por otro lado, el espesor de la capa límite depende de las condiciones hidrodinámicas del sistema.

Cuanto mayor sea la velocidad relativa del fluido respecto del sólido, más fina será dicha capa límite.

La expresión general que rige la difusión externa estará íntimamente relacionada con la teoría de la capa límite (FIGURA 12). Dicha teoría parte de las siguientes hipótesis:

- El flujo de transporte se corresponde a una película de espesor δ , en la que el transporte se considera molecular.
- Se admite que el fluido en la película se puede considerar en reposo respecto al sólido.
- La película se encuentra en estado estacionario.

Si se toma, sobre la FIGURA 12, un elemento diferencial de película de espesor Δx y se aplica un balance de materia:

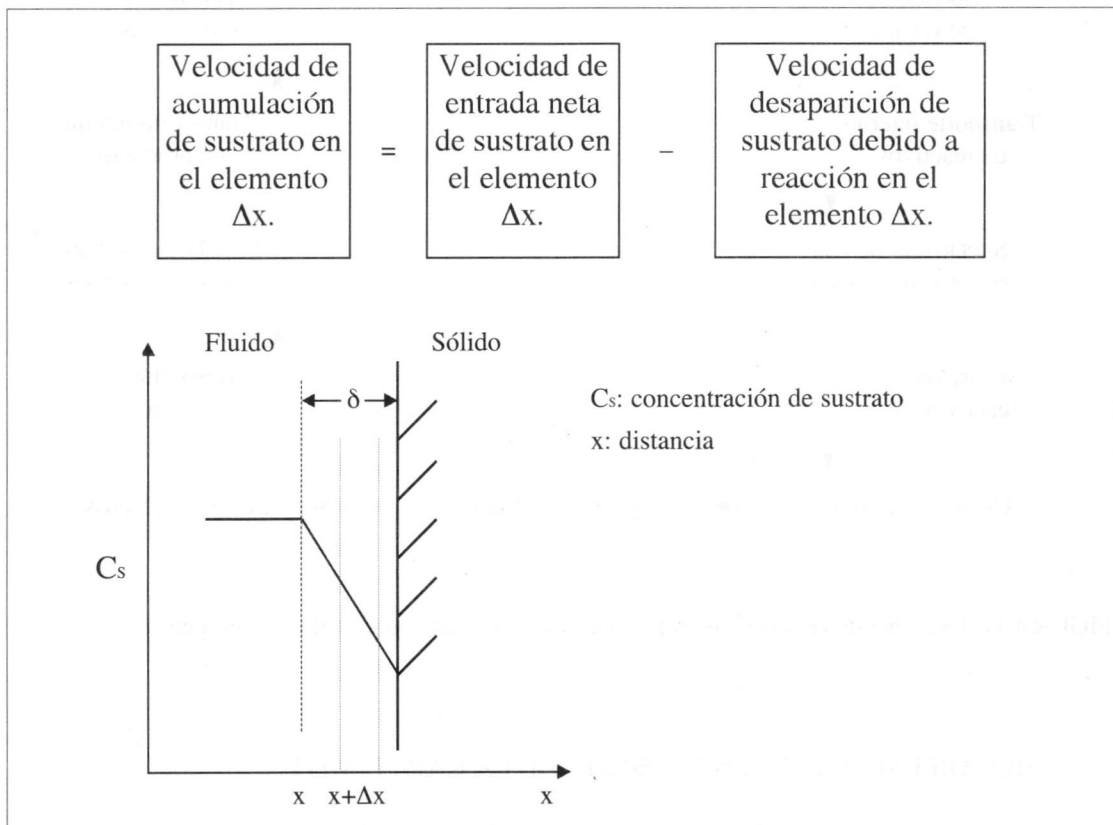


FIGURA 12. Esquema representativo bidimensional de la capa límite, de espesor δ [Smith, 1977].

El balance de materia será el siguiente:

$$\Delta V \cdot \frac{\partial C_s}{\partial t} = J_s|_x \cdot S_x - J_s|_{x+\Delta x} \cdot S_{x+\Delta x} - (-r_s) \cdot \Delta V$$

Ecuación 59

Donde se tiene:

ΔV : elemento de volumen (m^3).

C_s : concentración molar de sustrato (mol / m^3).

x : distancia (m).

J_s : densidad de flujo molar ($mol / m^2 \cdot s$).

$(-r_s)$: velocidad de desaparición de sustrato ($mol / m^3 \cdot s$).

La densidad de flujo, tanto en la posición x como en la posición $x+\Delta x$ vendrá dada por la ley de Fick:

$$J_s = -D_{AB} \cdot \nabla C_s$$

Ecuación 60

Donde se tiene:

D_{AB} : difusividad del sustrato en el sólido catalítico (m^2 / s).

∇C_s : gradiente de la fracción molar (m^{-1}).

Se supondrá que la superficie evaluada es aproximadamente la misma en x que en $x+\Delta x$.

$$S_x = S_{x+\Delta x} = S$$

$$\Delta V = S \cdot \Delta x$$

Ecuación 61

Sustituyendo y posteriormente simplificando en la ecuación 59, se tendrá:

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = \frac{J_s|_x - J_s|_{x+\Delta x}}{\Delta x} - (-r_s)$$

Ecuación 62

Haciendo tender Δx a cero y tomando límites se puede afirmar:

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = - \frac{\partial J_s}{\partial x} - (-r_s)$$

Ecuación 63

Suponiendo hipótesis de estado estacionario se tiene:

$$\begin{aligned}\frac{\partial C_s}{\partial t} &= 0 \\ (-r_s) &= 0\end{aligned}$$

Ecuación 64

Luego:

$$-\frac{\partial J_s}{\partial x} = 0$$

Ecuación 65

Al darse sólo transporte unidireccional:

$$\begin{aligned}J_s &= -D_{AB} \cdot \nabla C_s \\ J_s &= -D \frac{\partial C_s}{\partial x}\end{aligned}$$

Ecuación 66

Se tendrá sustituyendo en la ecuación 65:

$$\begin{aligned}-\frac{\partial}{\partial x} \left[-D \frac{\partial C_s}{\partial x} \right] &= 0 \\ \frac{\partial^2 C_s}{\partial x^2} &= 0 \\ \frac{d^2 C_s}{dx^2} &= 0\end{aligned}$$

Ecuación 67

Las condiciones de contorno son:

Para $x = 0$ $C_s = C_{sF}$; concentración de sustrato en el fluido.
Para $x = \delta$ $C_s = C_{sS}$; concentración de sustrato en la superficie del catalizador.

Por tanto:

$$C_s = C_{sF} - \frac{C_{sF} - C_{sS}}{\delta} \cdot x$$

Ecuación 68

El flujo de sustrato en el interior de la película en la dirección x , según la Ley de Fick, ecuación 66, será:

$$\frac{dC_s}{dX} = \frac{C_{SF} - C_{SS}}{\delta}$$

$$J_s = \frac{D_{AB}}{\delta} (C_{SF} - C_{SS})$$

Ecuación 69

Es posible observar, la similitud entre la expresión para el flujo de sustrato a través de la capa límite con la expresión general que rige la difusión externa^[Bódalo et al., 1989 y Gemeiner, 1992], y que viene dada por la expresión:

$$r_e = k_m a_m (S_L - S_R)$$

Ecuación 70

Donde se tiene:

- r_e : velocidad de difusión externa (molL⁻¹s⁻¹);
- k_m : coeficiente de difusión externa en la fase líquida;
- a_m : superficie específica del soporte (m²);
- S_R : representa la concentración de sustrato en la superficie del soporte;
- S_L : concentración de sustrato en la masa global del fluido.

El mismo planteamiento es válido para la difusión del producto de reacción desde la superficie del sólido hasta el seno de la disolución.

2.10.2. DIFUSIÓN INTERNA.

Tras la difusión de los reactivos hasta la superficie del catalizador, será necesario un nuevo proceso de difusión a través de los poros de la partícula catalítica para que el sustrato pueda acceder a los centros activos. Del mismo modo los productos formados en el interior del soporte deben difundir, en sentido contrario, hasta la solución^[Smith, 1977].

Cuando el recorrido libre medio de las moléculas en el interior de los poros es notablemente inferior a la dimensión característica del poro (su diámetro) se establecen fenómenos de difusión de Knudsen. Sin embargo, normalmente, los poros de los soportes que suelen emplearse en catálisis enzimática presentan un tamaño del orden de 100 nm de diámetro; de manera que es posible la difusión de una gran variedad de sustratos en su interior, sin que aparezcan fenómenos de difusión de Knudsen.

Las fuerzas impulsoras de la difusión interna son los gradientes de concentración dentro del gránulo en el que está inmovilizada la enzima. Estos gradientes pueden afectar a la velocidad global observada de la reacción. En este sentido puede definirse un modelo conceptual constituido por tres regiones dentro del gránulo de catalizador.

La “región cinética”, donde la reacción bioquímica procede a la misma velocidad que para la enzima en solución. Por tanto, la velocidad de reacción se hace independiente de las propiedades del soporte, como el tamaño, densidad y forma de los poros en las correspondientes partículas, etc.

En segundo lugar la “región de transición”, que se sitúa entre las áreas “cinética y de “difusión interna”.

Y por último, la “región de difusión interna”, región en la que los factores difusionales presentan una influencia muy acusada frente a los aspectos cinéticos, registrándose velocidades de reacción muy bajas. Surge, por tanto, un núcleo no utilizado que no participa en la reacción.

2.10.3. FACTOR DE EFICACIA.

A tenor de lo comentado, surge la necesidad de definir un coeficiente adecuado para evaluar el efecto de la difusión interna sobre la reacción enzimática en enzimas inmovilizadas. Dicho coeficiente recibe el nombre de factor de eficacia:

$$\eta = \frac{\text{velocidad de reacción aparente para la partícula real}}{\text{velocidad de reacción evaluada sin considerar efectos difusionales}}$$

Como consecuencia, η representa la razón entre la velocidad de reacción real en el soporte frente a la velocidad que podría alcanzarse si cada una de las moléculas de enzima inmovilizada fuese accesible por el sustrato sin limitaciones difusionales. En la región cinética η es igual a uno, mientras en la región de difusión interna toma valores próximos a cero.

En el caso concreto de enzimas inmovilizadas en partículas de simetría esférica, la expresión general del factor de eficacia es la que se indica a continuación:

$$\eta = \frac{\langle V_s \rangle}{V_s(C_{SR}, C_P)} = \frac{1}{V_s(C_{SR}, C_{PR})} \frac{3}{R^3} \int_0^R V_r r^2 dr$$

Ecuación 71

Donde se tiene:

$\langle V_s \rangle$: velocidad promedio de consumo de sustrato en la partícula;

V_r : velocidad puntual a una distancia r del centro;

$V_s(C_R, P_R)$: velocidad de reacción si no hubiese resistencias difusionales;

R : radio de las partículas esféricas;

r : es la coordenada radial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ENZIMAS Y MEDIO DE REACCIÓN.

En este primer apartado, se contemplan tanto las características de las enzimas empleadas en la experimentación, así como las características del medio de reacción utilizado en la misma.

3.1.1. ENZIMA GLUCOSA OXIDASA.

La enzima empleada en toda la experimentación ha sido β -D-Glucosa: oxígeno-1-oxido-reductasa, comúnmente conocida como glucosa oxidasa (EC.1.1.3.4). Se ha utilizado enzima procedente de *Aspergillus niger* (182.000 Da), fabricada por la casa comercial SIGMA (tipo G-1262, extracto crudo). Al tratarse de un extracto crudo, la enzima contiene ciertas impurezas en otras enzimas, entre las que se encuentra la catalasa, aunque en proporciones tan bajas que éstas pueden despreciarse a efectos de cálculos.

La enzima presentaba una actividad de 5.730 U.A./g de sólido, y de 9.510 U.A./g de sólido, en condiciones de saturación de oxígeno. Entendiéndose así por unidad de actividad (U.A.), aquella que oxidará 1 mmol de β -D-glucosa a ácido D-glucónico y H_2O_2 por minuto, en condiciones de pH y temperatura de 5,1 y 35°C respectivamente.

3.1.2. ENZIMA CATALASA.

La enzima empleada en toda la experimentación ha sido H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductasa, esto es, catalasa (EC 1.11.1.6.). Se ha utilizado enzima procedente de *Aspergillus niger* (232.000 Da), fabricada por la casa comercial SIGMA (tipo C-3515).

La enzima es comercializada en una suspensión en $(NH_4)_2SO_4$ 3,2M, a pH 6,0, a razón de 11,8 mg de proteína por mL de solución y 6.600 U.A./mg de proteína. Siendo, en este caso, la unidad de actividad enzimática (U.A.) la descomposición de 1 μ mol de H_2O_2 por minuto, en condiciones de pH y temperatura de 7,0 y 25°C respectivamente, mientras la concentración de H_2O_2 cae de 10,3 a 9,2mM.

3.1.3. MEDIO DE REACCIÓN.

El medio de reacción, en todos los experimentos en los que ha intervenido la enzima glucosa oxidasa, ha sido una solución de D-(+)-glucosa anhidra (PM: 180,16 g/mol), de la casa comercial PANREAC, calidad purísima. Se han realizado experimentos de las concentraciones iniciales de glucosa siguientes: 12, 80, 200 y 500 mM.

En todos los casos se han preparado 2 L de medio, tamponándolo posteriormente con el tampón acético-acetato. Para ello se añadía acetato de calcio (1 hidrato) (PM: 176,19), de la

casa comercial PANREAC, calidad p.a., en concentración de 8,8 g/L. La preparación del medio finalizaba con el ajuste del pH a 5,1, para lo cual se utilizaba una disolución de HCl al 50 %.

En los experimentos en los que sólo se ha estudiado la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno, esto es, en los que sólo ha intervenido la enzima catalasa, el medio de reacción ha sido una disolución de peróxido de hidrógeno, preparada a partir de una solución de peróxido de hidrógeno (PM: 34,01) del 30 % p/v, comercializado por la casa PANREAC (código 141076), calidad purísimo. Las concentraciones iniciales de peróxido utilizadas han sido las siguientes: 53, 101, 202,8 y 502,8 mM. En éstos, también se han preparado 2L de medio y se ha tamponado con acetato de calcio.

3.2. INMOVILIZACIÓN: SOPORTE DE ALGINATO CÁLCICO.

En la preparación del soporte para la realización de los experimentos de inmovilización enzimática, se ha utilizado la sal sódica del ácido algínico, de la casa comercial FLUKA, catalogada con el N° 71.238.

3.2.1. TÉCNICA DE INMOVILIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS.

Empleando cloruro cálcico, y mediante la técnica de gelificación ionotrópica, se obtuvo el soporte de inmovilización. El protocolo habitual de preparación es el siguiente^[Romero, 1996]:

- 1.-Se prepara una solución de 2 g de alginato sódico en 90 mL de agua destilada. El alginato sódico es difícil de disolver en frío, así que generalmente se hace adicionando el sólido, sobre el agua caliente en agitación, progresivamente.
- 2.-En otro matraz, se disuelve la enzima en 50 mL de agua destilada.
- 3.-Tras enfriar la solución de alginato hasta temperatura ambiente, se vierte la solución que contiene la enzima sobre ésta; cuidando en todo momento de proporcionar una intensa agitación, con objeto de asegurar una mezcla adecuada.
- 4.-A continuación se deja reposar la disolución, aproximadamente unos 30 minutos, para que las burbujas de aire formadas durante el proceso de agitación intensa abandonen la solución.
- 5.-La solución mezcla (alginato sódico + enzima) se hace gotear sobre 500 mL de solución de cloruro cálcico 0,5M (27,8 g en 500 mL). El goteo de la solución se realiza mediante una bomba peristáltica MASTERFLEX 6411-16, de caudal fijo 0,4 mL/min; regulándose el diámetro de las partículas mediante secciones variables en diámetro, colocadas a la salida de la conducción de goteo.
- 6.-Una vez que ha sido goteada la solución mezcla sobre la solución de cloruro cálcico, es necesario un nuevo tiempo de reposo, aproximadamente unos 60 minutos, para que se produzca el endurecimiento (curtido) de las partículas.
- 7.-Finalmente, es preciso separar las partículas de alginato cálcico y la solución de cloruro cálcico. Dicha separación puede llevarse a cabo fácilmente mediante filtración en buchner.

3.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTÍCULAS.

A la hora de preparar las partículas de alginato, que se iban a emplear en la experimentación, había que regular dos características esenciales. En primer lugar, éstas debían tener una geometría lo más próxima posible a la geometría esférica y por otro lado, debíamos ser capaces de regular sus diámetros, con el fin de que los experimentos fuesen reproducibles.

La forma de las partículas viene definida fundamentalmente por la distancia de caída de la gota, esto es, la distancia existente entre el extremo del tubo del que sale y la superficie de la solución, de cloruro cálcico, en la que cae. Así, si la distancia es muy pequeña, las gotas conservan la forma correspondiente a su salida del tubo (forma de pera). Mientras que si la distancia es excesiva, la forma de las partículas es elipsoidal, debido al impacto con la superficie, pudiendo aparecer además, unas partículas adicionales en el medio mucho más pequeñas (0,5 mm de diámetro), debido a las salpicaduras de dicho impacto. En la preparación de las partículas se empleó una distancia de goteo aproximada de 15 cm; distancia a la que se consiguen esferas muy próximas a la idealidad.

En cuanto a la regulación del diámetro de las partículas, se consigue, fácilmente, acoplado a la salida de la conducción de goteo, secciones de tubo de diferentes diámetros. En la experimentación de inmovilización realizada en la presente memoria, se han utilizado partículas esféricas de 3 y 5 mm de diámetro.

A continuación, se presenta, FIGURA 13, el esquema de un posible dispositivo experimental, empleado para la preparación de partículas con diferentes diámetros.

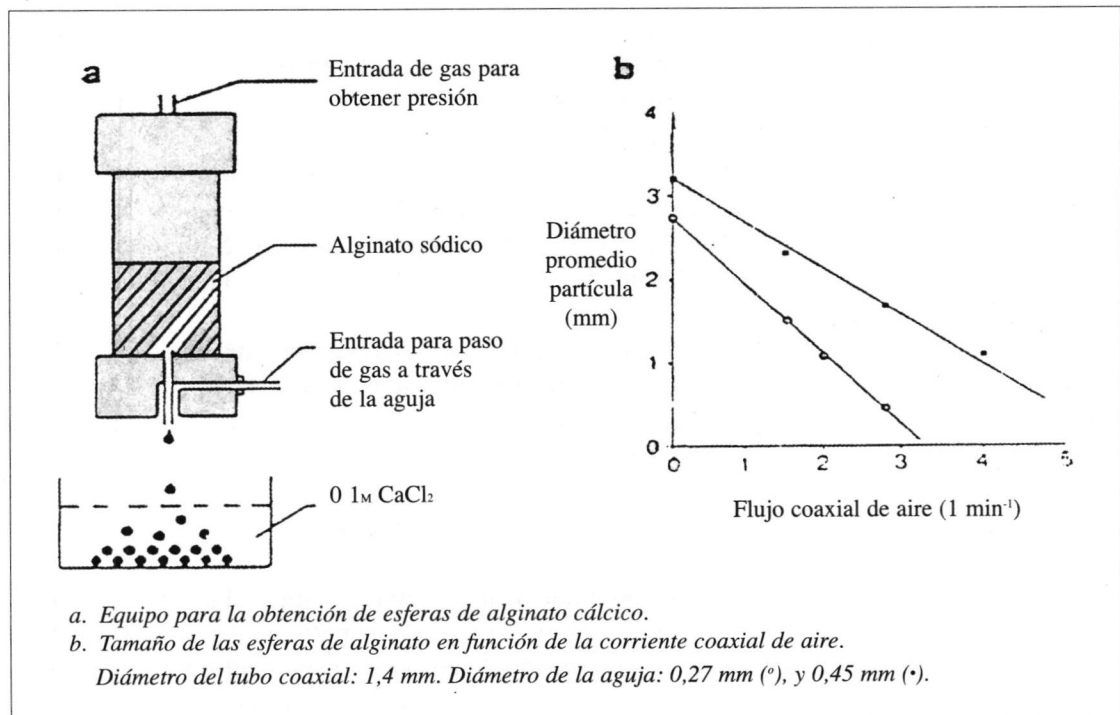


FIGURA 13. Equipo para la obtención y caracterización de partículas de alginato cálcico.

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

En este apartado, se exponen los métodos de análisis empleados para la determinación de sustrato (glucosa) y producto (peróxido de hidrógeno), utilizados durante el desarrollo de toda la experimentación.

3.3.1. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.

El método de análisis utilizado para la determinación de glucosa, fue el método de determinación de azúcares reductores del ácido dinitrosalicílico^[Miller, 1959]. El ácido 3,5-dinitrosalicílico, reacciona con los azúcares reductores presentes en la muestra, produce ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, compuesto coloreado cuya concentración puede evaluarse fácilmente por espectrofotometría.

Para poder aplicar el método es preciso preparar un reactivo cuya composición es la siguiente:

- 16,2% (p/v) tartrato de sodio y potasio.
- 1% (p/v) ácido 3,5-dinitrosalicílico.
- 1% (p/v) hidróxido sódico.
- 0,2% (p/v) fenol.
- 0,05% (p/v) sulfito sódico.

El reactivo contiene tartrato de sodio y potasio para proteger al ácido dinitrosalicílico de la acción del oxígeno, sulfito para estabilizar el color obtenido en presencia de fenol, que aumenta la intensidad del color, e hidróxido sódico para basificar el medio, posibilitando así la acción reductora de la glucosa sobre el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Los ensayos se realizan añadiendo 3 mL de reactivo sobre 1 mL de muestra; posteriormente, la mezcla es calentada suavemente en una manta calefactora, manteniendo una ligera ebullición, durante 15 minutos. Transcurrido el calentamiento, se añaden 15 mL de agua destilada, con objeto de diluir y enfriar. Midiéndose, finalmente, la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm.

El trazado de las rectas de calibrado se realizó con tres patrones de glucosa (5,6616, 11,1490 y 16,6696 mM) preparados en una balanza de precisión con desviación de 0,1 mg. En todos los casos se obtuvieron rectas de calibrado con 0,999 como coeficiente de regresión.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

Para realizar las determinaciones de peróxido de hidrógeno se empleó el método del yoduro^[Boltz y Howell, 1978]. En la reacción entre el ión yoduro y el peróxido de hidrógeno se forma ión triioduro, que puede ser cuantificado por medida directa de absorbancia en el ultravioleta. La adición de molibdato amónico cataliza la reacción de conversión del ión yoduro en ión triioduro.

Para realizar el ensayo es preciso disponer de una disolución 23,2 g/L de KI y otra 5 g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Para el análisis, inicialmente, se adicionan 5 mL de la disolución de yoduro potásico y 0,1 mL de la disolución de molibdato amónico sobre 1 mL de muestra. Después se añaden 5 mL de agua destilada y, tras esperar 5 minutos, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 353 nm.

El trazado de las rectas de calibrado se realizó con tres patrones de peróxido de hidrógeno (1,4701, 2,2052 y 2,3522 mM) preparados en una balanza de precisión con desviación de 0,1 mg. En todos los casos se obtuvieron rectas de calibrado con 0,999 como coeficiente de regresión.

3.4. EQUIPOS.

3.4.1. REACTOR DE TANQUE AGITADO.

El reactor utilizado para la realización de todos los experimentos ha sido un reactor de tanque agitado, con el que se ha trabajado, en todo momento, en régimen discontinuo.

3.4.1.1. Descripción del reactor.

Se trata, de un reactor automático de laboratorio, APPLIKON ADI 1030, con las siguientes especificaciones:

- Consta de un vaso de reacción cilíndrico, de base semiesférica y volumen de trabajo de hasta 5 L. En los experimentos realizados se trabajó sólo con 2 L, para no tener que emplear excesivas cantidades de enzima.
- El equipo dispone de un motor de agitación con regulador automático de velocidad, equipado con árbol central provisto de tres juegos de palas cuadradas en cruz.
- El reactor es termostatizable a través de un cambiador de calor interno, conectado a un baño termostato-criostato HAAKE D8.
- La tapa del reactor presenta entradas para diversos sensores, como son: sensor de temperatura, sensor de pH y sensor amperométrico de oxígeno disuelto.
- El sistema de difusión de aire se realiza mediante difusores de acero inoxidable microporoso, que reducen el tamaño de las burbujas de aire, de manera que se alcanzan velocidades globales de transferencia de materia gas-líquido adecuadas.
- El reactor está dotado de placas deflectoras que cubren toda su longitud, para lograr las condiciones de agitación adecuadas.

3.4.1.2. Transferencia de oxígeno en el reactor.

En toda la experimentación desarrollada se ha trabajado en condiciones de saturación de oxígeno. Esto es, había que trabajar con aireación de 1v.v.m. (volumen de aire/volumen de medio-minuto). Para conseguir y verificar esta aireación, se añadieron al reactor 2 L de agua

destilada, que haría las veces de medio, se conectó la agitación a 500 r.p.m. (velocidad de giro utilizada en toda la experimentación) y se puso en marcha la bomba de aireación. Se dejó el sistema funcionando durante un tiempo para que se estabilizase. Se cerraron todas las salidas y entradas al reactor excepto la entrada de aire y la salida a un flujómetro de burbuja que se dispuso en el sistema. Denuovo, se dejó pasar un tiempo para que se estabilizase tras las posibles alteraciones sufridas en la manipulación del mismo, durante el corte de las salidas y la conexión del flujómetro. Se realizaron medidas por triplicado hasta conseguir el caudal de paso de aire correcto (100 mL en 3 sg), se reguló manualmente, con una pinza Hofmann, sobre la conducción de aire.

La transferencia de oxígeno en el reactor utilizado se había caracterizado anteriormente según el método estático de absorción-desorción para la determinación de $k_L a$ (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno)^[Romero, 1996]. Dicho método se basa en la medida del proceso de absorción de oxígeno en un medio, después de su desgasificación^[Atkinson y Mavituna, 1987].

En primer lugar, se realiza el desplazamiento del oxígeno disuelto con nitrógeno. Tras lo cual, se conectan simultáneamente la aireación y la agitación, siguiéndose el aumento en la concentración de oxígeno disuelto en el medio, mediante un electrodo de oxígeno incorporado al reactor.

En las pruebas realizadas en el reactor discontinuo con aireación de 1v.v.m. (volumen de aire/volumen de medio·minuto), se obtuvieron los valores:

r.p.m.	$K_L a$ (h ⁻¹)
100	50
400	110
700	120

TABLA 9. Determinaciones experimentales de $k_L a$ para distintas velocidades de agitación^[Romero, 1996].

Por tanto, las pruebas que se realizaron demostraban que el reactor discontinuo es adecuado para trabajar con cualquier velocidad de agitación, siempre que se sitúe por encima de las 300 r.p.m.

3.4.2. EQUIPO DE ADQUISICIÓN Y CONTROL DE DATOS.

El seguimiento y control del comportamiento cinético en las reacciones enzimáticas, resulta difícil de realizar dadas las características de este tipo de reacciones. Las enzimas son catalizadores muy específicos que generan elevadas velocidades de reacción. Esto se debe a que en el transcurso de la reacción se modifican ciertas condiciones de operación en el reactor, generalmente pH, oxígeno disuelto, temperatura y fuerza iónica, lo cual exige una respuesta instantánea para restablecer las condiciones de operación adecuadas. Esta situación es la que obliga a la utilización de equipos computerizados de adquisición de datos y control en línea.

Así pues, con objeto de aprovechar al máximo toda la información que aporta la experimentación, se ha diseñado y construido un sistema computerizado de adquisición y control de

datos^[Romero, 1996]. El sistema se diseñó pensando cubrir todas las singularidades propias de las reacciones enzimáticas, de modo que fuese lo suficientemente versátil como para permitir cambios en el tipo de experimentación según la orientación de la investigación.

3.4.2.1. Variables a detectar.

Como ya se ha indicado en los antecedentes bibliográficos, en un proceso enzimático son de vital importancia el seguimiento y control del pH del medio, la temperatura del mismo en todo momento y por supuesto, en nuestro caso concreto, el poder asegurar durante toda la reacción condiciones de saturación de oxígeno.

Es preciso registrar el pH del medio, puesto que uno de los productos de reacción es un ácido débil: ácido glucónico; aunque, en la experimentación desarrollada en la presente memoria, se ha trabajado con cantidades de sustrato y enzima bastante pequeños como para poderse generar concentraciones de ácido difíciles de controlar, además, hay que recordar que en toda la experimentación se ha tamponado con el tampón acético-acetato.

La temperatura, es otro de los principales factores a controlar puesto que, afecta de manera directa a la cinética del proceso.

Por otra parte, el seguimiento de la concentración de oxígeno en el medio es fundamental, ya que ha de trabajarse en condiciones de saturación durante todo el proceso, lo cual hace imprescindible el control de esta variable.

Y por último, como magnitud auxiliar se va a poder medir también, la conductividad, fundamentalmente para caracterizar el reactor en futuros trabajos de operación en continuo.

3.4.2.2. Dispositivo de toma de muestras.

Se ha utilizado un dispositivo de toma de muestras regulado por el equipo automático de adquisición y control. De esta forma es posible regular tanto el volumen de muestra necesario para realizar los análisis correspondientes, como el intervalo de tiempo en el que las muestras han de tomarse; al objeto de poder hacer un buen seguimiento de la cinética de la reacción.

3.4.2.3. Constitución y disposición del equipo de adquisición y control de datos.

El equipo utilizado para realizar la experimentación desarrollada en el presente trabajo, era un equipo que había sido diseñado, anteriormente a este trabajo, para que fuese lo más versátil posible, de modo que pudiese aplicarse a diversas enzimas, varios tipos de reactores e incluso, para poder ser aplicado a diferentes escalas de operación.

Se trata de un equipo^[Romero, 1996] formado por módulos e instrumentación común en cualquier laboratorio de investigación: pHmetros, conductímetros, oxímetros, termómetros, tomamuestras, bombas, así como un ordenador PC convencional, dispuesto en la forma que se presenta en la FIGURA 14.

A continuación se describen los diferentes módulos que constituyen el equipo experimental utilizado para la realización de los experimentos.

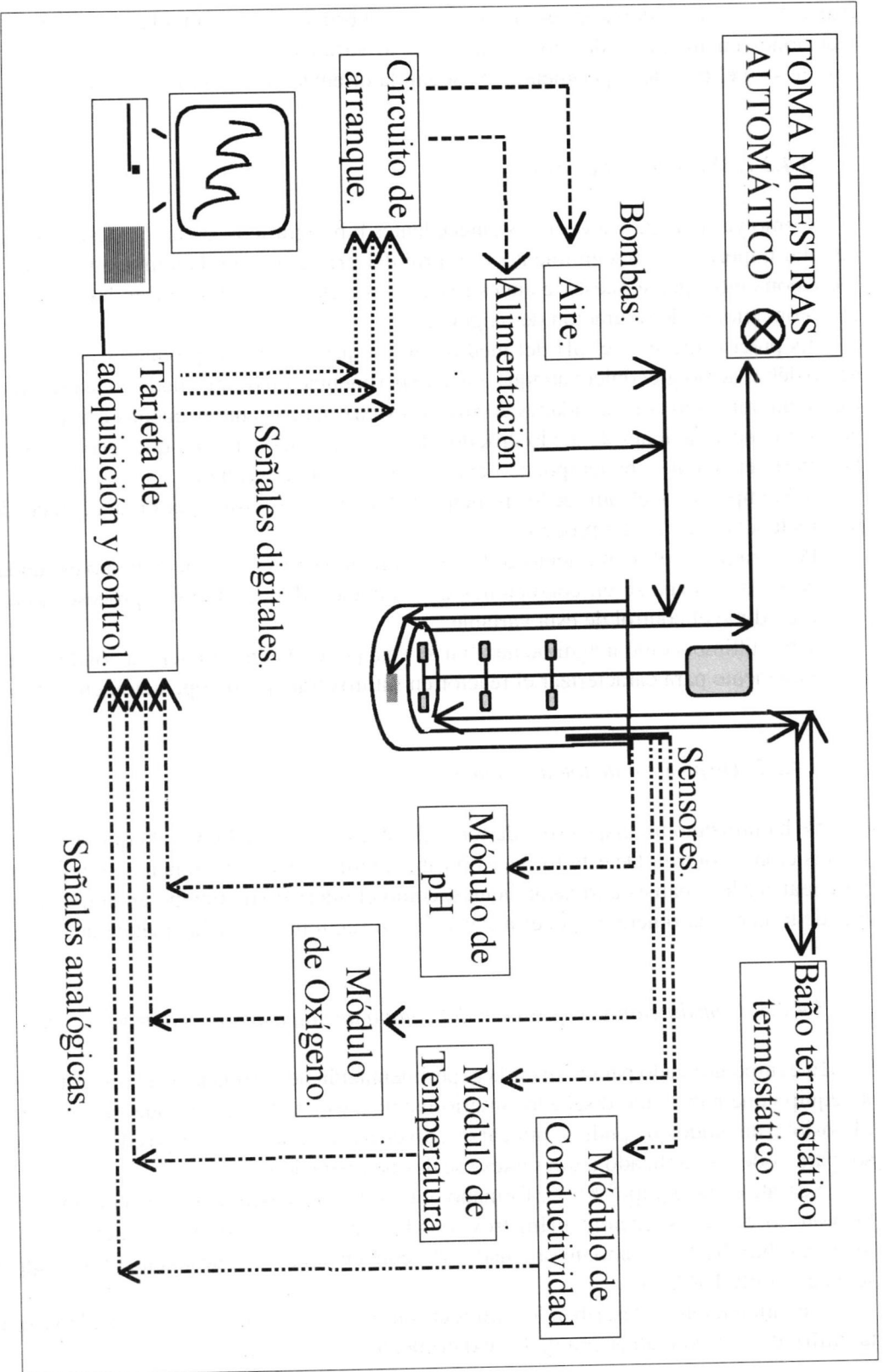


FIGURA 14. Esquema del equipo de adquisición y de control de datos (Romero et al., 1997).

3.4.2.3.1. Módulo de pH.

Se trata de un módulo de pH de la casa comercial VIRTIS, modelo 6715-1180. Es un instrumento de alta impedancia diseñado para medir pH o potenciales redox registrados por los electrodos adecuados. El equipo viene provisto de una salida estándar de señal para registrador, de -500mV a +500mV, que es de donde se toma la señal eléctrica para el sistema de adquisición.

3.4.2.3.2. Módulo de temperatura.

La medida de la temperatura de operación se llevó a cabo mediante el instrumento de la casa comercial VIRTIS modelo 233361-115/60, provisto de un indicador LED de cuatro dígitos. La sonda de temperatura es del tipo RTD, adecuada para medir temperaturas en un rango entre 0 y 60°C con una precisión de $\pm 0,2^\circ\text{C}$. Dicho dispositivo cuenta con una salida externa para registrador, de manera que es proporcional a la temperatura, a razón de 10 mV/°C.

3.4.2.3.3. Módulo de oxígeno disuelto.

La medida de la concentración de oxígeno disuelto, se realizó mediante un módulo de la casa comercial CRISON modelo OXI-92, éste permite medir concentración de oxígeno disuelto y temperatura. La escala de medición de oxígeno disuelto se sitúa entre 0 y 199% relativo a la saturación (máximo 50.000 ppm), el rango de medida para la temperatura oscila entre -5 y 45°C. La precisión en la medición de oxígeno es del 1% o 0,1 mg/L, para la temperatura es de 0,2K. La corrección de presión atmosférica se realiza de forma manual, de 800 a 1050 mbar, ajustables mediante display de cuarzo líquido (LCD). El módulo ha sido alimentado mediante una pila de 9V. La salida para registrador es proporcional a la concentración de oxígeno disuelto, a razón de 30 mV por ppm de oxígeno.

El electrodo de oxígeno con el que viene equipado el módulo es el EO90 (electrodo de Clark de membrana amperométrica), con un tiempo de respuesta de 10 segundos a 20°C para alcanzar un 90% de lectura estable y de 40 segundos para alcanzar el 99% de lectura estable. Su presión máxima de trabajo es de 10 bar y el rango de temperatura en el que se puede utilizar va de 0 a 50°C.

3.4.2.3.4. Módulo de conductividad.

Para dicho estudio se empleó un medidor de conductividad PHILIPS modelo PW 9505, con escala analógica, adecuado para realizar medidas en un rango muy amplio (entre 3 y 300 μScm^{-1}), con precisión variable dependiendo de la escala elegida. La salida para registrador oscila entre -100 mV y +100 mV, dependiendo de la conductividad de la muestra.

3.4.2.3.5. Bombas.

La adición del medio de reacción (líquido) se realizó utilizando una bomba de tipo peristáltico de la casa comercial COLE-PARMER, modelo MASTERFLEX 7544-20. Ésta trabaja

a una velocidad de giro fija (20 r.p.m.), y la regulación del caudal en este tipo de bombas se consigue mediante cabezales intercambiables que operan con diámetros de conducción diferentes. En el caso de la experimentación desarrollada, se ha empleado el cabezal 7016-20, que permite el uso de tubos con un diámetro interno de 3 mm, cuyo caudal de flujo es de 3 ml/min.

La aireación en reactor se consiguió mediante una bomba de aireación de membrana, de la casa comercial TAGUS, modelo 3000. Esta bomba consta de dos salidas independientes para aireación y sólo puede operar con caudales de aire inferiores a 4 L/min, pero suficiente para conseguir la saturación de oxígeno en el reactor. La regulación del caudal de aire se realiza de forma manual externa.

3.4.2.3.6. Tomamuestras.

El equipo empleado para la toma de muestras es un colector de fracciones de la casa comercial WATERS, modelo P/N 37040. Posee una gradilla de 120 posiciones para la recogida de muestras; un brazo de desplazamiento en el plano horizontal para poder situarse en el correspondiente tubo; y una salida para drenaje con una válvula de tres vías, modelo 37049, con todas las conducciones de teflón. El colector posee un sistema de conexión remota, a través de diez conectores (0-5 V), que hacen posible la activación/desactivación de la toma de muestras.

3.4.2.3.7. Placa de adquisición y ordenador.

Anteriormente, se han descrito los módulos utilizados para cada función concreta dentro del equipo experimental: módulo de pH, de oxígeno disuelto, de conductividad, bombas y tomamuestras. Para que todos ellos, en conjunto, puedan configurar un equipo de adquisición de datos y control es preciso que existan otros dispositivos capaces de integrarlos. Este es el lugar que corresponde a la placa de adquisición y control de datos y al ordenador personal.

La placa de adquisición de datos y control tiene como misión principal recoger las señales eléctricas analógicas procedentes de todos los dispositivos del equipo experimental y transformarlas en señales digitales posibles de enviar directamente al ordenador. Asimismo, dicha placa está capacitada para recibir acciones de control, por parte del ordenador (señal digital), convertir la señal digital en señal analógica y, enviarla al dispositivo que se pretenda controlar.

Concretamente, en el equipo utilizado en la experimentación, la placa de adquisición y control instalada fue la placa compatible con los modelos más habituales de ordenador personal; placa modelo Lab-PC+, de National Instruments. Dicha placa, de coste moderado, presenta entradas analógicas, entradas y salidas digitales, y temporizadores para ordenadores IBM PC/XT/AT y compatibles.

La placa Lab-PC+ es adecuada para el trabajo de laboratorio y presenta varias entradas analógicas ideales para análisis de señal, adquisición de datos, medida de temperatura y medida de voltajes en corriente continua (salidas de módulos de pH, oxígeno disuelto, etc.). Los canales de salida analógica pueden generar estímulos, señales para control de procesos y funciones analógicas.

Por otro lado, las 24 entradas-salidas digitales, que posee, pueden ser utilizadas para activar dispositivos externos tales como transistores y relés de estado sólido, para leer el estado de

señales digitales externas y para generar interrupciones. La placa permite utilizar tres contadores/temporizadores para sincronizar eventos, generar pulsos y medir frecuencias y tiempos.

El ordenador personal utilizado dispone de un microprocesador 386SX a 25 MHz, trabaja con una memoria RAM de 2 Mb y un disco duro de 40 Mb. Por tanto, como es posible observar, los requerimientos en cuanto a capacidad del ordenador no son excesivos, pudiendo utilizarse máquinas con prestaciones muy limitadas.

3.4.3. PROGRAMA DE ADQUISICIÓN Y CONTROL.

Una vez diseñado y desarrollado el equipo de adquisición de datos y control, resulta imprescindible disponer de un programa adecuado para coordinar la toma de datos experimentales a partir de los módulos de pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura; así como las acciones de control sobre el tomamuestras y las bombas.

El programa utilizado en el presente trabajo^[Romero, 1996] está realizado en lenguaje de programación "C", con la herramienta LabWindows versión 2.2.1., de la empresa National Instruments, y fue compilado con microsoft C versión 6.0. Programa, de control para reactores enzimáticos, registrado en el Registro General de la Propiedad Intelectual con el N° 1522 (1995).

3.5. PLANIFICACIÓN Y METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN.

Toda la experimentación desarrollada en el presente trabajo se llevó a cabo en régimen de operación discontinuo. Se trabajó en dos grupos de experimentos bien diferenciados. Por una parte, se realizaron estudios en solución, empleando glucosa oxidasa, catalasa o ambas enzimas en el medio de reacción.

Por otra parte, se realizaron una serie de experimentos utilizando soporte, con glucosa oxidasa y catalasa co-inmovilizadas en alginato, con objeto de estudiar los fenómenos de desactivación conjunta de ambas enzimas.

En la FIGURA 15 se expone claramente la planificación de los experimentos llevados a cabo en la presente memoria.

Todos los experimentos se han realizado en el reactor Applikon descrito anteriormente, con las siguientes condiciones de operación:

- Volumen de trabajo de 2L
- Termostatizado a 35°C.
- Velocidad de agitación de 500 r.p.m.
- Aireación de 1 vvm, trabajándose durante todo el proceso en condiciones de saturación de oxígeno.

El medio de reacción en todos los casos se ha tamponado a pH 5,1 con un buffer acetato.

Por otra parte, la toma de muestras se realizó sobre tubos de toma de muestras que contenían 200 μ L de una disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 15% p/v, con la finalidad de paralizar la reacción y poder conservar la muestra hasta la realización de las determinaciones analíticas pertinentes.

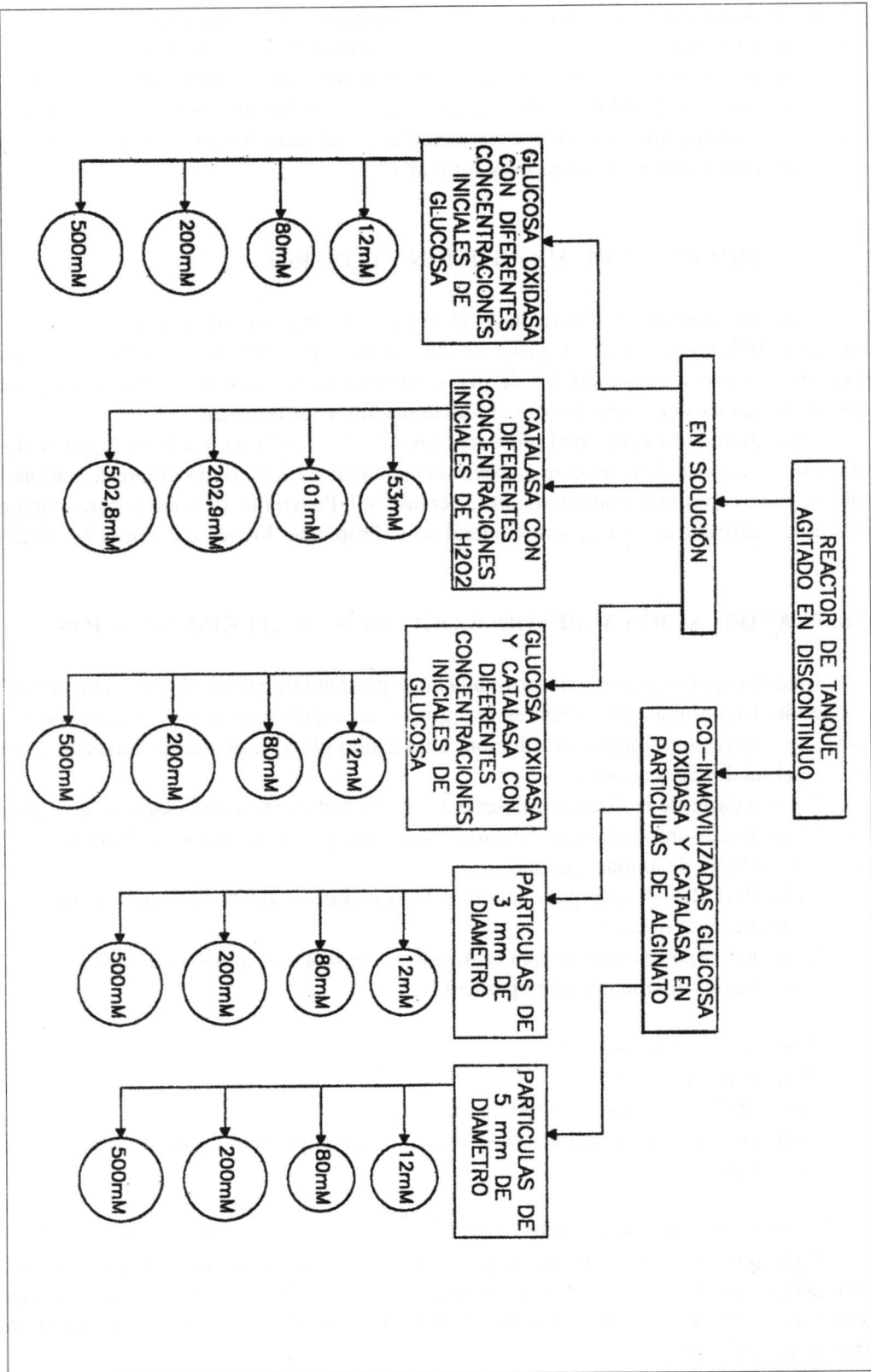


FIGURA 15. Planificación de la experimentación.

3.5.1. EXPERIMENTOS CON GLUCOSA OXIDASA EN SOLUCIÓN.

La experimentación desarrollada con glucosa oxidasa en solución, presentaba como principal objetivo, caracterizar la cinética de desactivación en solución de dicha enzima.

3.5.1.1. Plan de trabajo.

Puesto que el principal objeto del estudio en discontinuo con la enzima libre pretende caracterizar la cinética de desactivación de la enzima en solución, el aspecto que ofrece un mayor interés de estudio es la influencia de las variaciones en la concentración de sustrato.

3.5.1.1.1. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato.

Durante toda la experimentación desarrollada con glucosa oxidasa en solución, se trabajó con 0,5 g de enzima glucosa oxidasa (4755 U.A.).

El plan de trabajo desarrollado consistió en cuatro experimentos, realizados por duplicado, que pretendían cubrir todo el rango de concentraciones de sustrato que se emplearía en posteriores experimentos. En concreto, se realizaron experimentos para las siguientes concentraciones iniciales de glucosa: 12, 80, 200 y 500mM. En todos los casos se mantuvo en idénticos valores el resto de las condiciones de experimentación.

Como se puede observar en la FIGURA 15, se ha intentado cubrir un amplio rango de concentraciones iniciales de sustrato, con objeto de conocer el comportamiento de la enzima frente a un rango aceptable de concentraciones.

3.5.2. EXPERIMENTOS CON CATALASA EN SOLUCIÓN.

La experimentación desarrollada empleando catalasa en solución, presentaba como principal objetivo, caracterizar la cinética de desactivación en solución de dicha enzima.

3.5.2.1. Plan de trabajo.

Puesto que el principal objeto del estudio en discontinuo con la enzima libre pretende caracterizar la cinética de desactivación de la enzima en solución, el aspecto que ofrece un mayor interés de estudio es la influencia de las variaciones de la concentración de sustrato, que en éste caso será peróxido de hidrógeno.

3.5.2.1.1. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato.

Durante toda la experimentación desarrollada con catalasa en solución, se trabajó con 45 μ L de enzima catalasa (3505 U.A.). La aireación del reactor también fue suministrada en esta serie de expe-

rimentos, puesto que aunque no se precisa para la reacción enzimática en este caso, se suministró con objeto de mantener las mismas condiciones hidrodinámicas que en el resto de los experimentos.

El plan de trabajo desarrollado consistió en cuatro experimentos, realizados por duplicado, que pretendían cubrir todo el rango de concentraciones de sustrato que se emplearía en posteriores experimentos. En concreto, se realizaron cuatro experimentos para las siguientes concentraciones iniciales de peróxido: 53, 101, 202,8 y 502,8 mM, manteniendo en todos los casos en idénticos valores el resto de las condiciones de experimentación.

3.5.3. EXPERIMENTOS CON GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA EN SOLUCIÓN.

La experimentación con ambas enzimas en solución tiene como finalidad caracterizar la cinética de desactivación conjunta de ambas enzimas.

3.5.3.1. Plan de trabajo.

Puesto que el principal objeto del estudio en discontinuo con las enzimas libres pretende caracterizar la cinética de desactivación en solución, el aspecto que ofrece un mayor interés es el planteamiento de diversos experimentos con distintas concentraciones iniciales de sustrato.

3.5.3.1.1. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato.

Durante la experimentación se ha trabajado con 0,5 g de enzima glucosa oxidasa (4755 U.A.) y con 45 μ L de enzima catalasa (3505 U.A.).

El plan de trabajo desarrollado consistió en cuatro experimentos, realizados por duplicado. Se realizaron experimentos para las siguientes concentraciones iniciales de glucosa: 12, 80, 200 y 500mM. En todos los casos se mantuvo en idénticos valores el resto de las condiciones de experimentación.

3.5.4. EXPERIMENTOS CON GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA CO-INMOVILIZADAS SOBRE PARTÍCULAS DE ALGINATO.

El siguiente paso, en lo que a experimentación se refiere, consiste en estudiar cómo influye la inmovilización de la enzima en la cinética del proceso. Cinética que cambiará en alguna medida, puesto que, con el catalizador atrapado en el sólido, comienzan a aparecer toda la serie de fenómenos difusionales que han sido descritos en el capítulo de antecedentes bibliográficos.

Por tanto, el objetivo de este apartado puede resumirse en el estudio de la influencia del soporte sobre la desactivación de glucosa oxidasa y catalasa.

3.5.4.1. Plan de trabajo.

Puesto que el plan de trabajo a desarrollar persigue el objetivo fundamental del estudio de la influencia del soporte sobre la desactivación de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, la

experimentación a realizar debe corresponder básicamente al estudio del tamaño de partícula y, para cada tamaño de partícula, se realizarán experimentos para distintas concentraciones de sustrato.

3.5.4.1.1. Estudio de la influencia del tamaño de partícula.

El estudio del tamaño de partícula se llevó a cabo realizando diversos experimentos con partículas de geles de alginato que contenían glucosa oxidasa y catalasa inmovilizadas. En concreto se fabricaron partículas de 3 y 5 mm de diámetro, con las que se trabajó por duplicado con concentraciones iniciales de sustrato de 12, 80, 200 y 500 mM; de modo que pudo disponerse, para cada una de las concentraciones de sustrato, de datos para dos tamaños diferentes.

3.5.4.1.2. Estudios para distintas concentraciones iniciales de sustrato.

Los estudios realizados para distintas concentraciones de sustrato se desarrollaron empleando las mismas concentraciones iniciales 12, 80, 200 y 500 mM para dos tamaños diferentes de partículas, 3 y 5 mm de diámetro.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON GLUCOSA OXIDASA EN SOLUCIÓN.

Se han realizado cuatro experimentos, por duplicado, con las siguientes concentraciones iniciales de glucosa: 12, 80, 200 y 500 mM. Todos ellos llevados a cabo en el reactor Applikon y con las condiciones de operación descritas en los apartados correspondientes de materiales y métodos.

4.1.1. ESTUDIO DE ACTIVIDAD RELATIVA PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES INICIALES DE SUSTRATO.

Se recogen a continuación, de modo gráfico, los resultados obtenidos en los experimentos realizados con glucosa oxidasa en solución. En las FIGURAS 16 a 19 se representa la concentración de sustrato (mM), glucosa, frente a tiempo (h), para las distintas concentraciones iniciales mencionadas anteriormente.

Para una concentración inicial de glucosa 12 mM se puede observar como se va consumiendo el sustrato, a la vez que se va generando producto (peróxido de hidrógeno). La aparición de éste último, llega a provocar la desactivación total de la enzima, quedando un residuo de glucosa (aproximadamente 1 mM) sin convertir en producto de reacción.

Como puede observarse en la gráfica obtenida para una concentración inicial de glucosa 80 mM, el consumo de sustrato presenta al igual que en el caso anterior, una pendiente constante al principio, que luego disminuye de forma progresiva hasta anularse completamente la velocidad de reacción. Este hecho, se produce como consecuencia de la inhibición de la actividad enzimática provocada por el peróxido de hidrógeno, que va acumulándose en el medio.

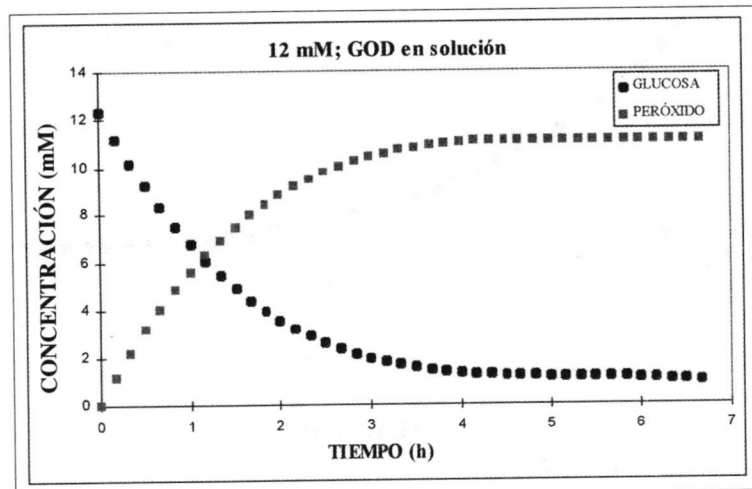


FIGURA 16. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

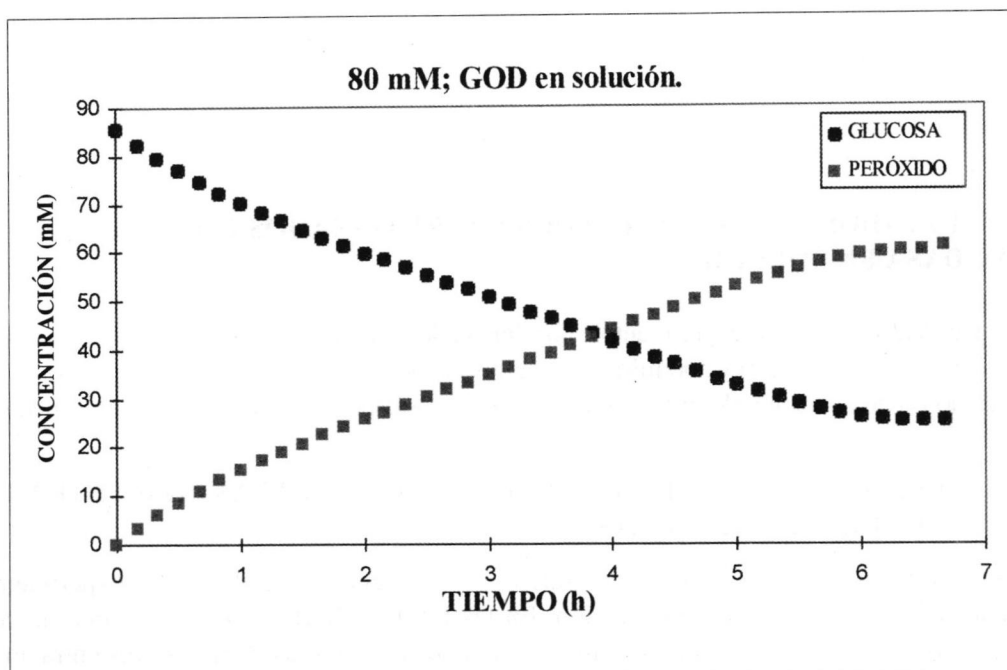


FIGURA 17. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

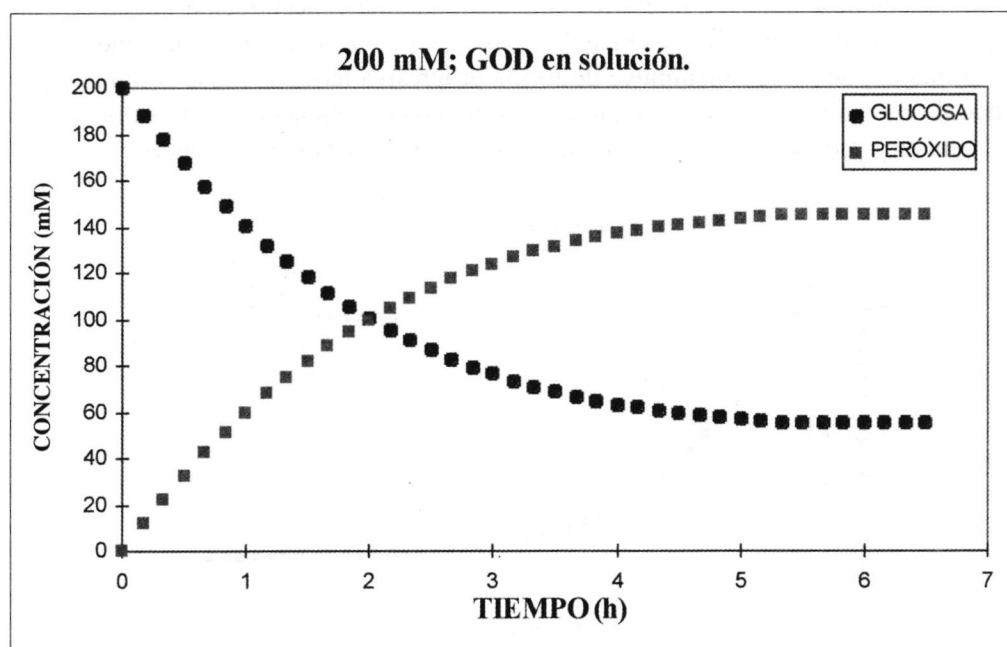


FIGURA 18. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

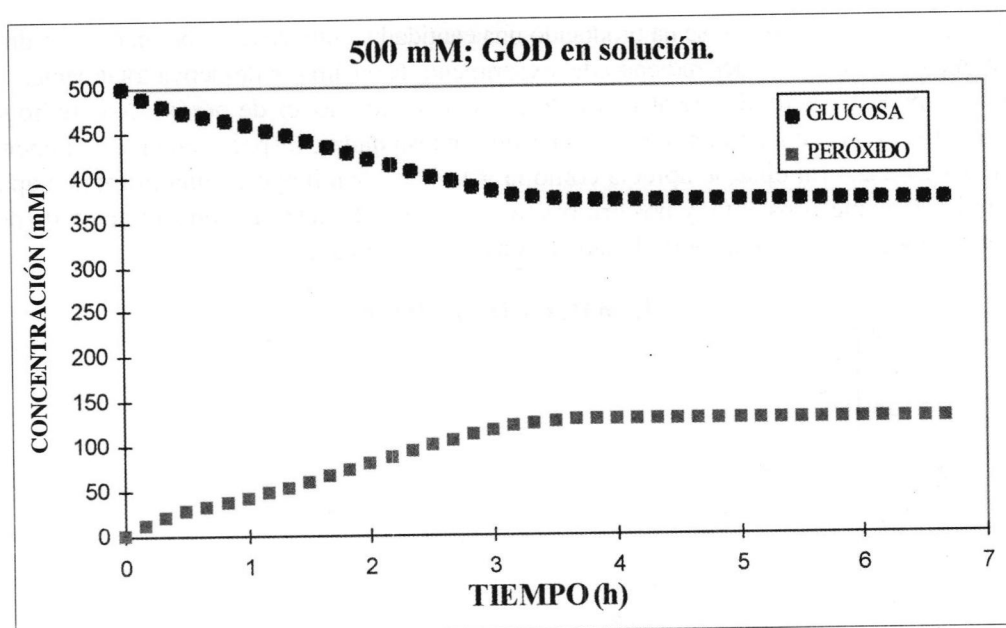


FIGURA 19. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

Para concentraciones iniciales de glucosa mayores; 200 y 500 mM, al igual que en los casos anteriores se observan las mismas tendencias tanto para el consumo de sustrato, como para la aparición de producto. En un estadio inicial hay un consumo rápido de sustrato y se llega, a partir de cierta concentración de peróxido en el medio, a la desactivación total de la enzima.

Podemos concluir, del análisis conjunto de este grupo de gráficas, que la velocidad de consumo de sustrato permanece constante hasta transcurrir aproximadamente 1 hora; tiempo en el que comienza un descenso progresivo de la velocidad. Dicho descenso se debe a la pérdida progresiva de actividad por parte de la enzima hasta que la desactivación de la misma llega a ser total.

4.1.2. ESTUDIO DE ACTIVIDAD RELATIVA DURANTE EL DESARROLLO DE LA REACCIÓN.

Se ha utilizado el método de diferenciación numérica para evaluar, en cada uno de los experimentos realizados la velocidad bruta (mM/s) experimental y la velocidad específica (1/s) en cada caso. A partir de los valores de velocidad la actividad enzimática relativa se ha calculado como:

$$\text{Actividad relativa} = \frac{\text{Velocidad específica en tiempo } t}{\text{Velocidad específica en tiempo } t_0}$$

Se presentan a continuación las gráficas, obtenidas en la experimentación, de actividad relativa frente a tiempo (h), FIGURAS 20 a 23. En dichas figuras se observa claramente, cómo disminuye la actividad de la enzima conforme va transcurriendo el tiempo de reacción. De esta forma se verifica, que la pendiente de la curva se va haciendo cada vez más pequeña hasta llegar a anularse, resultado que está en concordancia con las conclusiones obtenidas en el estudio de la concentración

inicial de sustrato. Una vez que se ha producido una cantidad significativa de peróxido de hidrógeno en el medio de reacción, dependiendo del experimento la enzima se desactiva totalmente.

Si se representa actividad relativa frente a las concentraciones de peróxido de hidrógeno para cada una de las concentraciones iniciales de glucosa dadas, respectivamente se tienen las FIGURAS 24 a 27. En ellas se aprecia cómo la actividad disminuye en una primera etapa de modo prácticamente constante, y posteriormente conforme aumenta la concentración de peróxido hidrógeno, presenta una fuerte bajada hasta quedar anulada.

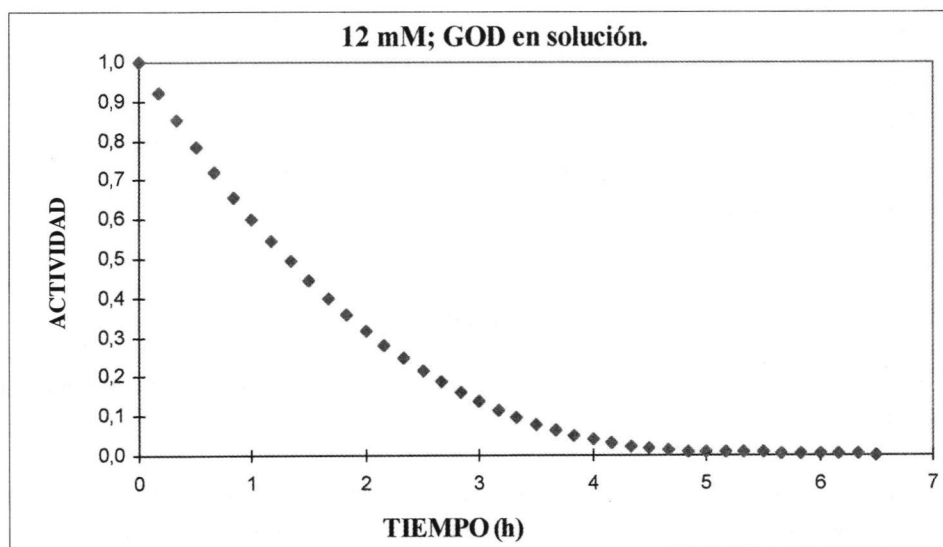


FIGURA 20. Resultados experimentales de actividad relativa frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

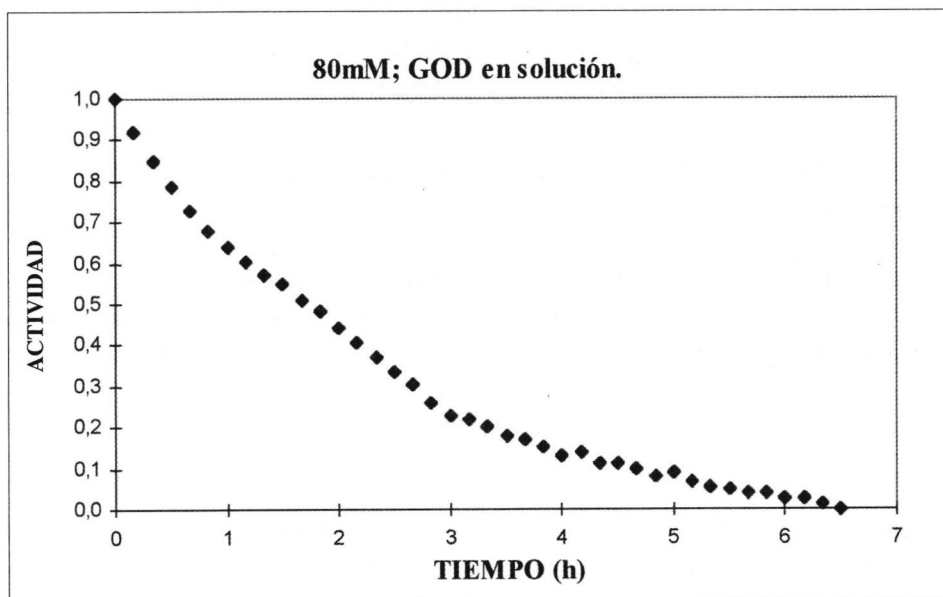


FIGURA 21. Resultados experimentales de actividad relativa frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

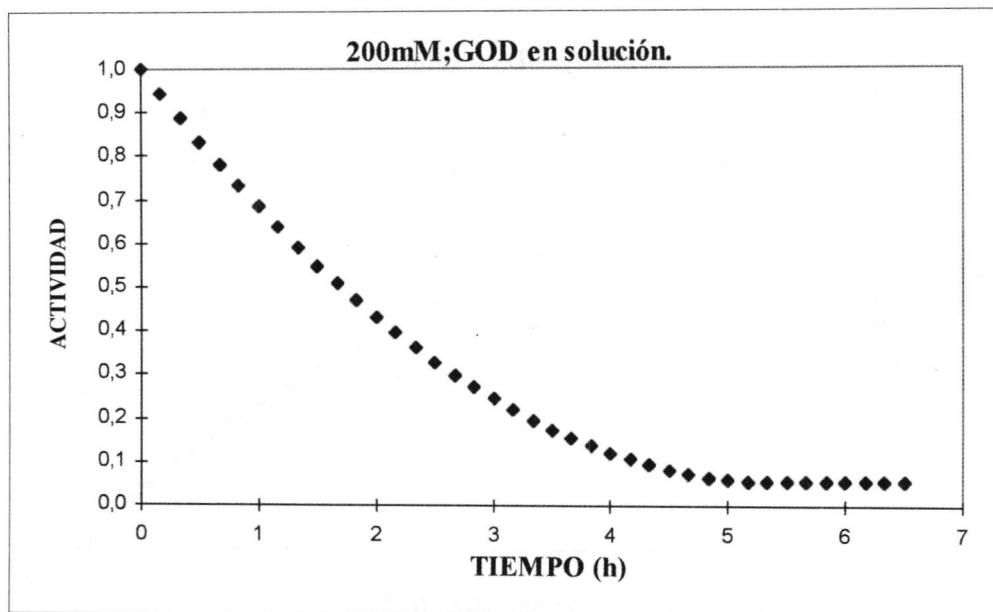


FIGURA 22. Resultados experimentales de actividad relativa frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

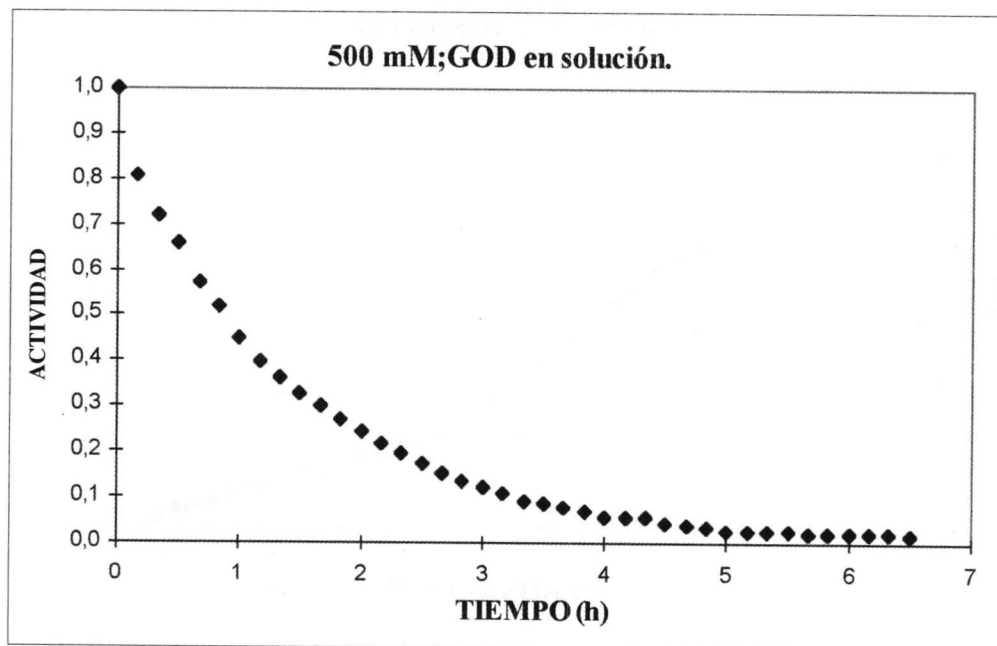


FIGURA 23. Resultados experimentales de actividad relativa frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

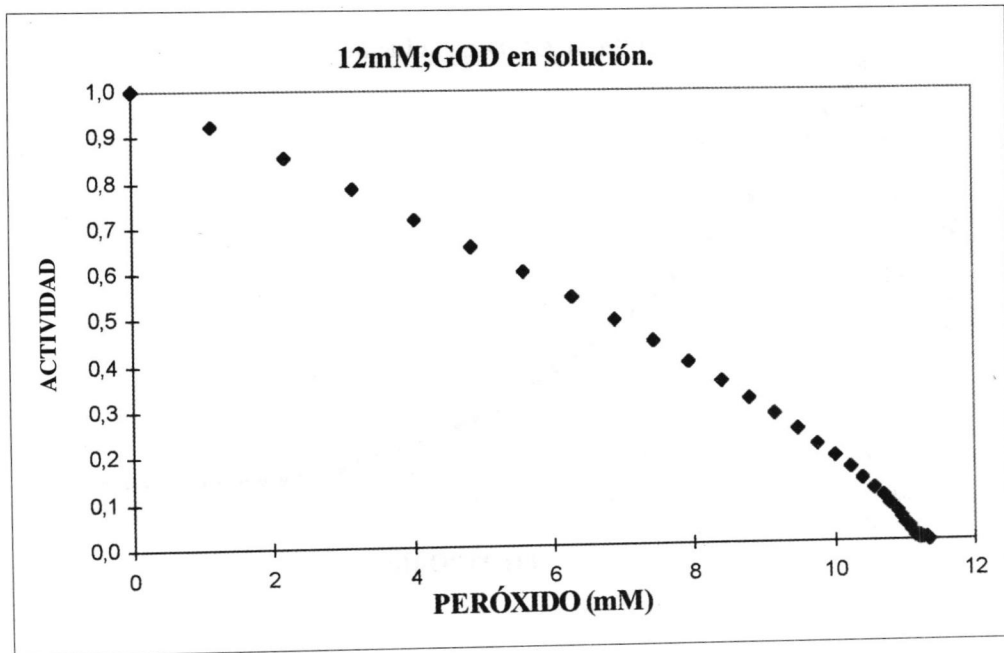


FIGURA 24. Resultados experimentales de actividad relativa frente a concentración de peróxido de hidrógeno para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

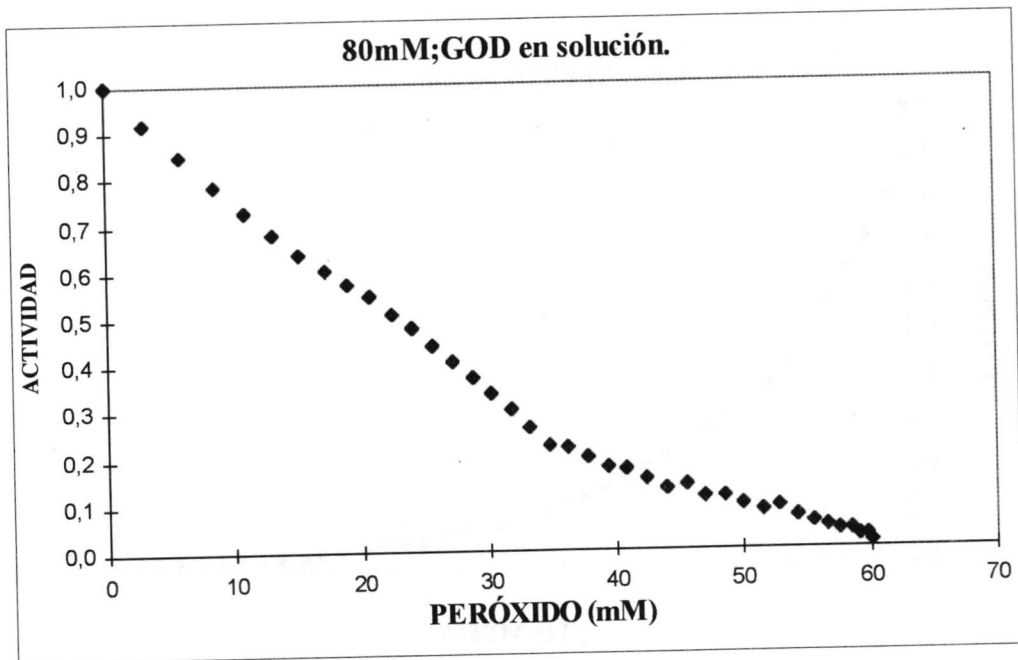


FIGURA 25. Resultados experimentales de actividad relativa frente a concentración de peróxido de hidrógeno para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

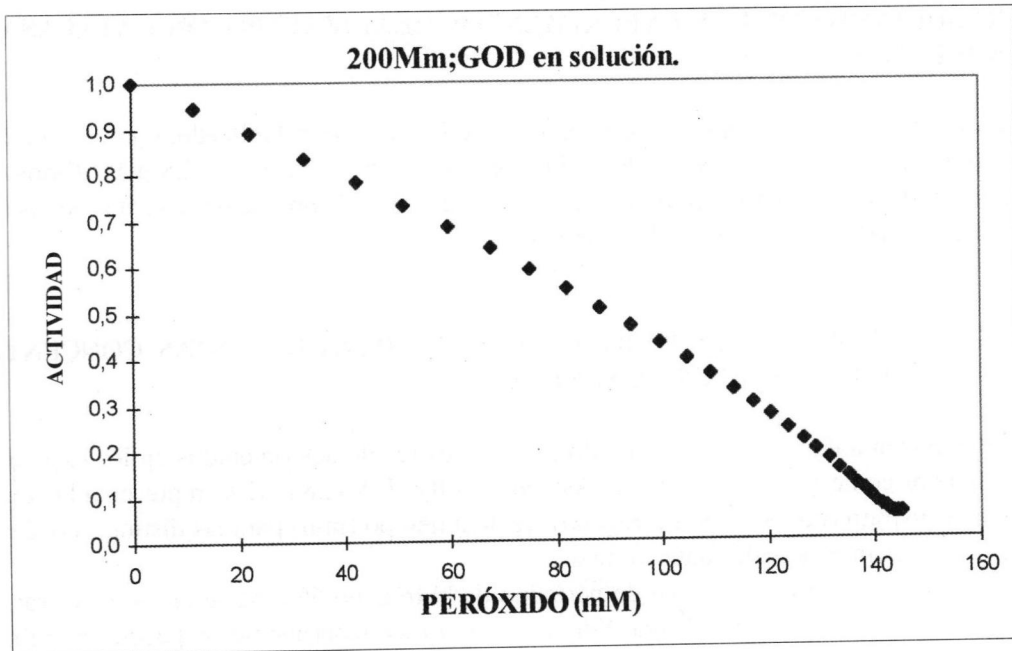


FIGURA 26. Resultados experimentales de actividad relativa frente a concentración de peróxido de hidrógeno para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

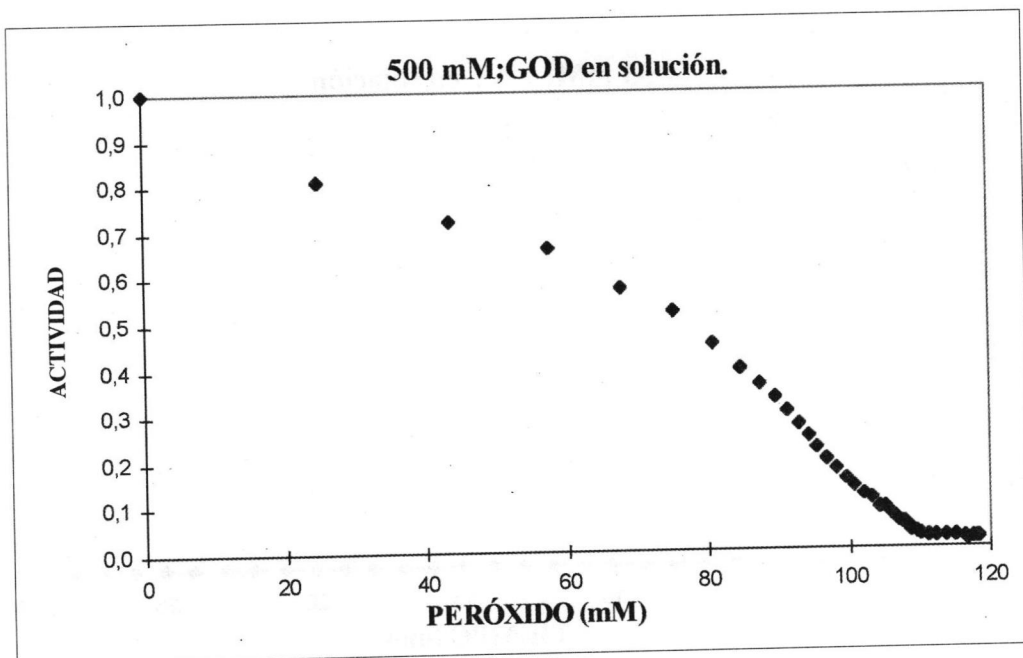


FIGURA 27. Resultados experimentales de actividad relativa frente a concentración de peróxido de hidrógeno para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

4.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON CATALASA EN SOLUCIÓN.

Para este estudio se han realizado cuatro experimentos, por duplicado, con las siguientes concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno: 53, 101, 202,8 y 502,8 mM. Todos ellos llevados a cabo en el reactor Applikon y con las condiciones de operación descritas en los apartados correspondientes de materiales y métodos.

4.2.1. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD RELATIVA PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES INICIALES DE SUSTRATO.

Se exponen a continuación de modo gráfico, los resultados obtenidos en los experimentos realizados con catalasa en solución. Así, en las FIGURAS 28 a 31 se representa la concentración de sustrato (peróxido de hidrógeno) frente a tiempo (min) para las distintas concentraciones iniciales mencionadas anteriormente.

Para una concentración inicial de peróxido de hidrógeno 53 mM se puede observar, que en un minuto se ha completado la reacción. De este primer experimento, se puede concluir, que en la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima catalasa tiene lugar a velocidades de reacción muy superiores a las de oxidación de glucosa por GOD.

Como puede observarse en la gráfica obtenida para una concentración inicial de peróxido de hidrógeno 101 mM, la pendiente disminuye conforme transcurre el tiempo, alcanzándose a los 15 minutos el consumo de todo el sustrato.

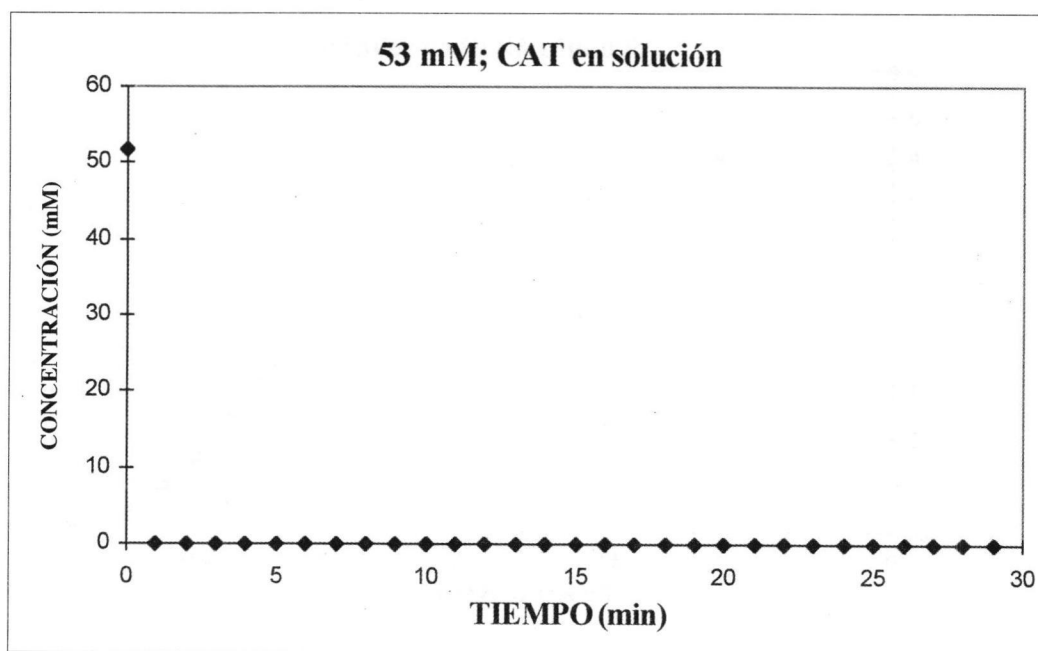


FIGURA 28. Resultados experimentales de concentración peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de peróxido de 53 mM.

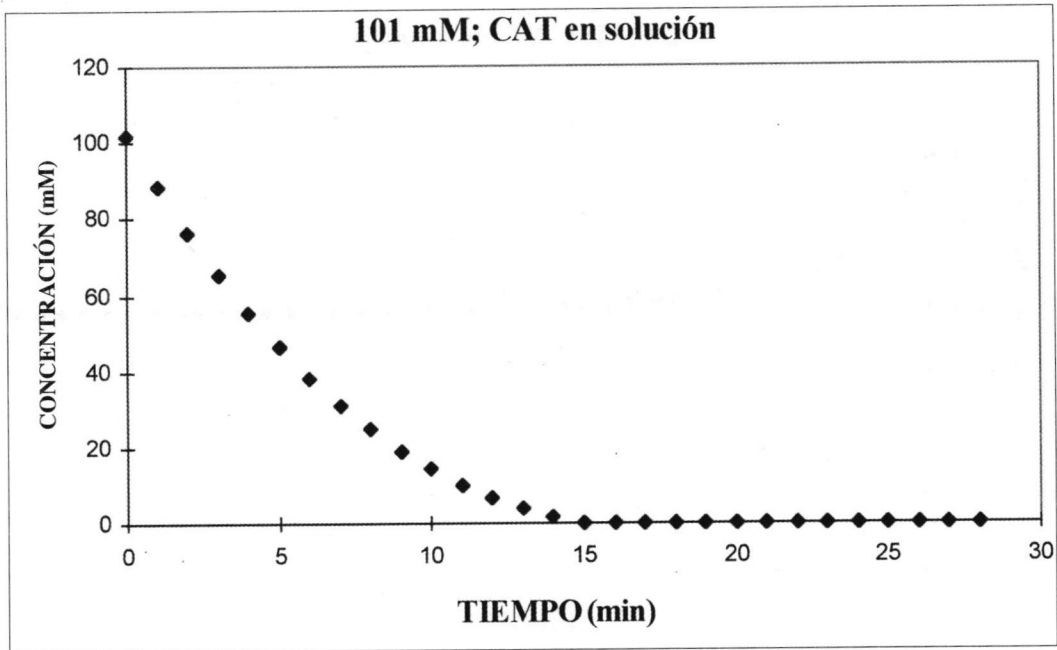


FIGURA 29. Resultados experimentales de concentración peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de peróxido 101 mM.

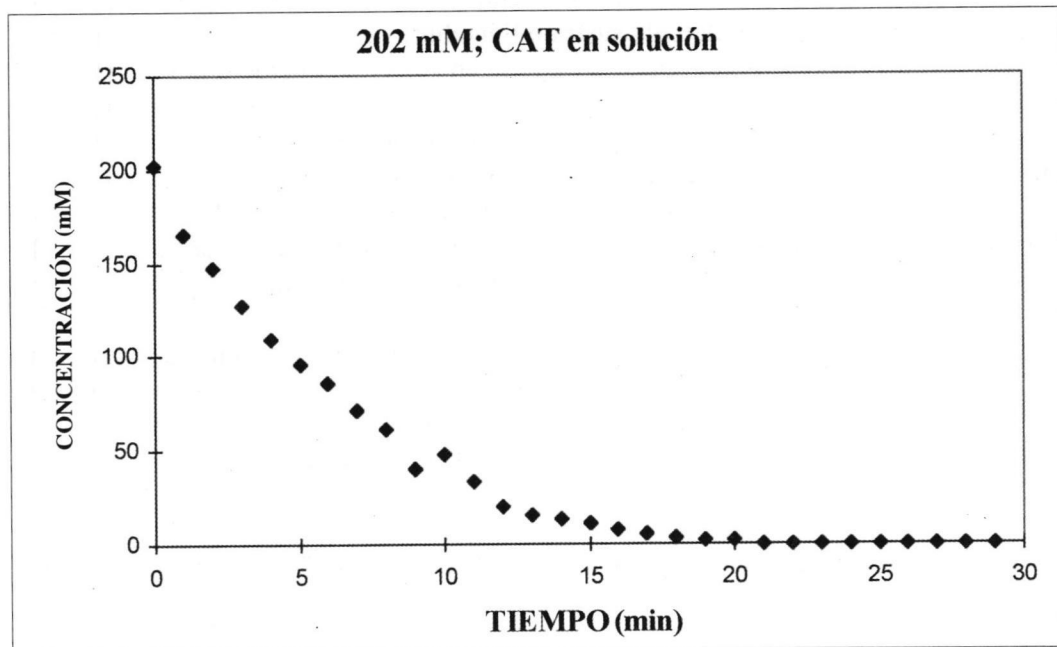


FIGURA 30. Resultados experimentales de concentración de peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de peróxido 202,8 mM.

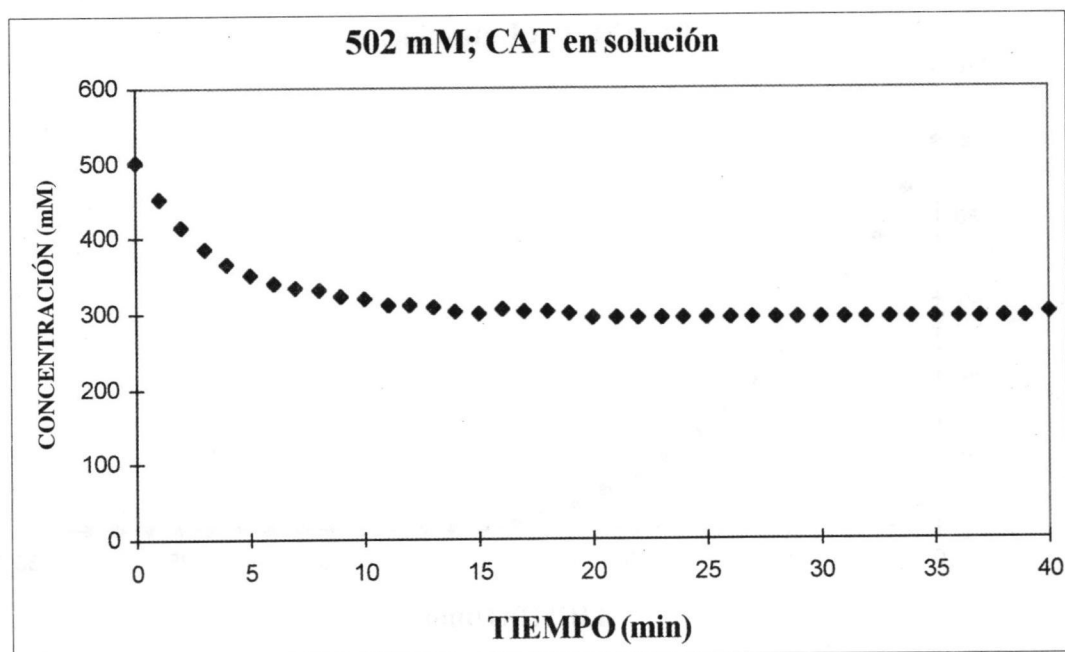


FIGURA 31. Resultados experimentales de concentración inicial de peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de peróxido 502,8 mM.

En los experimentos de concentración inicial de peróxido de hidrógeno 202,8 mM, se observa que el consumo completo de sustrato tiene lugar a los 21 minutos. A diferencia de los experimentos realizados con glucosa oxidasa en solución, el efecto inhibitor del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la enzima catalasa, no se observa hasta el experimento de concentración inicial de peróxido de hidrógeno 502,8 mM. Esta alta concentración inicial de peróxido produce la desactivación total de la enzima antes de que se consuma todo el sustrato, permaneciendo una concentración residual de 300 mM de peróxido de hidrógeno sin reaccionar. Esto se debe a que la enzima catalasa pierde su actividad, sin haber transformado todo el peróxido del medio, transcurridos unos 20 minutos de reacción.

Es posible concluir, analizando en conjunto este grupo de gráficas, que aproximadamente entre los 5 y los 15 ó 20 minutos de haber comenzado el experimento es cuando se observa una apreciable disminución en la velocidad de reacción, debido a la desactivación de la enzima, que llega a ser completa a partir de los 20 minutos de experimentación.

4.2.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD RELATIVA DURANTE EL DESARROLLO DE LA REACCIÓN.

Del mismo modo que para GOD en solución se ha utilizado el método de diferenciación numérica para el cálculo de las velocidades de reacción así como la actividad relativa de la enzima CAT.

Los resultados se exponen en las FIGURAS 32 a 34. Así, se observa claramente cómo disminuye la actividad de la enzima conforme va transcurriendo el tiempo de reacción. Se verifica además, que la pendiente de la curva (velocidad de reacción) se va haciendo cada vez más pequeña. Este hecho se debe a la progresiva desactivación de la enzima.

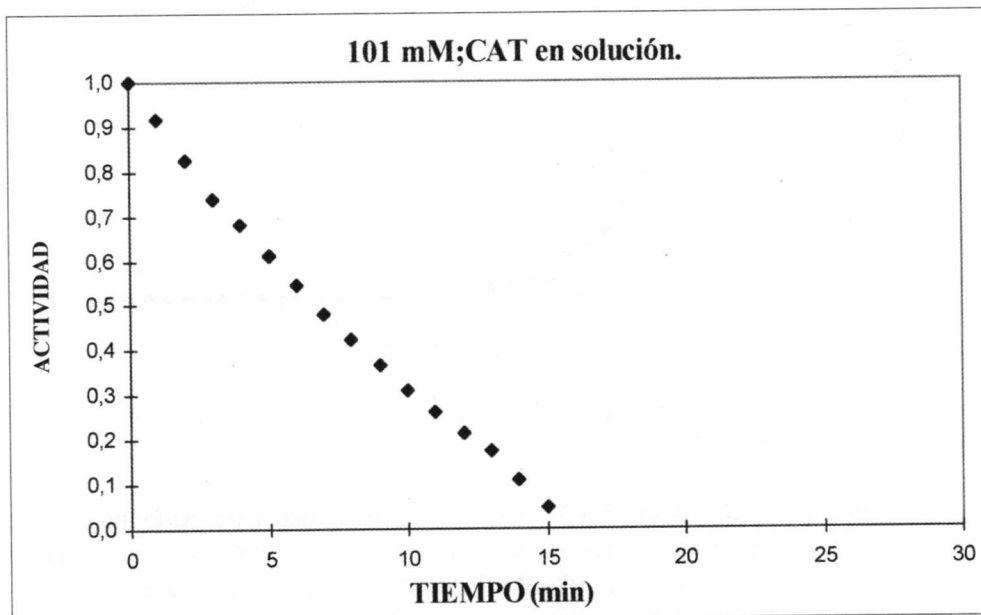


FIGURA 32. Resultados experimentales de actividad relativa frente a tiempo para una concentración inicial de peróxido de hidrógeno 101 mM.

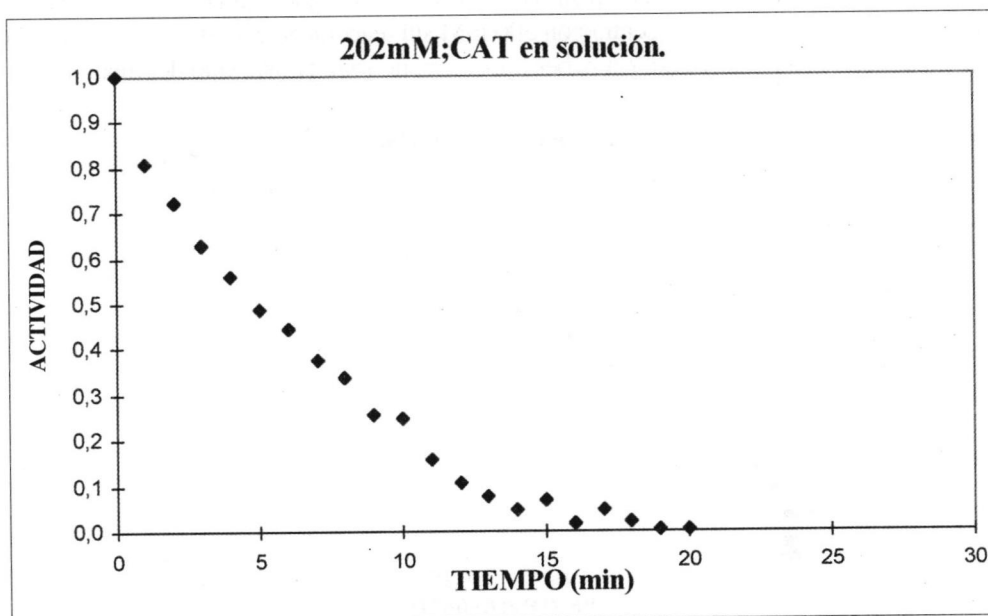


FIGURA 33. Resultados experimentales de actividad relativa frente a tiempo para una concentración inicial de peróxido de hidrógeno 202,8 mM.

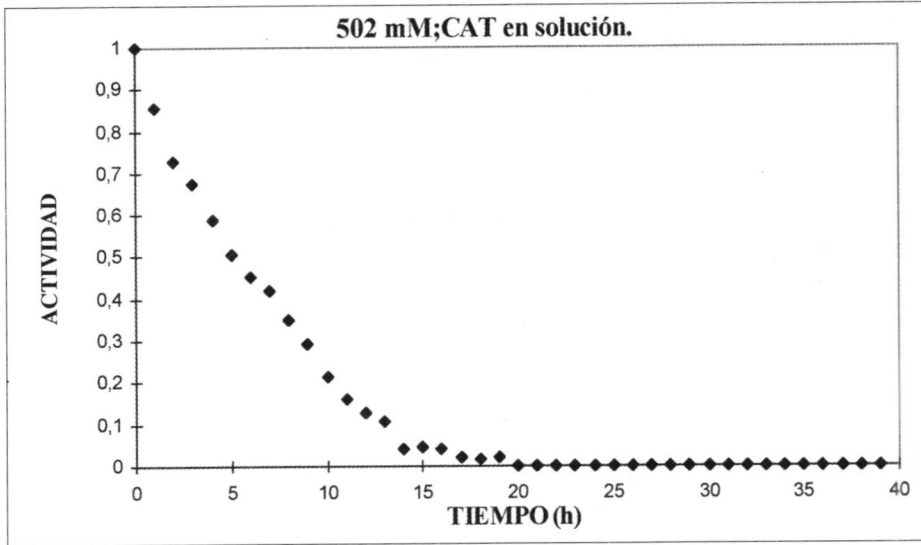


FIGURA 34. Resultados experimentales de actividad relativa frente a tiempo para una concentración inicial de peróxido de hidrógeno 502,8 mM.

Por otra parte, en las FIGURAS 35 a 37 (actividad relativa frente a peróxido) puede observarse cómo la actividad disminuye progresivamente hasta anularse. En los experimentos de concentración inicial de peróxido de hidrógeno 101 y 202 mM (FIGURAS 35 y 36) se llega al consumo total de sustrato, así pues cabe pensar en la posibilidad de que la enzima no se haya desactivado completamente, pero por falta de sustrato en el medio no se puede conocer el momento exacto de la desactivación de la misma. En el caso de una concentración inicial 500 mM (FIGURA 37), no se consume todo el sustrato, el efecto inhibitor del mismo (peróxido de hidrógeno) genera la desactivación de la enzima catalasa quedando una concentración 300 mM sin reaccionar. En éste último experimento la enzima catalasa pierde su actividad, sin haber transformado todo el peróxido del medio.

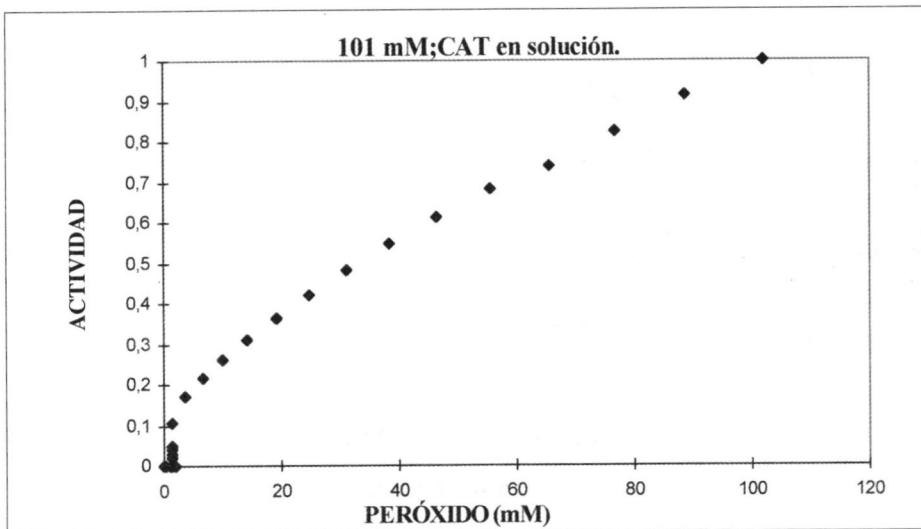


FIGURA 35. Resultados experimentales de actividad relativa frente a concentración de peróxido de hidrógeno para una concentración inicial de peróxido 101 mM.

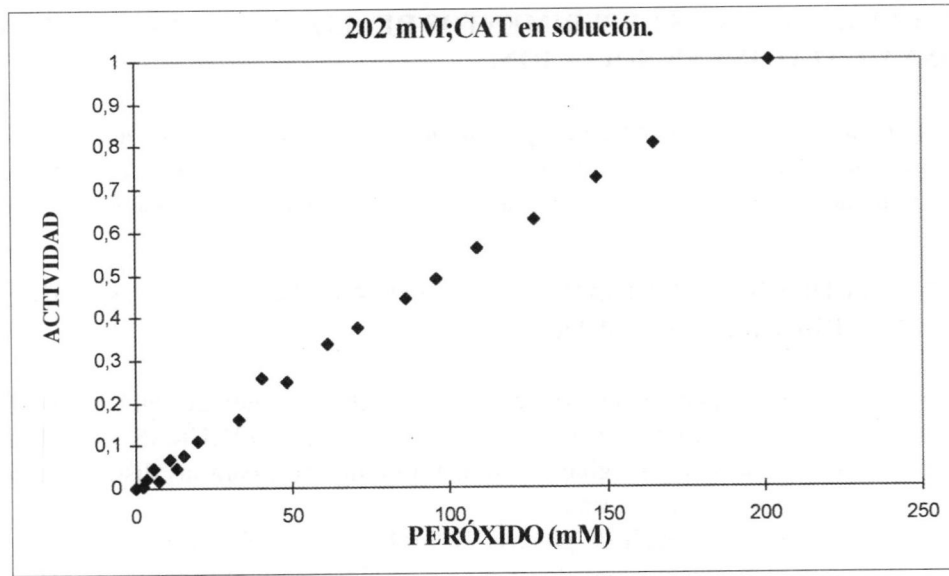


FIGURA 36. Resultados experimentales de actividad relativa frente a concentración de peróxido de hidrógeno para una concentración inicial de peróxido 202,8 mM.

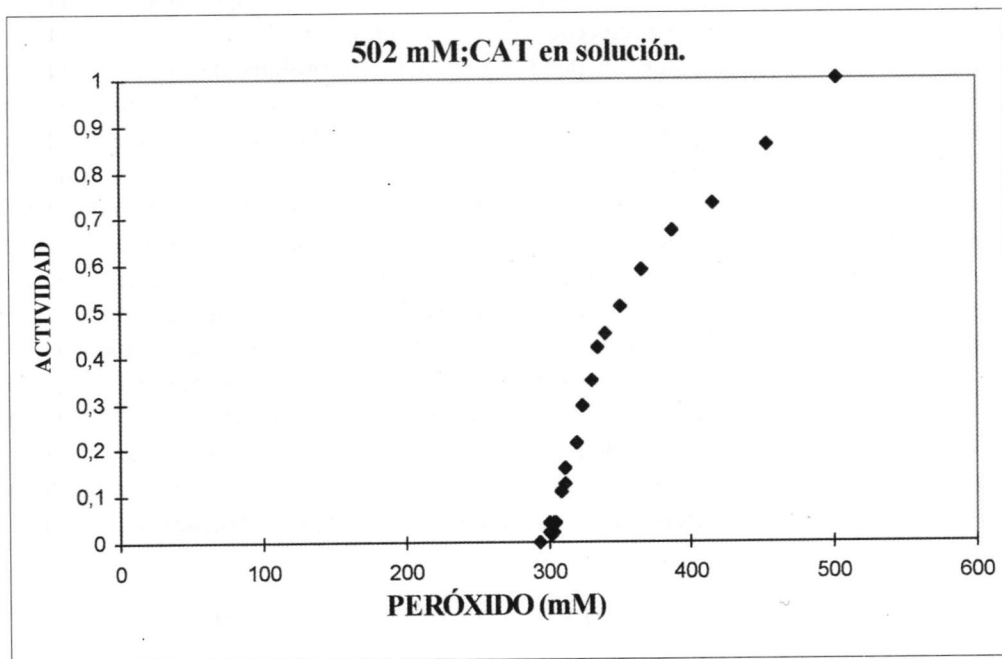


FIGURA 37. Resultados experimentales de actividad relativa frente a concentración de peróxido de hidrógeno para una concentración inicial de peróxido 502,8 mM.

4.3. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA EN SOLUCIÓN.

Se han realizado cuatro experimentos, por duplicado, con las siguientes concentraciones iniciales de glucosa: 12, 80, 200 y 500 mM. Todos ellos llevados a cabo en el reactor Applikon y con las condiciones de operación descritas en los apartados correspondientes de materiales y métodos.

4.3.1. ESTUDIO DE ACTIVIDAD RELATIVA PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES INICIALES DE SUSTRATO.

Se recogen a continuación, de modo gráfico, los resultados obtenidos en los experimentos realizados con glucosa oxidasa y catalasa en solución. Así, en las FIGURAS 38 a 41 se representa la concentración de sustrato (glucosa) frente a tiempo (h), para las distintas concentraciones iniciales mencionadas anteriormente.

Para una concentración inicial de glucosa 12 mM se puede observar cómo se va consumiendo el sustrato, y el producto generado (peróxido de hidrógeno) se degrada inmediatamente. Este hecho verifica lo concluido en los experimentos realizados con catalasa en solución; en la descomposición del peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima catalasa, se observan velocidades de reacción muy superiores a las registradas en la catálisis de la oxidación de la glucosa.

Como puede observarse en la gráfica obtenida para una concentración inicial de glucosa 80 mM, el consumo de sustrato presenta al igual que en el caso anterior, una pendiente constante al principio, para disminuir posteriormente hasta anularse completamente la velocidad de reacción. Al igual que en el experimento anterior, la oxidación de la glucosa es más rápida que en aquellos casos en los que sólo interviene la enzima glucosa oxidasa en el proceso. Así en los experimentos realizados con glucosa oxidasa en solución la pendiente permanece constante hasta transcurrida aproximadamente 1 hora de reacción, mientras con ambas enzimas presentes en el medio a los 20 minutos ya comienza a descender la pendiente de la gráfica y la velocidad aumenta al tener lugar la reacción en un periodo de tiempo más corto. Este hecho puede explicarse en base a que la enzima glucosa oxidasa no se encuentra influenciada por el efecto inhibitor del peróxido de hidrógeno generado, puesto que se descompone inmediatamente por la enzima catalasa conforme se va generando. Como consecuencia, no se aprecia concentración neta de peróxido de hidrógeno en el medio.

Para concentraciones iniciales de glucosa mayores: 200 y 500 mM, al igual que en los casos anteriores se observan las mismas tendencias tanto para el consumo de sustrato, como para la aparición y descomposición instantánea de producto. Sin embargo en estos dos experimentos, al contrario que en los dos anteriores, parece ralentizarse el proceso comenzando a disminuir progresivamente la pendiente de la curva a las 3 horas y 30 minutos y a las 4 horas y 17 minutos, respectivamente. Es en estos experimentos donde realmente se observa el efecto protector de la enzima catalasa sobre glucosa oxidasa, prolongándose sensiblemente su periodo de actividad en el medio de reacción.

4.3.2. ESTUDIO DE ACTIVIDAD RELATIVA DURANTE EL DESARROLLO DE LA REACCIÓN.

La actividad relativa de ambas enzimas se calculó utilizando la técnica de diferenciación numérica descrita en la presente memoria.

En las FIGURAS 42 a 45 se ha representado actividad frente a tiempo (horas). Puede observarse claramente, como disminuye la actividad de la enzima conforme va transcurriendo el tiempo de reacción. Se verifica que la pendiente de la curva se va haciendo cada vez más pequeña hasta llegar a anularse, lo cual está en concordancia con las conclusiones obtenidas en el estudio para distintas concentraciones iniciales de sustrato.

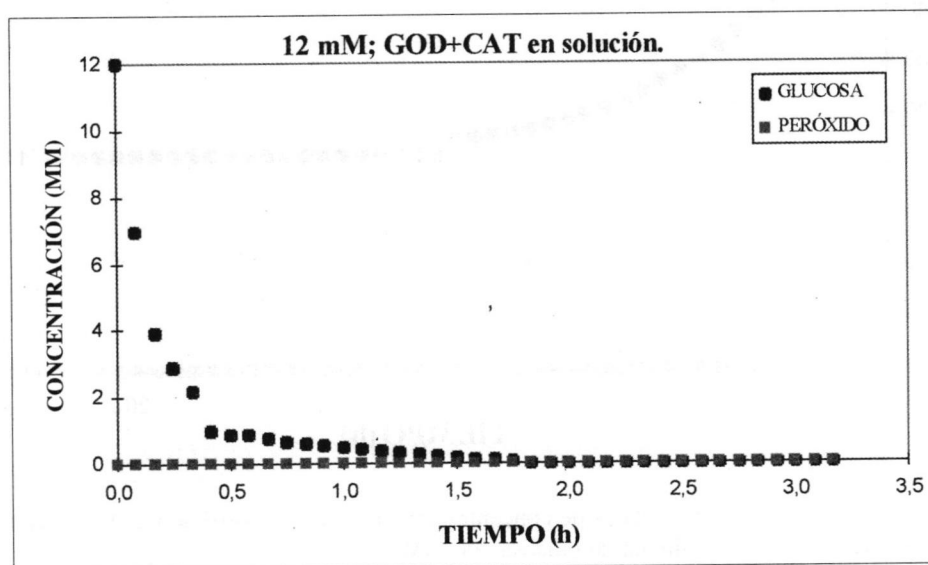


FIGURA 38. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

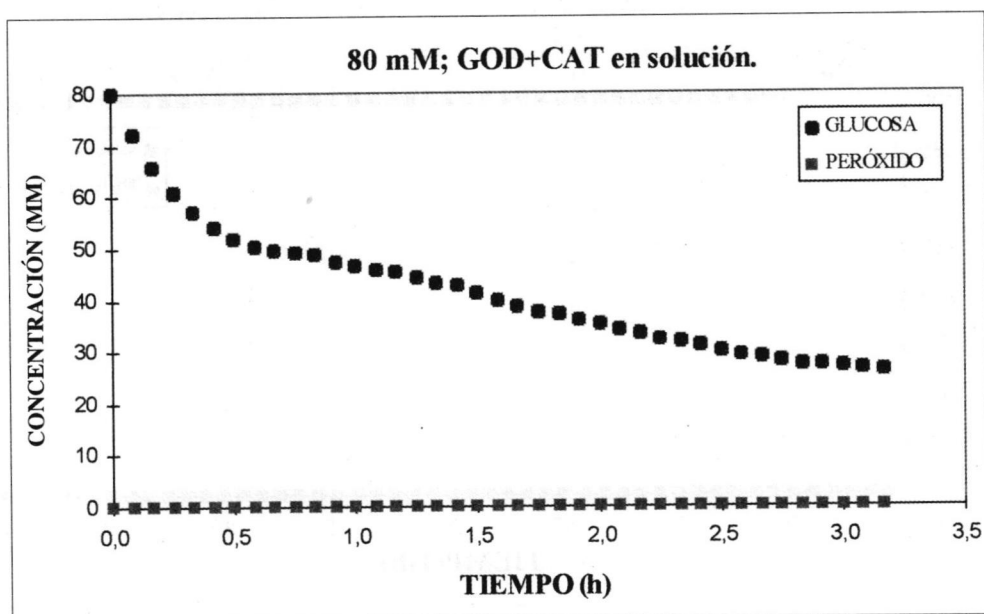


FIGURA 39. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM

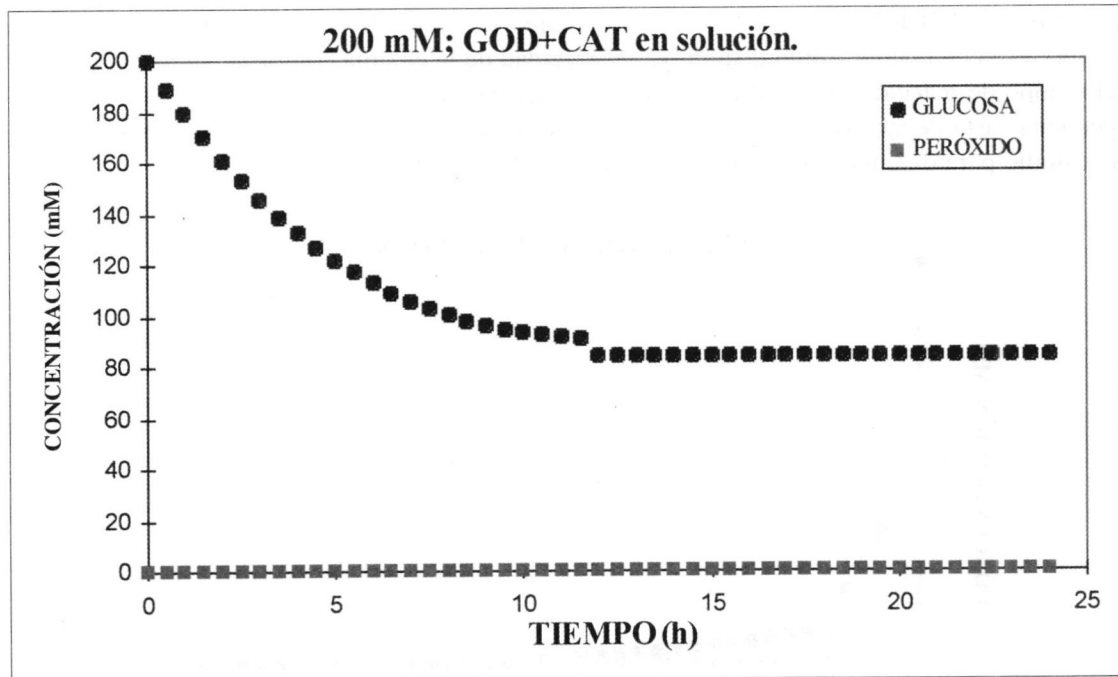


FIGURA 40. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

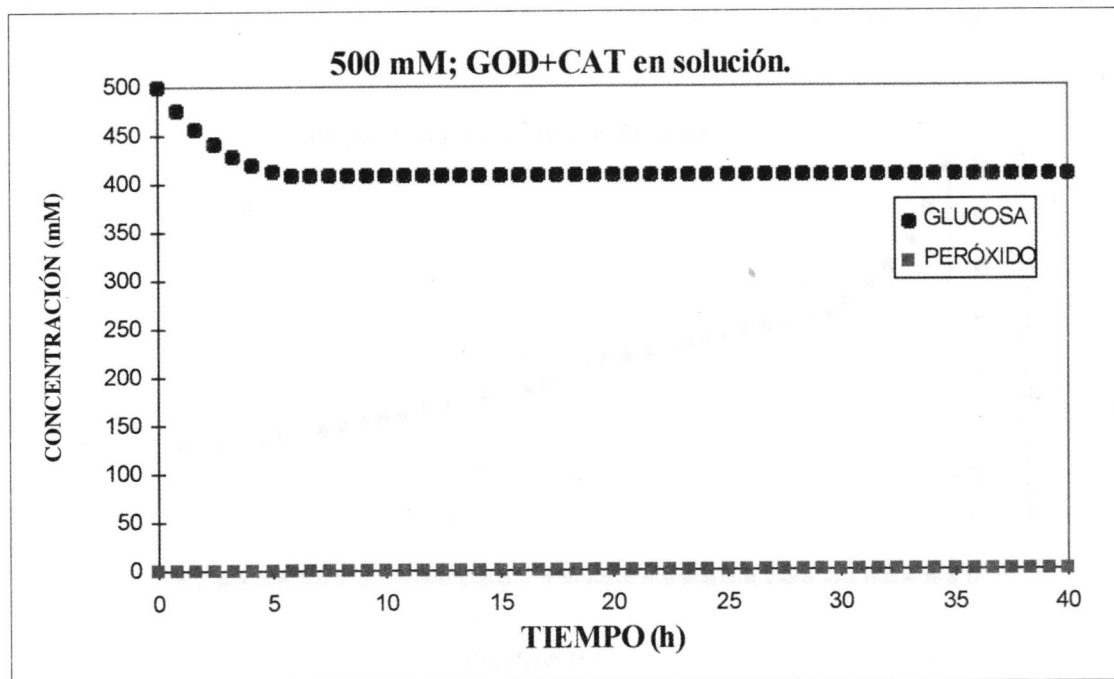


FIGURA 41. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

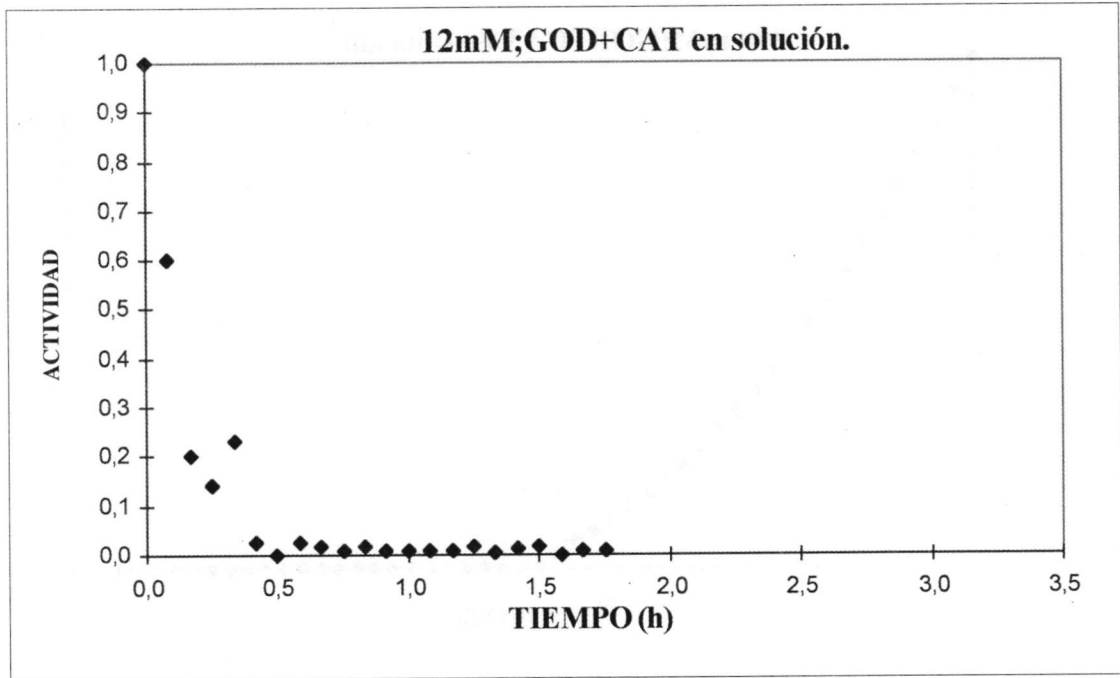


FIGURA 42. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

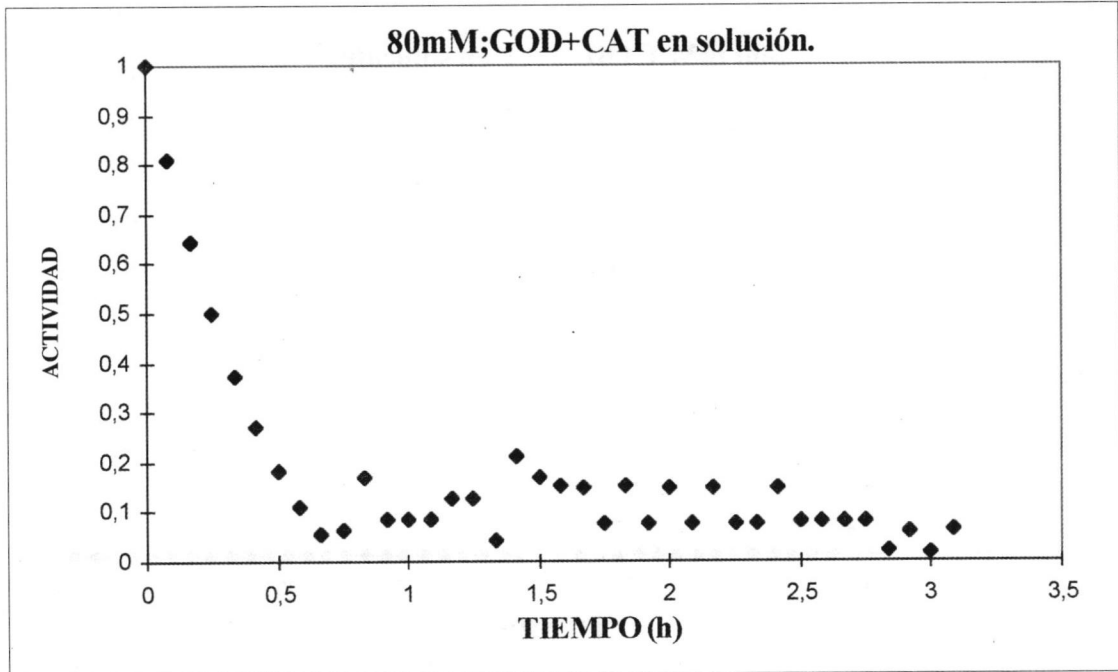


FIGURA 43. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

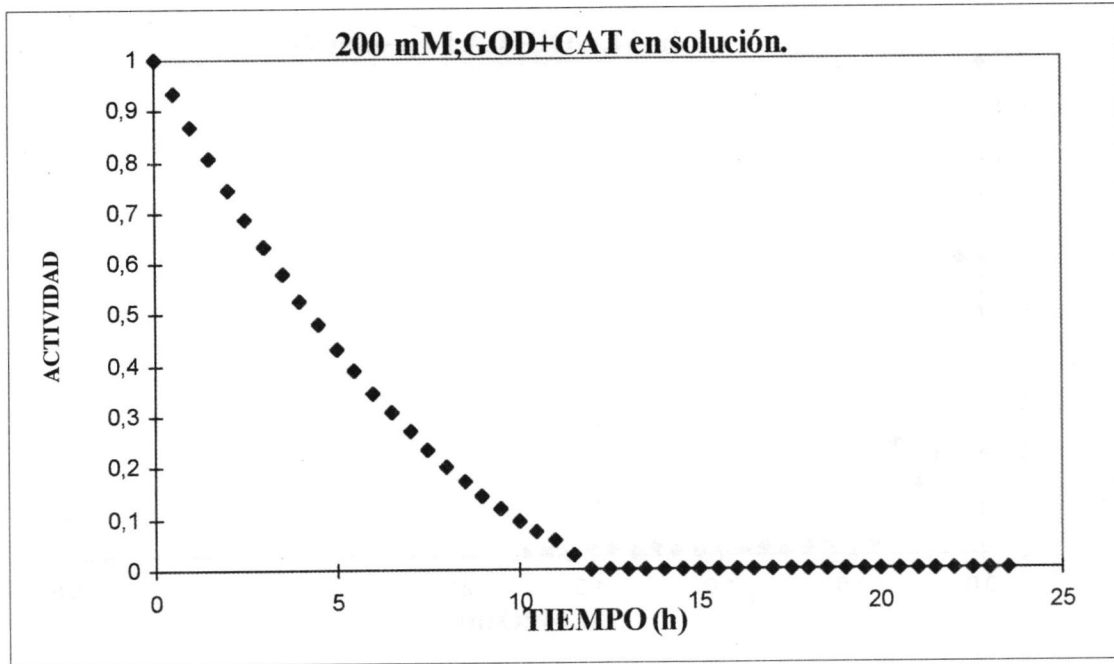


FIGURA 44. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

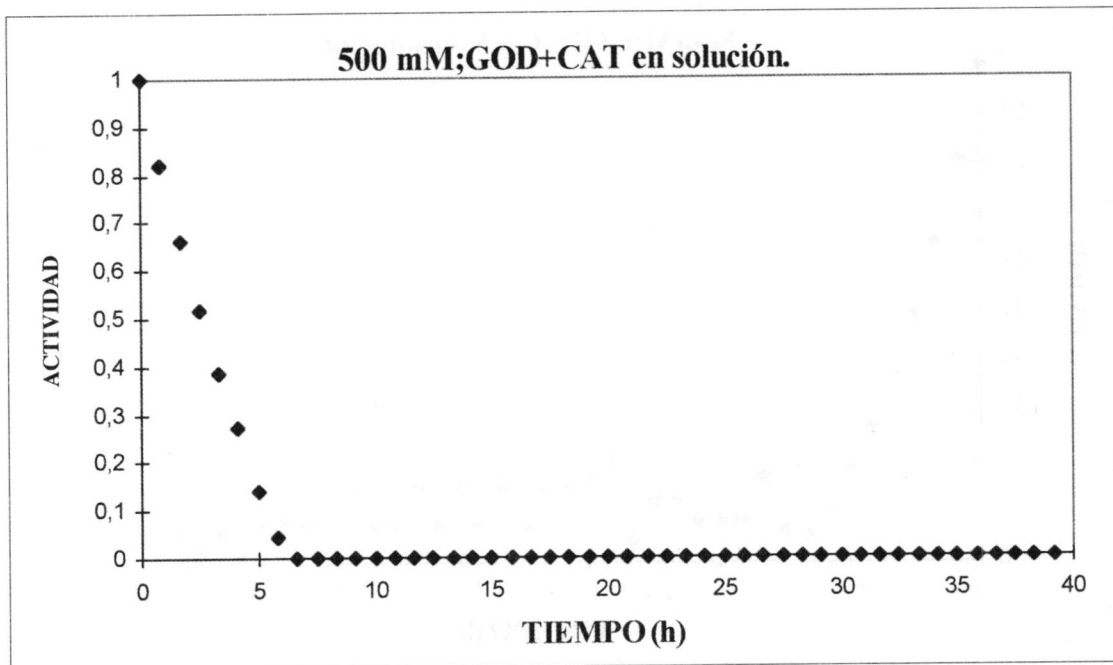


FIGURA 45. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

4.4. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON GLUCOSA OXIDASA Y CATALASA CO-INMOVILIZADAS EN PARTÍCULAS DE ALGINATO CÁLCICO.

Estos experimentos han sido realizados con la finalidad de evaluar el efecto del soporte (alginato cálcico) sobre la actividad catalítica de las enzimas GOD y CAT.

Se ha desarrollado una extensa experimentación en el reactor Applikon empleando partículas esféricas de 3 y 5 mm de diámetro. Al igual que en resto de los experimentos se ha operado en régimen discontinuo.

4.4.1. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON PARTÍCULAS DE 3 mm DE DIÁMETRO.

Se han realizado cuatro experimentos, por duplicado, con las siguientes concentraciones iniciales de glucosa: 12, 80, 200 y 500 mM. Todos ellos llevados a cabo en el reactor Applikon con las condiciones de operación descritas en los apartados correspondientes de materiales y métodos.

4.4.1.1. Estudio de actividad relativa para distintas concentraciones iniciales de sustrato.

Se exponen a continuación, de modo gráfico, los resultados obtenidos en los experimentos realizados con glucosa oxidasa y catalasa co-inmovilizadas en partículas (de alginato cálcico) de 3 mm de diámetro. En las FIGURAS 46 a 49 se representan las concentraciones de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo (h), para las distintas concentraciones iniciales mencionadas anteriormente.

Para una concentración inicial de glucosa 12 mM se puede observar como se va consumiendo el sustrato, y que el producto generado (peróxido de hidrógeno) se degrada inmediatamente. La desactivación de la enzima principal es mas lenta que en los experimentos con glucosa oxidasa y catalasa en solución. Por otra parte continúa verificándose el hecho de que en la descomposición del peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima catalasa, se observan velocidades de reacción muy superiores a las observadas en la catálisis de la oxidación de la glucosa.

Como puede observarse en la gráfica obtenida para una concentración inicial de glucosa 80 mM, el consumo de sustrato presenta una pendiente constante al principio, que luego disminuye hasta anularse completamente la velocidad de reacción.

Para concentraciones iniciales de glucosa mayores; 200 y 500 mM, se observan las mismas tendencias tanto para el consumo de sustrato como para la aparición y descomposición instantáneo de producto.

Es posible concluir analizando en conjunto este grupo de gráficas, que no se observan retrasos debidos a difusión de sustrato en ninguna de ellas, puesto que si fuese así aparecería una zona, al inicio de la reacción, en la que no habría cambios de concentración. Por otra parte, se observa que la inmovilización de las enzimas favorece la actividad catalítica de la enzima principal, desactivándose ésta a tiempos muy superiores a los registrados en los experimentos en solución.

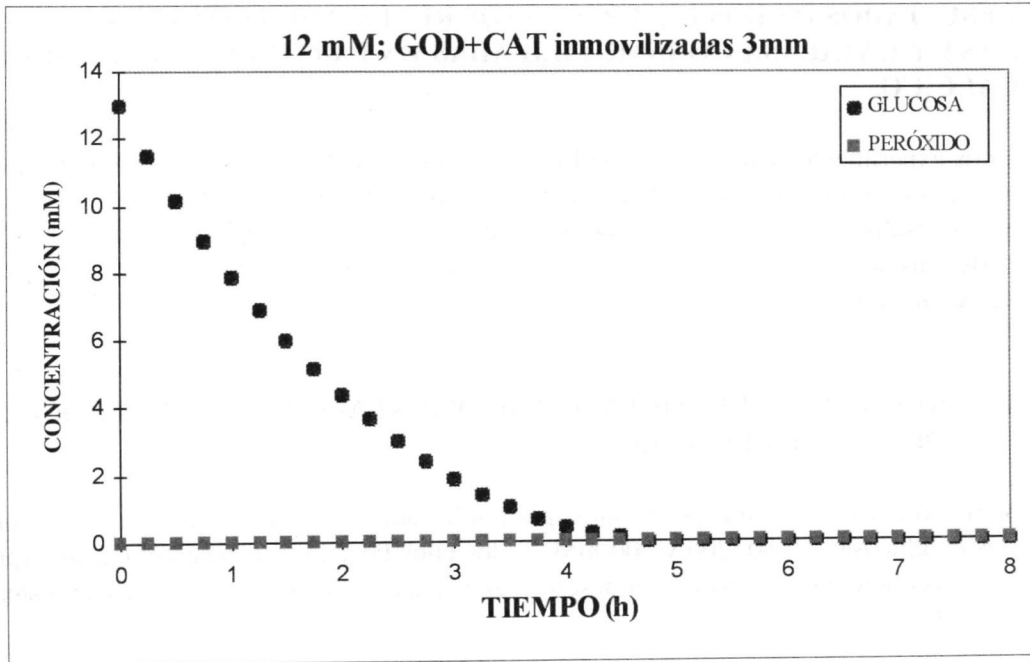


FIGURA 46. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

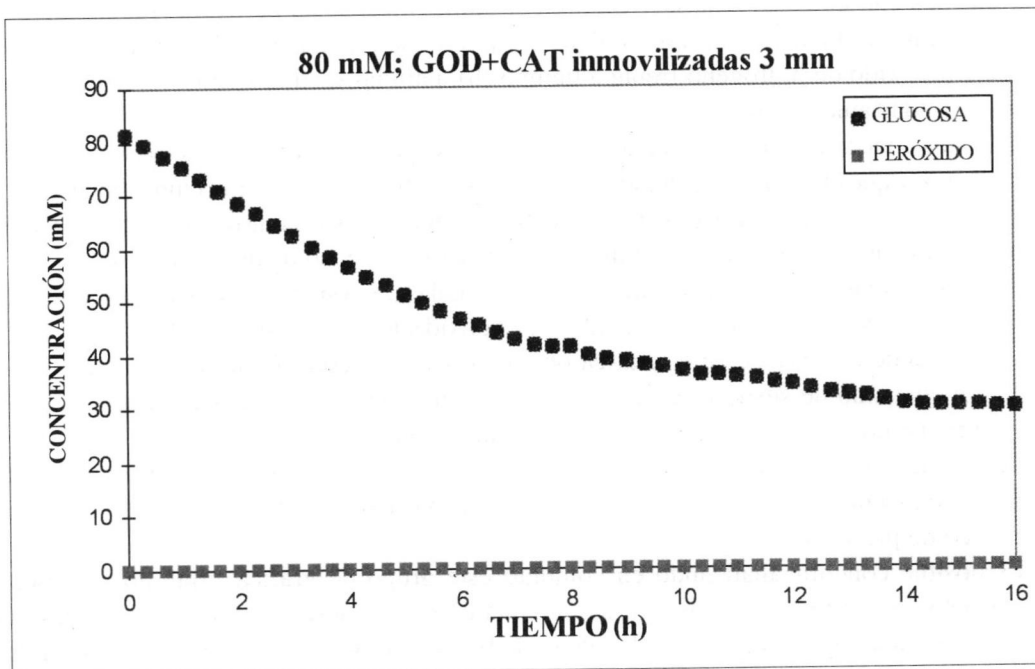


FIGURA 47. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

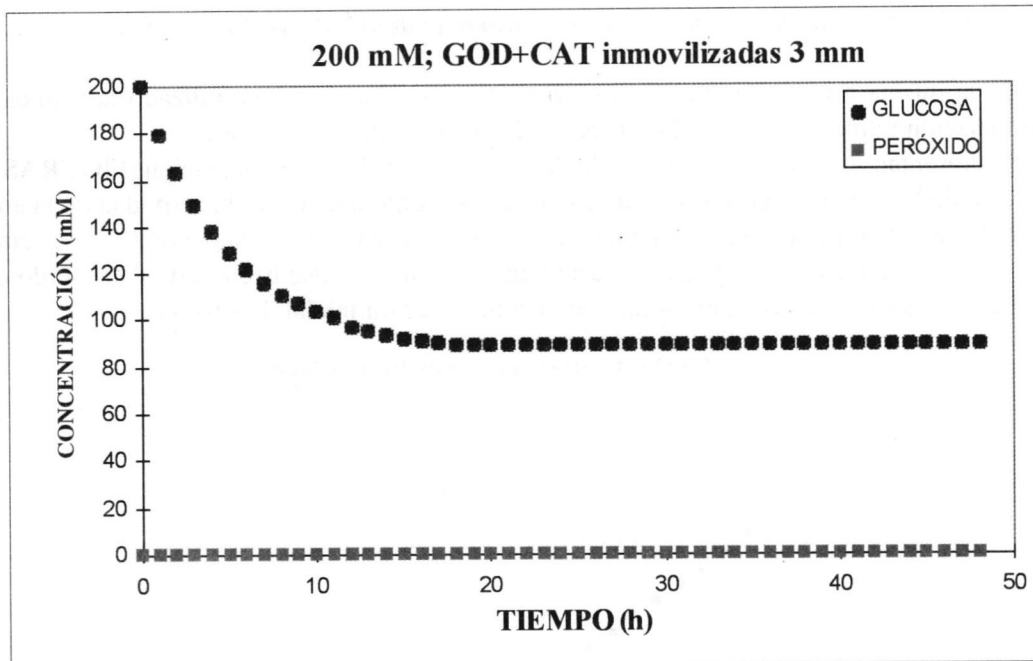


FIGURA 48. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

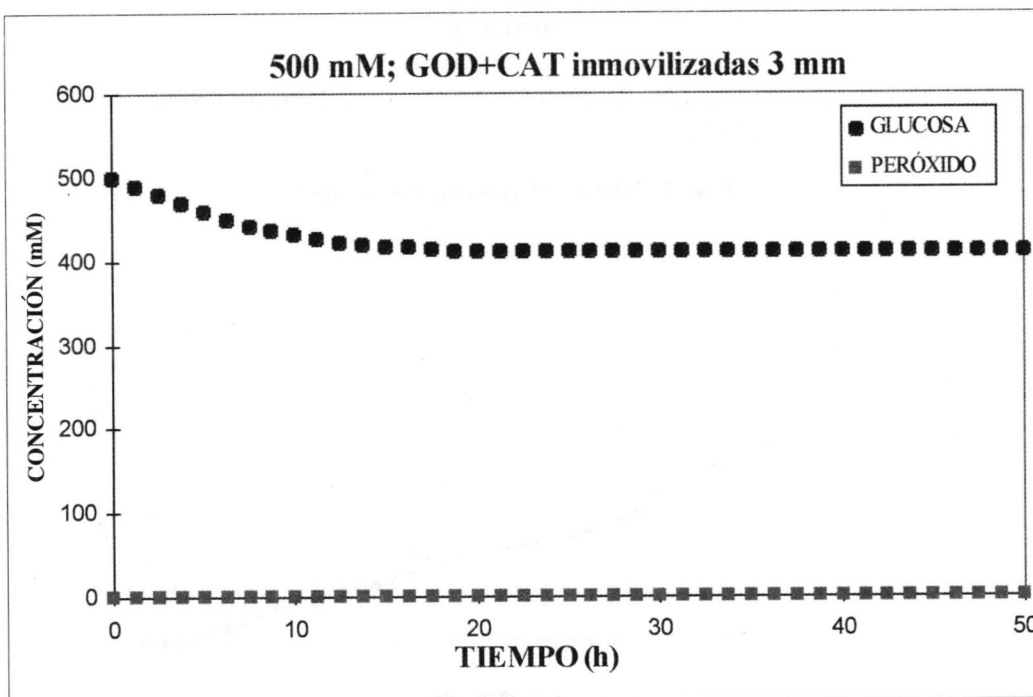


FIGURA 49. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

4.4.1.2. Estudio de la actividad relativa durante el desarrollo de la reacción.

De la misma forma que para los experimentos en solución se ha utilizado la técnica de diferenciación numerica para evaluar la actividad relativa de las enzimas.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en la experimentación (FIGURAS 50 a 53). En dichas figuras puede observarse claramente cómo disminuye la actividad de la enzima conforme va transcurriendo el tiempo de reacción. Se aprecia que la pendiente de la curva se va haciendo cada vez más pequeña hasta llegar a anularse. Este hecho esta de acuerdo con las conclusiones obtenidas en el estudio de la concentración inicial de sustrato.

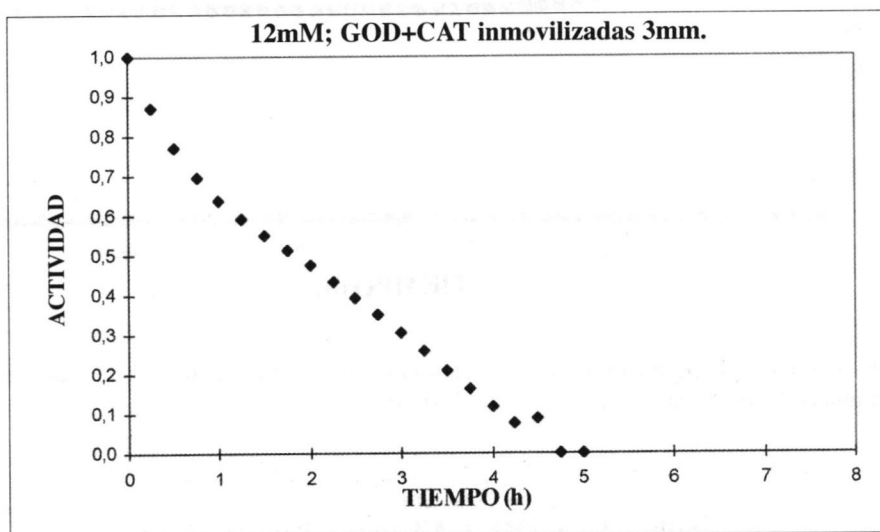


FIGURA 50. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

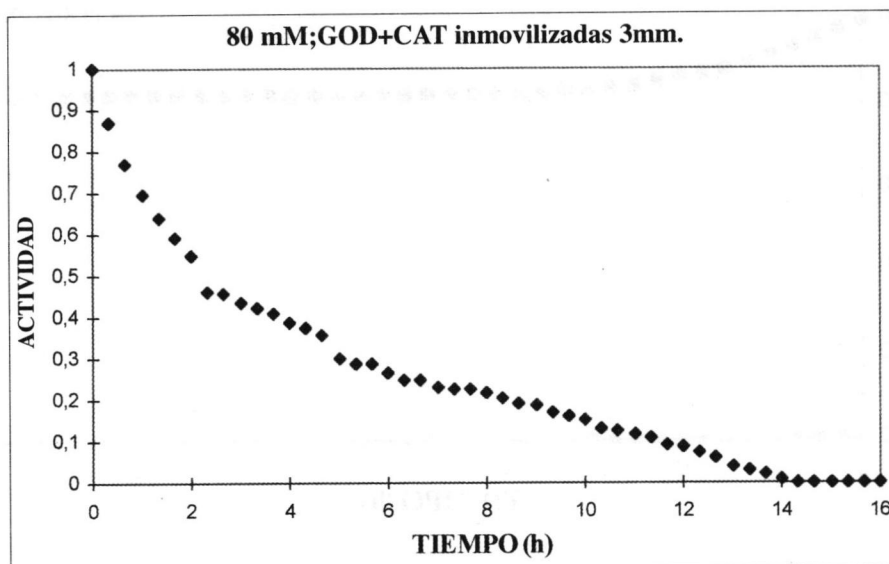


FIGURA 51. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

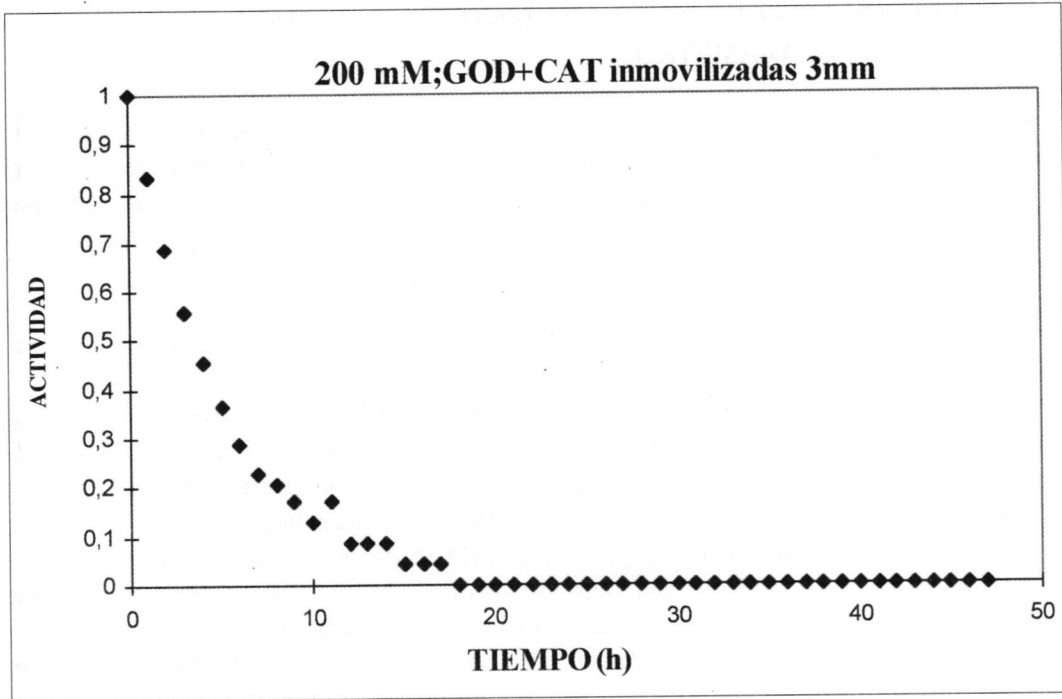


FIGURA 52. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

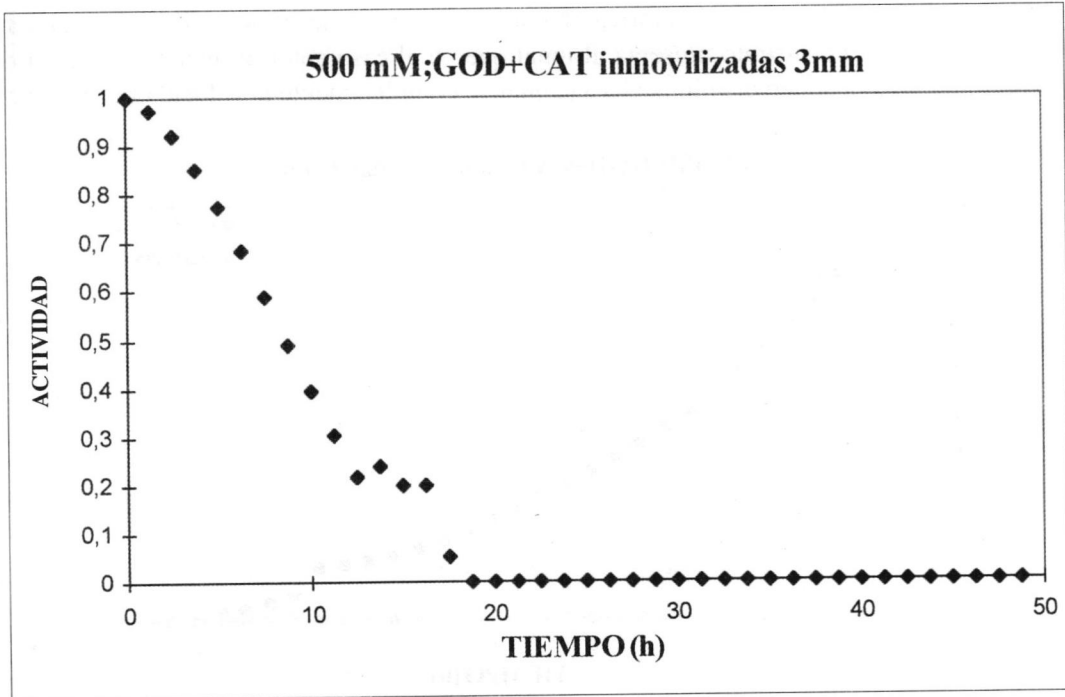


FIGURA 53. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

4.4.2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON PARTÍCULAS DE 5 mm DE DIÁMETRO.

Se han realizado cuatro experimentos, por duplicado, con las siguientes concentraciones iniciales de glucosa: 12, 80, 200 y 500 mM. Todos ellos llevados a cabo en el reactor Applikon y con las condiciones de operación descritas en los apartados correspondientes de materiales y métodos.

4.4.2.1. Estudio de actividad relativa para distintas concentraciones iniciales de sustrato.

Se exponen a continuación los resultados obtenidos en los experimentos realizados con glucosa oxidasa y catalasa co-inmovilizadas en partículas (de alginato cálcico) de 5 mm de diámetro. En las FIGURAS 54 a 57 se representa la concentración de glucosa frente a tiempo (h), para las distintas concentraciones iniciales mencionadas anteriormente.

Para una concentración inicial de glucosa 12 mM se puede observar como se va consumiendo el sustrato, y el producto generado (peróxido de hidrógeno) se degrada inmediatamente. La desactivación de la enzima principal es incluso algo más lenta que en el caso de glucosa oxidasa y catalasa co-inmovilizadas en partículas de 3 mm de diámetro, y por supuesto más lenta que en los experimentos en solución. Por otra parte, continúa verificándose el hecho de que en la descomposición del peróxido de hidrógeno, catalizada por la enzima catalasa, se observan velocidades de reacción muy superiores a las registradas en la oxidación de la glucosa.

Como puede observarse en la gráfica obtenida para una concentración inicial de glucosa 80 mM el consumo de sustrato presenta al igual que en el caso anterior, una pendiente constante al principio, que luego disminuye hasta anularse completamente la velocidad de reacción.

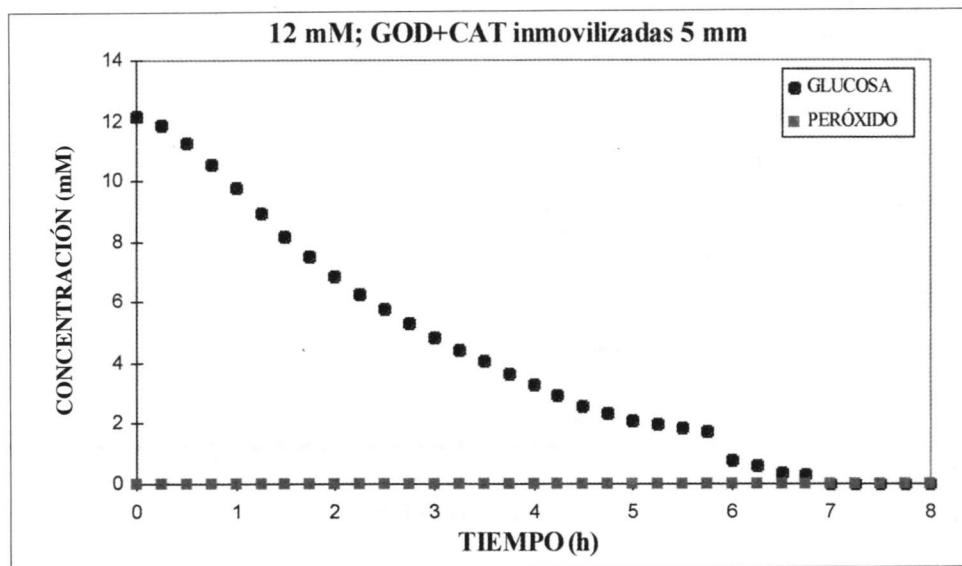


FIGURA 54. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

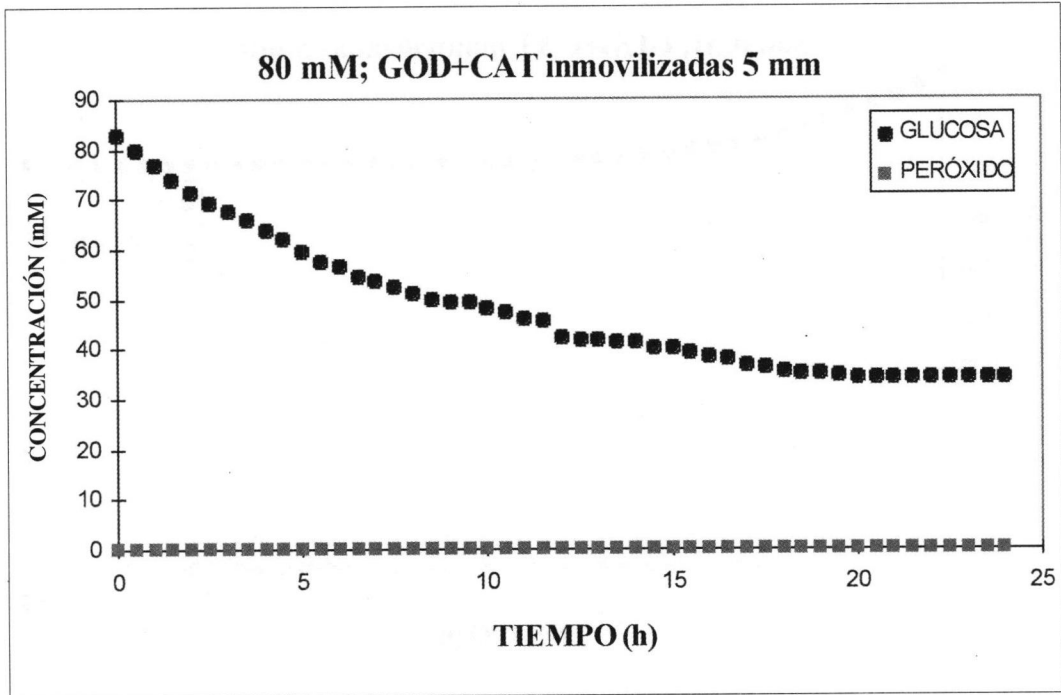


FIGURA 55. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

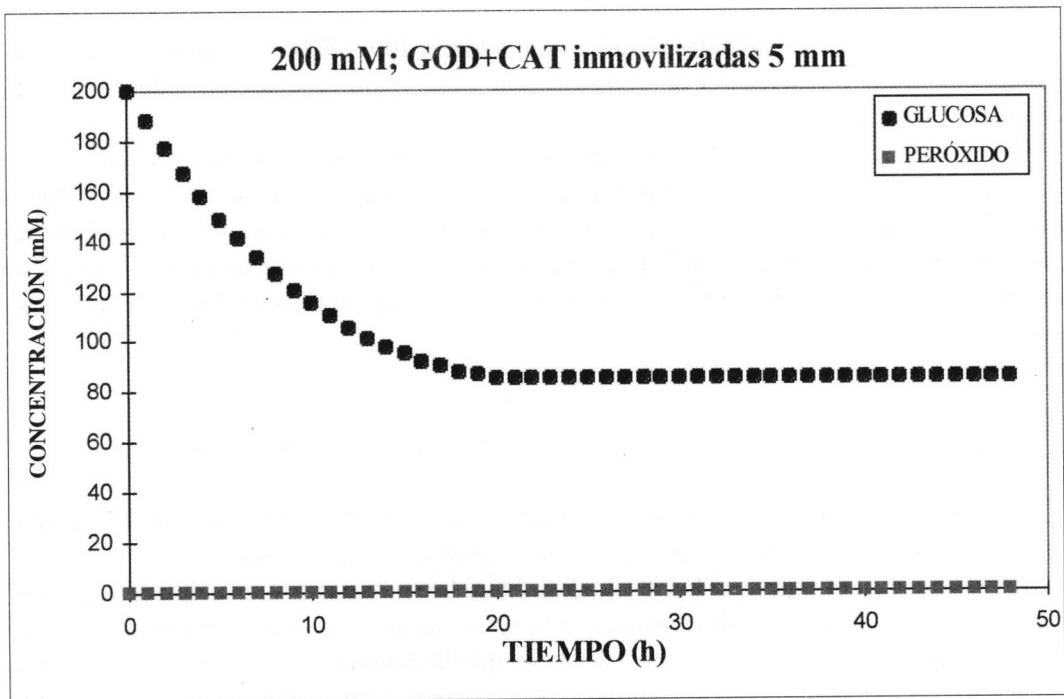


FIGURA 56. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

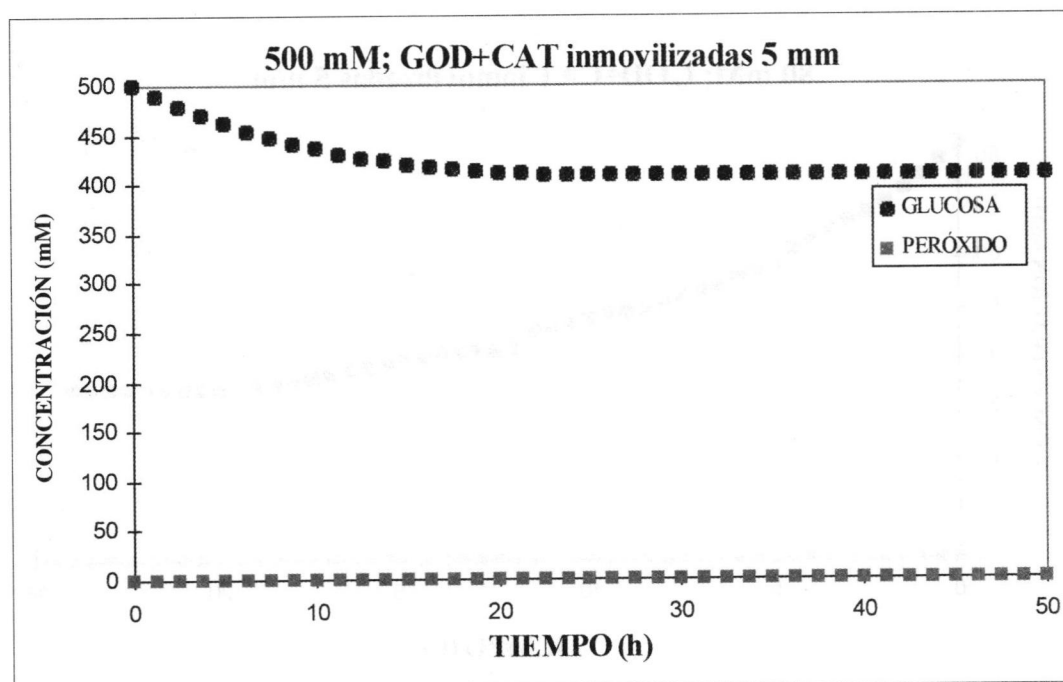


FIGURA 57. Resultados experimentales de concentración de glucosa y peróxido de hidrógeno frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

Para concentraciones iniciales de glucosa mayores; 200 y 500 mM, se observan las mismas tendencias tanto para el consumo de sustrato, como para la aparición y descomposición instantánea del producto.

Por tanto, es posible concluir, analizando en conjunto este grupo de experimentos, que la reacción enzimática no se afecta por la difusión del sustrato a través del soporte. Por otra parte, también se observa que la inmovilización de las enzimas favorece la actividad catalítica de la enzima principal, desactivándose ésta prácticamente al mismo tiempo que para las partículas de 3 mm, y a tiempos muy superiores a los registrados en los experimentos en solución.

4.4.2.2. Estudio de la actividad relativa durante el desarrollo de la reacción.

De la misma forma que para los experimentos en solución se ha utilizado la técnica de diferenciación numérica para evaluar la actividad relativa de las enzimas.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en la experimentación (FIGURAS 58 a 61). Es posible observar cómo disminuye la actividad de la enzima conforme va transcurriendo el tiempo de reacción. Puede verificarse, que la pendiente de la curva se va haciendo cada vez más pequeña hasta llegar a anularse, para tiempos muy superiores que los registrados en solución. Este hecho está en concordancia con las conclusiones obtenidas en el estudio de la concentración inicial de sustrato.

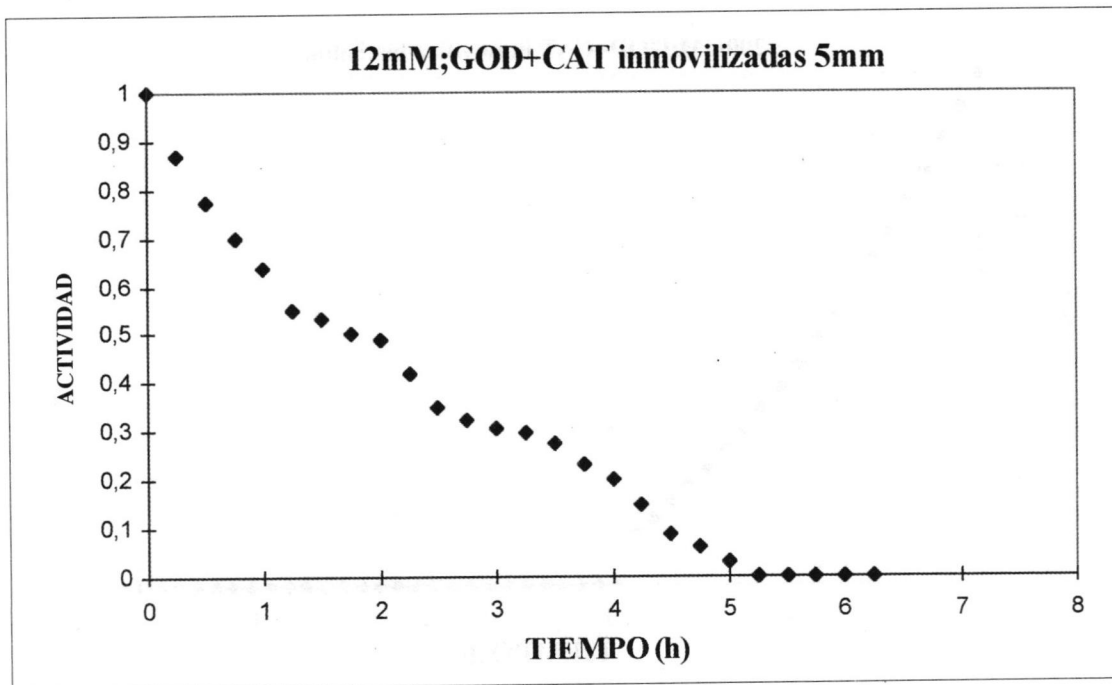


FIGURA 58. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 12 mM.

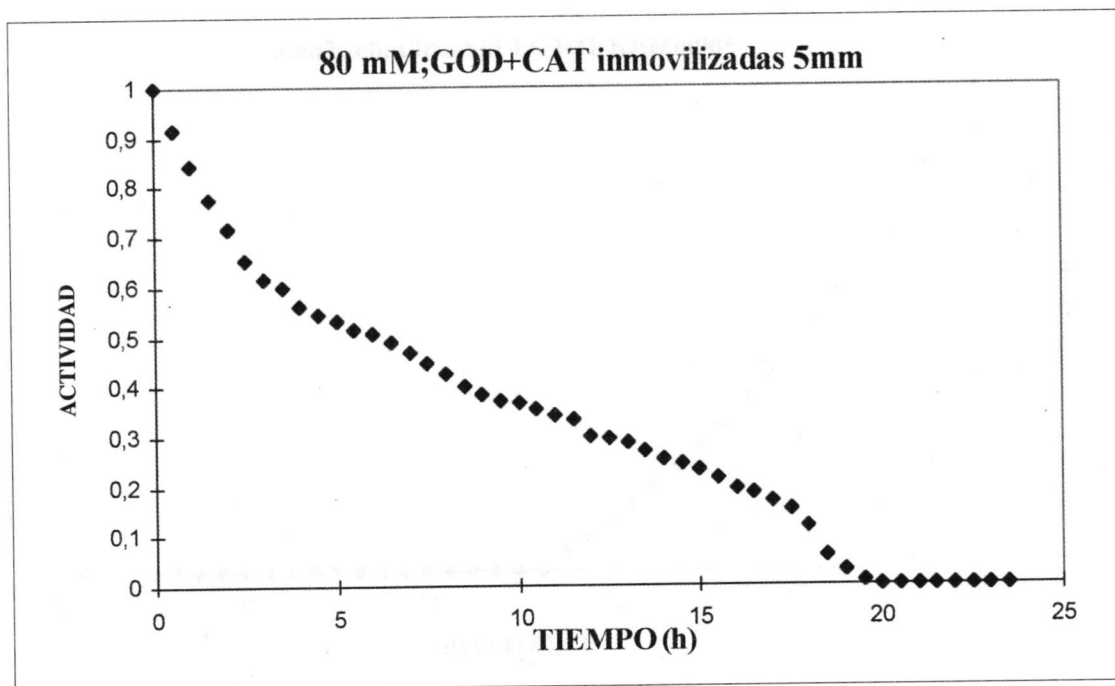


FIGURA 59. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 80 mM.

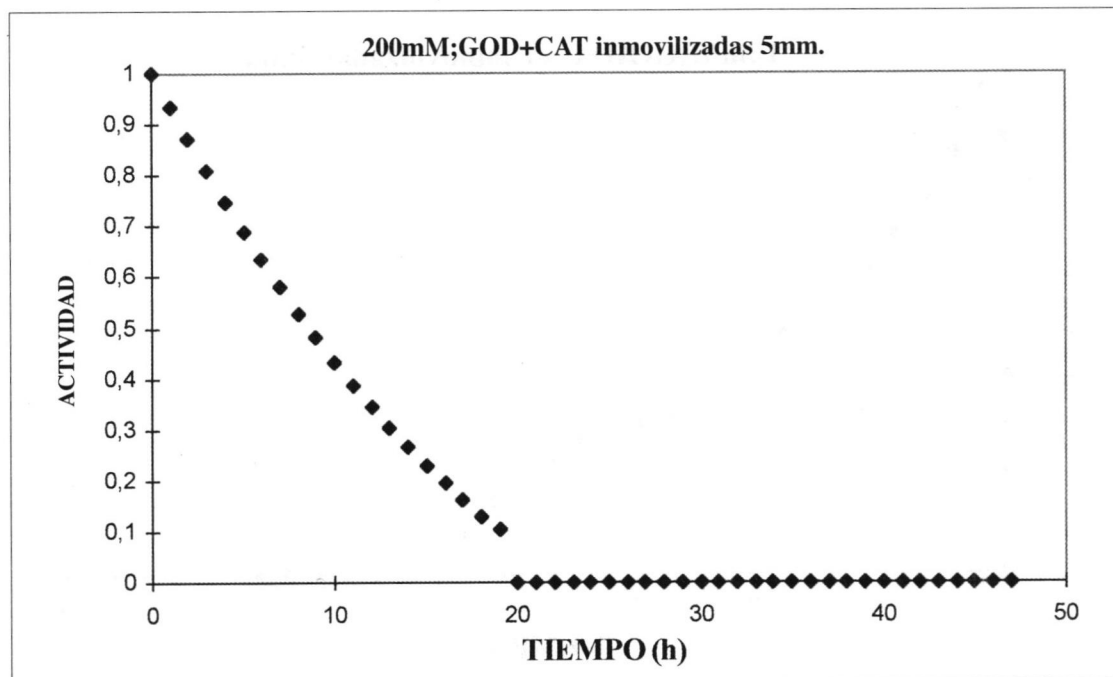


FIGURA 60. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 200 mM.

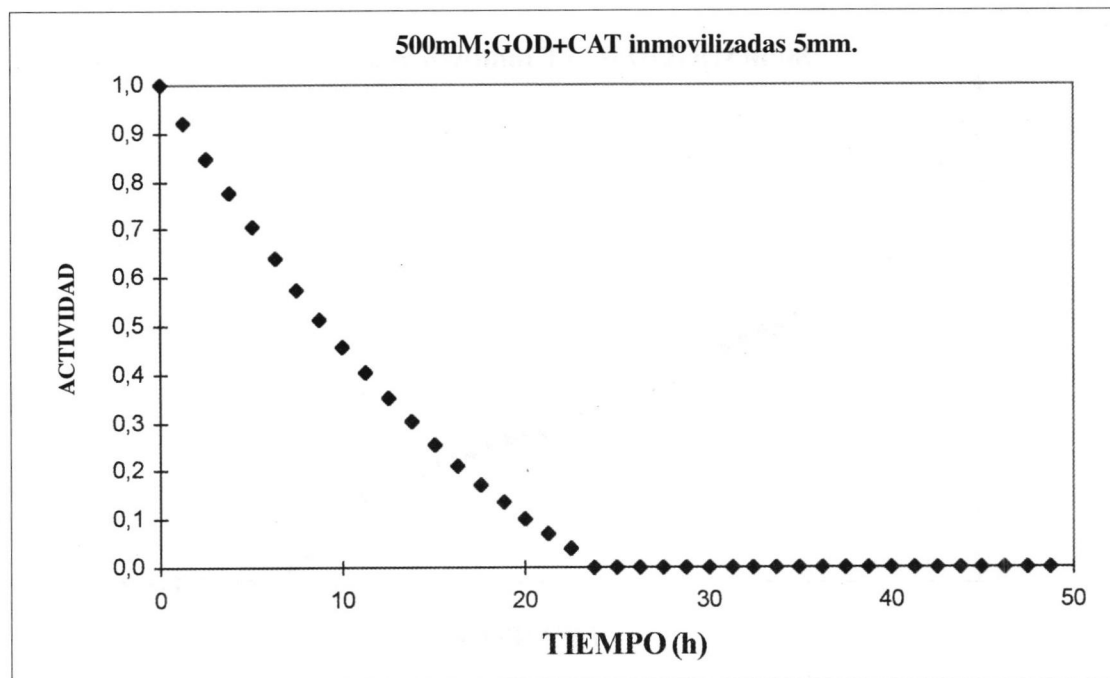


FIGURA 61. Resultados experimentales de actividad relativa de GOD frente a tiempo para una concentración inicial de glucosa 500 mM.

4.5. MODELOS CINÉTICOS PROPUESTOS.

Es habitual en todo estudio de Ingeniería Química el desarrollo de un modelo matemático que permita sistematizar y realizar inferencias acerca del proceso sometido a estudio partiendo de la experiencia adquirida y la experimentación realizada. En este sentido se abordará en este apartado el desarrollo de un modelo de desactivación de las enzimas GOD y CAT.

Inicialmente pueden proponerse ecuaciones para la predicción de actividades relativas de tipo polinómico en función de las variables sometidas a estudio: tiempo de reacción y concentración de peróxido de hidrógeno. Este tipo de regresiones permiten predecir el comportamiento del sistema, dentro de ciertos márgenes de operación con coeficientes de regresión altos.

En segundo lugar, se abordará este modelado cinético del proceso de desactivación de las enzimas a partir de ecuaciones que poseen un innegable carácter representacional, aunque se obtendrán coeficientes de regresión inferiores a los alcanzados para las ecuaciones polinómicas.

4.5.1. MODELO CINÉTICO BASADO EN ECUACIONES POLINÓMICAS.

Para determinar los polinomios que describen adecuadamente el comportamiento observado en la desactivación de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa se han utilizado herramientas estadísticas convencionales; como es el caso de las que pone a nuestro alcance el programa informático STATGRAPHICS (v. 6.0) para DOS.

Concretamente, la técnica más adecuada para determinar los coeficientes de los polinomios de ajuste es la "STEPWISE REGRESSION", o regresión paso a paso. Son importantes las similitudes de ésta técnica con la regresión múltiple^[Demidowitsch et al., 1980], aunque en este caso la propia técnica evalúa la relevancia de las variables independientes, su cuadrado o su producto en el modelo final. De este modo es posible conocer cuales de las variables independientes, y en que forma deben ser incluidas en el modelo^[Manual Statgraphics, 1986; Pérez, 1996].

Esta técnica permite asignar pesos a cada uno de los datos experimentales obtenidos, a través de la entrada "Weights". Así, es posible establecer un punto base dando mayor peso a aquellos datos experimentales por los que se sabe que tiene que pasar el modelo forzosamente.

Utilizando la opción Method "FORWARD" (método hacia delante) el programa permite ir añadiendo una a una las variables independientes en cuestión. El criterio para incluir una u otra variable independiente en el modelo radica en el parámetro estadístico "F o desviación estándar/desviación típica". Así, "F-enter" sería el valor que debe alcanzar el parámetro F para incluir una determinada variable, mientras el parámetro "F-remove" es el valor por debajo del cual la variable queda eliminada del modelo. Cada vez que se incorpora una variable al modelo, el programa presenta en pantalla la correspondiente mejora en el coeficiente de regresión (r^2).

En todos los casos se ha trabajado con una serie de valores que el programa trae por defecto; se ajustó la ecuación con opción a término independiente (β_0); la opción de F-enter y F-remove como 4. El nivel de confianza del 95 % y un número máximo de pasos de 500, el control se ha tomado manual.

Para realizar el ajuste se introdujeron como posibles variables independientes:

- tiempo, t (h);
- concentración de peróxido, P (mM);
- tiempo al cuadrado, t^2 (h²);
- concentración de peróxido al cuadrado, P^2 (mM²) e
- interacción tiempo-peróxido, $t \cdot P$ (h·mM);

Es preciso resaltar que en el ajuste se incluyeron los posibles términos correspondientes a interacciones tiempo-concentración de peróxido de hidrógeno, por conocer y preveer, de alguna forma, la existencia de posibles efectos sinérgicos.

Han sido dos factores los que han conducido a no incluir la concentración de glucosa en el polinomio. Por una parte, ninguno de los modelos existentes en la bibliografía hace referencia a la concentración de glucosa como sustancia que influya en la desactivación de la enzima GOD; y por otra, la concentración de peróxido de hidrógeno debe cerrar el balance de materia con la concentración de glucosa, por tanto aparece una co-linealidad que no permitiría realizar dicha regresión.

Con la enzima glucosa oxidasa en solución, en presencia de catalasa en solución, e inmovilizada con ésta en partículas de alginato, se realizaron cuatro experimentos, por duplicado para cada caso, con las concentraciones iniciales de glucosa: 12, 80, 200 y 500 mM. Con la enzima catalasa en solución se realizaron cuatro experimentos, también por duplicado, con las concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno: 53, 101, 202,8 y 502,8 mM. Usando los datos experimentales obtenidos ha sido posible determinar un polinomio de regresión de las variables independientes tiempo y concentración de peróxido de hidrógeno. La ecuación polinómica genérica propuesta es la siguiente:

$$a = \beta_0 + \beta_1 \cdot t + \beta_2 \cdot t^2 + \beta_3 \cdot P + \beta_4 \cdot P^2 + \beta_5 \cdot t \cdot P$$

Ecuación 72

Se tiene que cumplir necesariamente que para el instante de tiempo inicial ($t = 0$ h) aún no se ha generado peróxido en el medio de reacción, y por lo tanto su concentración en ese momento es nula, a la vez que la actividad de la enzima ha de presentar su valor máximo, la unidad. Así pues, a los puntos iniciales de los experimentos se les ha conferido, tras la realización de algunas pruebas preliminares con el programa, el peso máximo de la experimentación.

También se conoce que una vez estabilizada la concentración de peróxido en el medio en valores altos, la actividad de la enzima permanece en valores muy próximos a cero. De este modo a los valores finales de los experimentos también se les ha asignado un peso importante.

Utilizando los valores de los parámetros de regresión anteriormente citados, se han obtenido los valores de los coeficientes de ajuste para el polinomio de desactivación que se presentan en la TABLA 10.

Es preciso indicar que los ajustes numéricos referentes al comportamiento de GOD en el sistema GOD+CAT, tanto en solución como en sistemas heterogéneos, se han realizado considerando la concentración de peróxido, generada por GOD y descompuesta por CAT, en cada intervalo de tiempo de experimentación. Puesto que cómo se ha indicado en la exposición de resultados la concentración medida de peróxido de hidrógeno en cada instante es nula. Si bien ambas enzimas deben soportar instantáneamente considerables cantidades del mismo.

ACTIVIDAD RELATIVA	β_0	β_1 (h ⁻¹)	β_2 (h ⁻²)	β_3 (mM ⁻¹)	β_4 (mM ⁻²)	β_5 (h ⁻¹ mM ⁻¹)	r ²
a _{GOD}	0,9993±0,0017	-0,3661±0,0051	0,0337±0,00086	—	1,16.10 ⁻⁴ ±4,7.10 ⁻⁷	—	0,9978
a _{CAT}	0,9999±0,00149	-6,3651±0,0502	10,235±0,1814	—	3,9.10 ⁻¹⁰	—	0,9995
(a _{GOD}) _{SIST}	0,9200±0,0040	-0,2631±0,0049	0,016±0,00053	—	—	—	0,9833
(a _{GOD}) _{5 mm}	0,9979±0,0027	-1,1416±0,0032	0,0051±0,00021	-0,0061±0,0029	—	—	0,9920
(a _{GOD}) _{5 mm}	0,999±0,0019	-0,1053±0,0026	0,0027±0,0001	-0,0600±0,0157	0,0043±0,0014	0,0049±0,0009	0,9937

TABLA 10. Coeficientes de la ecuación polinómica propuesta para la desactivación de la enzima GOD y a_{CAT} obtenida en los experimentos con catalasa en solución.

Dada esta sistemática de estudio y puesto que la concentración de peróxido de hidrógeno en el medio de reacción es cero; queda claro que las concentraciones generadas instantáneamente por GOD deben ser eliminadas por la enzima catalasa. De este modo las actividades relativas ajustadas frente a tiempo y peróxido de hidrógeno se refieren a actividad de la enzima glucosa oxidasa para cada sistema de reacción ((a_{GOD})_{SIST}).

Como se puede observar no han aparecido en la expresión términos de interacción tiempo-peróxido de hidrógeno, excepto en el caso de los experimentos de inmovilización con partículas de 5 mm, lo cual parece indicar que el efecto sinérgico entre ambas variables, para la actividad relativa de la enzima glucosa oxidasa, es tan pequeño que el programa no llega a seleccionarlo para incluirlo en la expresión polinómica resultante.

Otro aspecto reseñable en la ecuación obtenida radica en el hecho de los valores tan bajos, o inexistentes, que toman los términos referidos a concentración de peróxido de hidrógeno, de forma que puede concluirse que los efectos del tiempo son más importantes que los de la concentración de peróxido de hidrógeno, en el modelo.

4.5.2. MODELO CINÉTICO BASADO EN ECUACIONES FENOMENOLÓGICAS.

En este apartado se propondrán a diferencia de los apartados anteriores, ecuaciones de desactivación que poseen un claro fundamento físico y mecanístico, aún sacrificando los altos coeficientes de regresión y complicando su formulación matemática.

Para ajustar las ecuaciones que describan adecuadamente el comportamiento observado en la desactivación de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, también se ha utilizado el programa informático STATGRAPHICS (v. 6.0) para DOS.

Concretamente, la técnica más adecuada para determinar los coeficientes de las ecuaciones de ajuste ha sido la "NON LINEAR REGRESSION"^[1][Manual Statgraphics, 1986; Pérez, 1996]. Esta técnica habilita el procedimiento para obtener estimaciones por mínimos cuadrados de los parámetros de un modelo no lineal.

La técnica realiza el ajuste a una ecuación no lineal utilizando un algoritmo matemático iterativo de búsqueda de soluciones aproximadas. Para la estimación de los parámetros del modelo parten de unos valores iniciales coherentes. Concretamente el programa utiliza el algoritmo de Marquardt^[Marquardt, 1963].

En todos los casos, se ha trabajado con la serie de valores que el programa trae por defecto; número máximo de iteraciones: 25, máximo número de veces para que el sistema evalúe la función durante la búsqueda de la solución: 200.

El parámetro inicial de Marquardt, obligatorio para obtener la solución iterativa aproximada, es por defecto 0,01. El factor de escala inicial (después de cada iteración, el sistema multiplica el valor del parámetro de Marquardt corriente por el factor de escala para utilizar el valor resultante como parámetro de Marquardt para la siguiente iteración) se fija por defecto en 20. Y el valor máximo del parámetro de Marquardt, por encima del cual el sistema abandona la búsqueda de la solución, lo toma por defecto como 120.

La técnica presenta dos condiciones de parada del proceso iterativo, en las que igualmente se han tomado los valores que trae el programa por defecto; "Stopping Cond. on Res. SS", condición de parada en el proceso iterativo cuando la diferencia en la suma de cuadrados residual de una iteración a la siguiente es menor o igual a 10^{-4} y "Stopping Cond. on estimates", en la que el proceso se para cuando la diferencia en el valor de los parámetros estimados de una iteración a la siguiente es menor o igual 10^{-3} .

De todas las ecuaciones ensayadas que se recogen en la bibliografía, la que mejores ajustes proporciona es la ecuación exponencial propuesta por Romero (1996).

$$a = \exp \left(- \left[\left(\frac{K_1 \cdot P^2 + K_2 \cdot P}{K_3 + P} \right) \cdot t \right] \right)$$

Ecuación 73

Esta ecuación procede del mecanismo de desactivación tipo ping-pong de la enzima GOD expuesto en los antecedentes en el apartado 2.7.3.1., en el que se puede observar de donde procede la expresión de tipo exponencial propuesta.

4.5.2.1. Ecuación teórica propuesta para la desactivación de la enzima glucosa oxidasa.

Usando los datos experimentales obtenidos para la enzima glucosa oxidasa en solución ha sido posible determinar una ecuación de desactivación de las variables independientes tiempo (h) y concentración de peróxido de hidrógeno (mM).

En la opción "parameter vector" del programa STATGRAPHICS se han introducido las estimaciones iniciales para los parámetros con valor 1, tanto para k_1 como para k_2 .

Se han obtenido los siguientes valores para los parámetros de la ecuación exponencial:

$$k_1 = 0,00019 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$$

$$k_2 = 0,5404 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

$$k_3 = 0,1 \text{ (mM)}$$

Con un coeficiente de regresión $r^2 = 0,9554$.

4.5.2.2. Ecuación teórica propuesta para la desactivación de la enzima catalasa.

Del mismo modo, utilizando los datos experimentales obtenidos en la experimentación con catalasa en solución, en la ecuación exponencial se han obtenido los siguientes valores ajustados para las constantes:

$$k_1 = 0,0018 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$$

$$k_2 = 8,3505 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

$$k_3 = 0,01 \text{ (mM)}$$

Con un coeficiente de regresión $r^2 = 0,965$.

Como puede observarse los coeficiente de regresión, en ambos casos, son bastante peores que los obtenidos en las ecuaciones polinómicas, aunque el sentido físico de estas ecuaciones es claro y está basado en mecanismos cinéticos de desactivación desarrollados en los antecedentes bibliográficos, concluyéndose siempre, para ambas enzimas, con expresiones exponenciales para la actividad.

4.5.2.3. Ecuación teórica propuesta para la desactivación de ambas enzimas en solución e inmovilizadas en partículas de alginato cálcico.

Teniendo en cuenta los datos experimentales obtenidos, en cada caso, se ha procedido a su ajuste y los resultados se muestran en la TABLA 11.

Los ajustes se han realizado teniendo en cuenta las concentraciones instantáneas de peróxido generadas y consumidas por el sistema GOD-CAT. Por tanto las actividades calculadas se refieren a dicho sistema.

	k_1 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	k_2 (h^{-1})	k_3 (mM)	r^2
GOD+CAT solución	$5 \cdot 10^{-5}$	$0,3618 \pm 0,0089$	$5 \cdot 10^{-5}$	0,9598
GOD+CAT inm. 3mm.	$5 \cdot 10^{-5}$	$0,2249 \pm 0,0066$	$5 \cdot 10^{-5}$	0,9865
GOD+CAT inm. 5mm	$5 \cdot 10^{-5}$	$0,1359 \pm 0,0019$	$5 \cdot 10^{-5}$	0,9808

TABLA 11. Coeficientes ajustados para el sistema GOD+CAT.

Se aprecia que conforme se inmovilizan ambas enzimas en partículas de alginato con diámetros mayores 0, 3 y 5 mm disminuye el valor de la constante k_2 o, expresado de otra forma;

las influencias de la concentración de peróxido de hidrógeno y el tiempo de reacción sobre la enzima GOD son cada vez menores. Por tanto el aumento en el tamaño de la partícula ejerce claramente un papel protector sobre la actividad enzimática.

Asimismo, k_2 representa a tres pasos de mecanismo cinético general, recogido en los antecedentes de esta memoria, y de los que no se poseen evidencias experimentales para poder definir cual es más relevante, aunque la bibliografía consultada indica que la mayor desactivación se produce en la forma reducida de la enzima "E_R" y el complejo enzima oxidada-peróxido (38 veces más sensible que la enzima oxidada "E_O").

4.6. VALIDACIÓN DEL MODELO CINÉTICO PROPUESTO.

Cualquier modelo teórico propuesto, necesita forzosamente ser contrastado con los datos que se han obtenido durante el desarrollo de la experimentación. La validación de la ecuación teórica propuesta en el apartado anterior (4.5.2.) puede ser corroborada analizando las gráficas (FIGURAS 62 a 64) que se exponen a continuación.

La representación de cada curva teórica se ha realizado con la expresión exponencial de actividad propuesta, tomando en cada caso el coeficiente k_2 obtenido para cada grupo de experimentos, respectivamente.

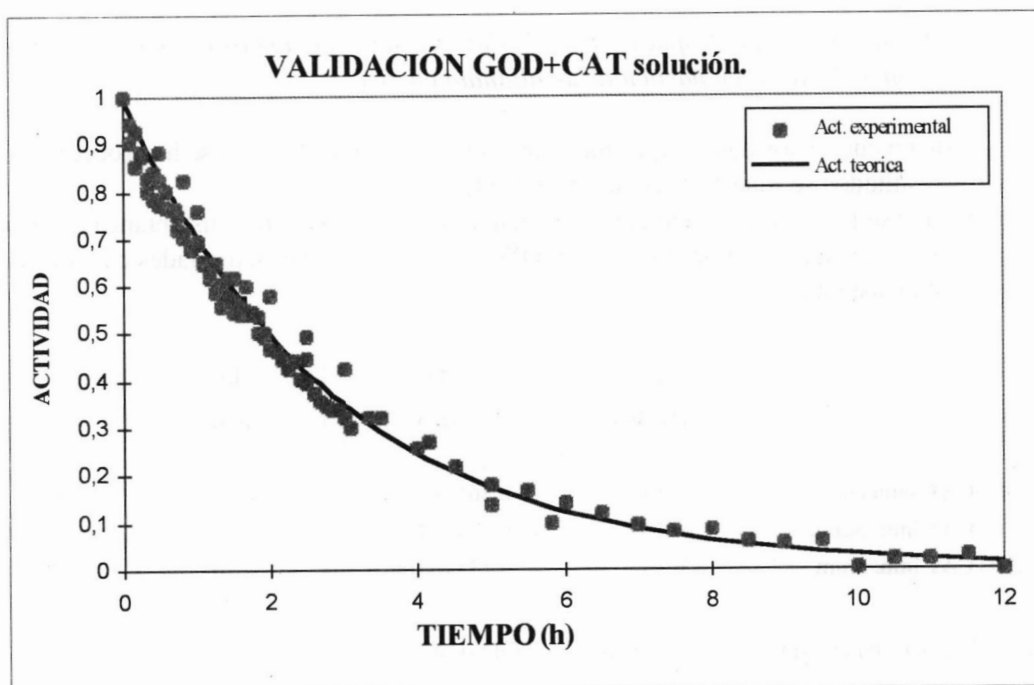


FIGURA 62. Representación de la actividad, obtenida experimentalmente y con la ecuación teórica propuesta, frente a tiempo para los datos de GOD+CAT en solución.

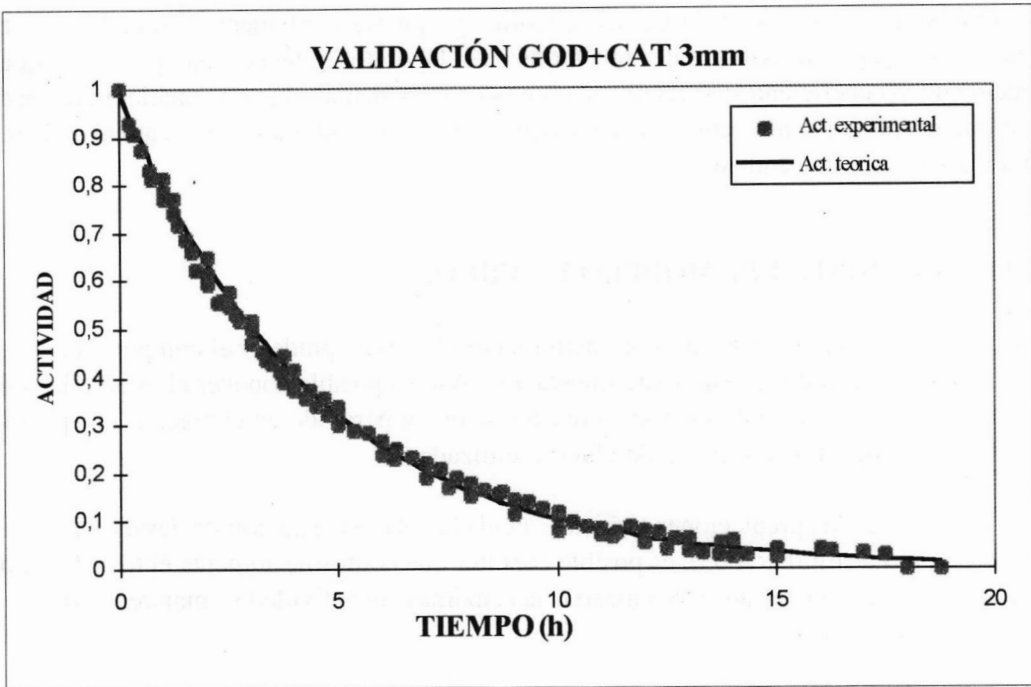


FIGURA 63. Representación de la actividad, obtenida experimentalmente y con la ecuación teórica propuesta, frente a tiempo para los datos de GOD+ CAT en partículas de 3mm de diámetro.

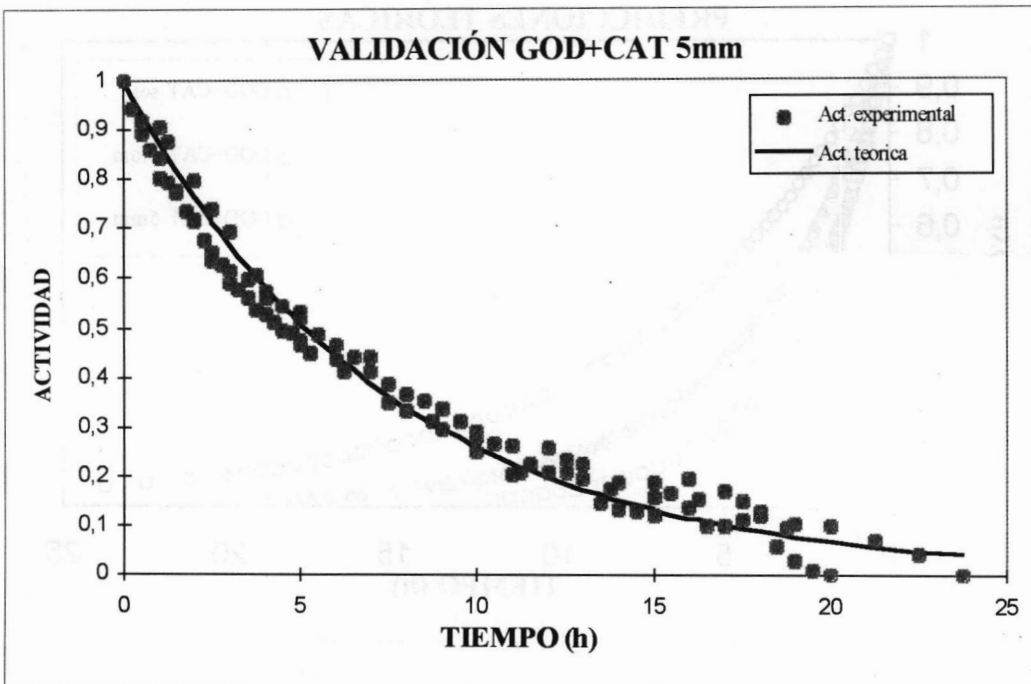


FIGURA 64. Representación de la actividad, obtenida experimentalmente y con la ecuación teórica propuesta, frente a tiempo para los datos de GOD+ CAT en partículas de 5mm de diámetro.

Como se puede observar, la ecuación teórica propuesta ciertamente responde a las tendencias seguidas por los datos reales obtenidos en el laboratorio. Se constata por tanto, que en la medida de los coeficientes de regresión obtenidos se tienen ajustes matemáticos adecuados. Además conceptualmente se consiguen aproximaciones excelentes a la cinética real de la reacción de desactivación estudiada.

4.7. PREDICCIONES DEL MODELO TEÓRICO.

El modelo teórico propuesto es un instrumento ideal para predecir el comportamiento del sistema sin necesidad de realizar experimentación. Así, es posible conocer el estado de actividad para cualquier instante de tiempo y concentración de peróxido en el reactor, independientemente de la concentración inicial de glucosa utilizada.

Si se observan las predicciones teóricas calculadas para la ecuación de desactivación irreversible propuesta (FIGURA 65), es posible concluir que conforme aumenta el tamaño de partícula en la que se encuentran inmovilizadas las enzimas, su actividad se mantiene durante un período de tiempo mayor.

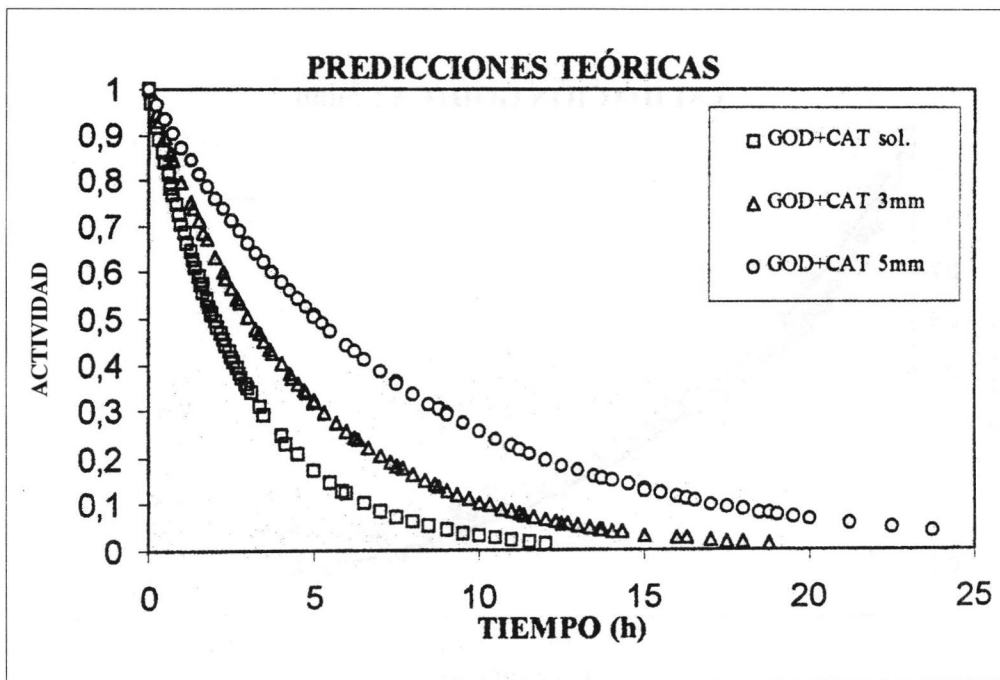


FIGURA 65. Predicciones teóricas para el sistema GOD y CAT en solución y en partículas de alginato cálcico de 3 y 5 mm.

Concretamente la ecuación correspondiente a GOD y CAT en solución predice una desactivación total del sistema enzimático a las 12 horas, si bien a partir de las 5 horas de proceso la actividad es ya irrelevante. Cuando se estudian las predicciones correspondientes a las partículas de 3 mm se aprecia una desactivación completa del sistema a las 19 horas, si bien se mantienen valores de actividad apreciables hasta las 10 horas de proceso. Por último cuando se utilizan partículas de 5 mm incluso a las 25 horas de proceso todavía queda actividad residual.

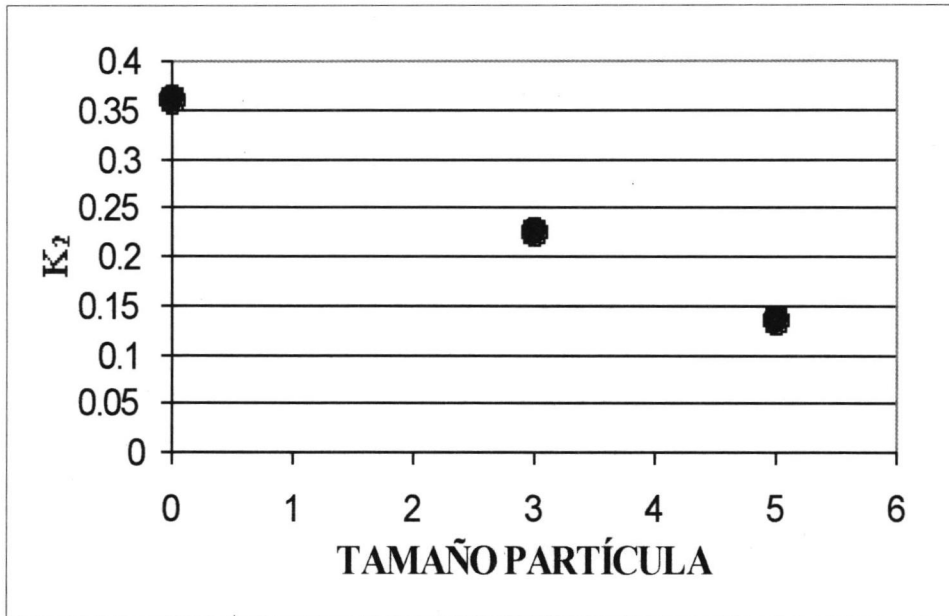


FIGURA 66. Estudio del comportamiento del parámetro k_2 de la ecuación de desactivación irreversible frente al tamaño de partícula.

Queda patente, por tanto el efecto protector del soporte alginato cálcico sobre la actividad del sistema GOD+CAT, haciéndose más importante cuanto mayor es el tamaño de las partículas. En este sentido si se observan los valores de los coeficientes ajustados para cada tipo de experimentación (TABLA 11) puede observarse que realmente el efecto estabilizador del soporte influye fundamentalmente sobre el coeficiente cinético k_2 de la ecuación de desactivación. De hecho, puede comprobarse que el incremento en el tamaño de partícula influye en forma lineal sobre el valor de dicho parámetro. La ecuación de la recta que ajusta los datos es:

$$k_2 = -0,0452 (T.P.) + 0,3614$$

$$r^2 = 0,9995$$

5. CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado que el tiempo de operación y la concentración de peróxido de hidrógeno en el medio de reacción son los factores clave en la cinética de desactivación de glucosa oxidasa y catalasa en discontinuo.
2. El alginato se confirma como un soporte adecuado para la inmovilización de glucosa oxidasa y catalasa, mostrando un efecto protector cuanto mayor es el diámetro de las partículas.
3. Se ha realizado un modelado empírico de tipo polinómico que permite apreciar el bajo peso de los efectos sinérgicos de tipo tiempo-peróxido y, resalta el elevado peso de los términos de tiempo frente a los términos de concentración de peróxido, lográndose elevados coeficientes de regresión.
4. Se propone un modelo de desactivación irreversible del sistema enzimático glucosa oxidasa y catalasa en el que se refleja de forma clara la influencia del diámetro de las partículas de alginato en el coeficiente cinético k_2 . Con valores de $0,3618 \text{ h}^{-1}$ en solución, $0,2249 \text{ h}^{-1}$ en partículas de 3mm y $0,1359 \text{ h}^{-1}$ en partículas de 5mm.
5. El modelo de desactivación enzimática, una vez validado, permite sin necesidad de realizar experimentación, conocer el comportamiento futuro del reactor así como realizar un análisis de sus posibles alternativas de operación.
6. El reactor discontinuo diseñado, con glucosa oxidasa y catalasa inmovilizadas en partículas de alginato, ha mostrado ser adecuado y mantener actividad durante al menos 25 horas de proceso. Por lo cual se presenta prometedora su aplicación a escala industrial o semiindustrial evitando, al menos parcialmente, los problemas derivados de las fermentaciones con *Aspergillus niger*.

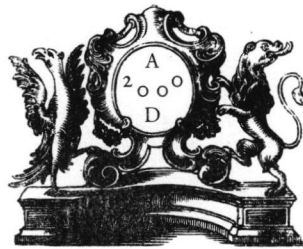
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, N.; Nemsock, J. y Szajani, B. "Application of immobilized glucose oxidase-peroxidase system for the determination of glucose in fish blood sera". *Intern. J. Anal. Chem.*, 50, 53-61 (1993).
- Akertek, E. y Tarhan, L. "Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H2O2". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 50, 291-303 (1995).
- Atkinson, B. y Lester, D.E. "An enzyme rate equation for the overall rate reaction of gel-immobilized glucose oxidase particles under buffered conditions. I. Pseudo-one substrate conditions" *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1299-1305 (1974).
- Atkinson, B. y Mavituna, F. "Biochemical engineering and biotechnology handbook". M Stockton Press, New York (1987).
- Bailey, J.E. y Ollis, D.F. "Biochemical engineering fundamentals". Mc. Graw-Hill Book Company, Singapore (1986).
- Bélanger, D.; Brassard, E. y Fortier, G. "Enhancement of response by incorporation of platinum micro-particles into polypyrrole glucose oxidase electrode". *Anal. Chim. Acta*, 228, 311-315, (1990).
- Bélanger, D.; Nadreau, J. y Fortier, G. "Rotating Ring-Disk electrode studies of polypyrrole glucose oxidase biosensors". *Electroanalysis*, 4, 933-940 (1992).
- Bélanger, D.; Nadreau, J. y Fortier, G. "Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode". *J. Electroanal. Chem.*, 274, 143-155, (1989).
- Bergmeyer, P. "Methods of Enzymatic Analysis", 2ª ed., 1, Academic Press (1974).
- Bódalo, A.; Gómez, J.L.; Gómez, E.; Bastida, J. y Máximo, M.F. "Estimación de factores de eficacia en sistemas enzimáticos heterogéneos bisustrato. Consideración de las limitaciones difusionales externas e internas". *Afinidad*, 46, 479-483 (1989).
- Boltz, D.F. y Howell, J.A. "Colorimetric determination of nonmetals". 2ª ed. John Wiley and Sons. New York (1978).
- Braun, S.; Shtelzer, S.; Rappoport, S.; Avnir, D. y Ottolenghi, M. "Biocatalysis by sol-gel entrapped enzymes". *6th International Workshop on Glasses and Ceramics from Gels*, 10, 1-12, (1992).
- Brett, A.M.; Gil, M.H.; Piedade, A.P. "An electrochemical bienzyme membrane sensor for free cholesterol". *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 28, 105-115 (1992).
- Brinker, C.J. y Scherer, G.W. "Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing". Ed. Academic Press, Inc, San Diego (1990).
- Brock, T. y Madigan T. "Biology of Microorganisms". Ed. Pentice-Hall International Editions. United States (1991).
- Bu'lock, J. y Kristiansen, B. "Biotecnología básica". Ed. Acribia S.A. (1991).
- Carvalho, L.B.; Melo, E. "Glucose oxidase immobilized on gel beads polyacrylamide and polyethyleneterphtalate". *Arg. Biol. Technol.*, 29, 525-531 (1986).
- Centonze, D.; Guerrieri, A.; Malitesta, C. y Palmisano, F. "Interference-free glucose sensor based on glucose-oxidase immobilized in an overoxidized non-conducting polypyrrole film". *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 324, 729-733 (1992).
- César Pérez. "Econometría y análisis estadístico multivariable con STATGRAPHICS. Técnicas avanzadas". Ed. ra-ma. Barcelona (1996).
- Dalvie, S.K. y Baltus, R.E. "Distribution of immobilized enzymes on porous membranes". *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 1173-1180 (1992).
- Demidowitsch, B.P; Maron, I.A. y Schuwalowa, E.S. "Métodos Numéricos de Análisis", Ed. Paraninfo, Madrid (1980).

- Dixon, M. y Webb, E.C. "Enzymes". Longman Group Limited, London (1979).
- Do, D.D. y Hossain, Md.M. "A new method to determine active enzyme distribution, effective diffusivity, rate constant for main reaction and rate constant for deactivation". *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 545-551 (1987).
- Fortier, G.; Bélanger, D. "Characterization of the biochemical behavior of glucose oxidase entrapped in a polypyrrole film". *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 854-858 (1991).
- Fortier, G.; Brassard, E. y Bélanger, D. "Biosensor technology. Fundamentals and applications". Marcel Dekker, Inc, New York, (1991).
- Fortier, G.; Brassard, E. y Bélanger, D. "Optimization of a polypyrrole glucose oxidase biosensor". *Biosens. and Bioelectronics*, 5, 473-490, (1990).
- Gacesa, P. y Hubble, J. "Tecnología de las enzimas". Ed. Acribia, S.A., Zaragoza (1990).
- Gemeiner, P. "Enzyme Engineering. Immobilized Biosystems". Ed. Ellis Horwood, New York (1992).
- George, P. "Reaction between catalase and hydrogen peroxide". *Nature*, 160, 41-43 (1947).
- Gerhartz, W. "Enzymes in Industry. Production and Applications". Ed. VCH, Weinheim (1990).
- Gonçalves, A.; Martins, M.B. "Analytical use of immobilized glucose oxidase. Kinetic and operational studies". *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 27, 139-143 (1991).
- Greenough, K.R.; Skillen, A.W. y McNeil, C.J. "Potential glucose sensor for perioperative blood glucose control in diabetes mellitus". *Biosens. Bioelectronics*, 9, 23-28 (1994).
- Hoshino, K.; Muramatsu, N. "A study on the thermostability of microencapsulated glucose oxidase". *J. Microencapsulation*, 6, 205-211 (1993).
- Hossain, M.M. y Do, D.D. "Fundamental studies of glucose oxidase immobilization on controlled pore glass". *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 842-851 (1985).
- Hossain, M.M. y Do, D.D. "Determination of intraparticle immobilized enzyme distribution under moderate diffusion conditions". *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 743-747 (1992).
- Hulst, A.C.; Hens, H.J.H.; Buitelaar, R.M. y Tramper, J. "Determination of the effective diffusion coefficient of oxygen in gel materials in relation to gel concentration". *Biotechnol. Techn.*, 3, 199-204 (1989).
- Jiang, B. y Zhang, I. "Immobilization of catalase on crosslinked polymeric hydrogels-effect of anion on the activity of immobilized enzyme". *Eur. Polym. J.*, 29, 1251-1254 (1993).
- Jirstein, D.; Mueller, H.G.; Seidel, S. y Schueleke, U. "Enzyme immobilization on metal ion-containing insoluble carriers". (Cl. C12N11/00), (1992).
- Jones, P. y Wynne-Jones, W.F.K. "Mechanism of catalase action". *Trans. Faraday Soc.*, 58, 1148-1158 (1962).
- Kennedy, J.F. y Melo, E.H.M. "Immobilized enzymes and cells". *Chem. Eng. Prog.*, 81-89 (1990).
- Kierstan, M.; Bucke, C. "The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels". *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 387-392 (1977).
- Klein, J.; Kressdorf, B. "Proceedings of the 3rd European Congress on Biotechnology (vol.2.)". Ed. Elsevier, 375-379 (1985).
- Koopal, C.G.J. y Nolte, R.J.M. "Highly stable first generation biosensor for glucose utilizing latex particles as the enzyme-immobilizing matrix". *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 402-408 (1994).
- Kozhukharova, A.; Kirova, N.; Popova, I.; Batsalova, K. y Kunchev, K. "Properties of glucose oxidase immobilized gel of polyvinylalcohol". *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 245-248 (1988).
- Krusteva, M. e Iotova, L. "Multienzyme membranes for biosensors". *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 54, 13-18 (1992).
- Kurokawa, Y. y Ohta, H. "Preparation of cellulose-hydrous titanium oxide composite fiber entrapped with glucose oxidase". *Biotechnol. Techn.*, 7, 5-8 (1993).
- Lee, S.B.; Kim, S.M. y Ryu, D.D. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 2023-2025 (1979) en Smidsrfd, O.; Skjåk-Bræk, G. "Alginate as immobilization matrix for cells", *TIBTECH*, 8,71-78 (1990).
- Lehninger, A.L. "Bioquímica". Ed. Omega, S.A. Barcelona (1989).

- Leng, K.L.; Joshi, S. y Yamazaki, H. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 5 (1983) en Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk, G. "Alginate as immobilization matrix for cells", *TIBTECH*, 8, 71-78 (1990).
- Lodish, H.; Baltimore, D. y Darnell, J. "Biología Celular y molecular". Ed. Labor, S.A. Madrid (1986).
- Marolia, K.Z. y D'Souza, S.F. "Removal of glucose from hen egg using glucose oxidase and catalase co-immobilized in hen egg white foam matrix". *J. Food Sci. Technol.*, 31, 153-155 (1994).
- Marquardt, D.W. "An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters" *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, 11, 431-441 (1963).
- Martinsen, A.; Skjåk-Bræk, G.; Smidsrød, O. "Alginate as immobilization material:I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads". *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 79-89 (1989).
- Martinsen, A.; Storr, I.; Skjåk-Bræk, G. "Alginate as immobilization material:III. Difusional properties". *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 186-194 (1992).
- Masuda, H.; Mizuno, T.; Baba, N. y Ohmori, T. "Fabrication of Pt microporous electrodes from anodic porous alumina and immobilization of GOD into their micropores". *J. Electroanal. Chem.*, 368, 333-336 (1994).
- Masuda, H.; Nishio, K. y Baba, N. "Preparation of microporous metal membranes by two-step replication of the microstructure of anodic alumina". *Thin Solid Films*, 223, 1-3 (1993).
- Matuszewski, W.; Trojanowicz, M.; Lewenstam, A.; Moszczynska, A. y Lange-Moroz, E. "Amperometric glucose biosensor for undiluted whole blood analysis". *Analytical Sci.*, 10, 423-428 (1994).
- McLaren, A.D. y Packer, L. "Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology" 33, 245-308. J. Wiley, New York (1970).
- Means, G.E. y Feeney, R.E. "Chemical Modification of Proteins". Ed. Holden Day, San Francisco (1971).
- Mercer, D.G. y O'Driscoll, K.F. "Kinetic modelling of a multiple immobilized enzyme system. I. Development and testing of the model". *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2447-2464 (1981).
- Messing, R.A. "Simultaneously immobilized glucose oxidase and catalase in controlled-pore titania". *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 897-908 (1974).
- Mikkelsen, S.R.; Lennox, R.B. "Rotating disc electrode characterization of immobilized glucose oxidase". *Analytical Chem.*, 195, 358-363 (1991).
- Miller, G.L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chem.*, 31, 426-428 (1959).
- Murakami, I.; Suda, M.; Yokoyama, K.; Takeuchi, T.; Tamiya, E. y Karube, I. "Micromachined enzyme reactor for FIA system". *Microchem. J.* 49, 319-325 (1994).
- Nakao, K.; Masuhara, K.; Uda, M. y Oosaki, K. "Manufacture of gluconic acid by enzyme oxidation catalysts". (*CI.C12P7/42*), (1994).
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Desiderio, B.; Marzullo, L.; Giamberini, M. y Sanna, G. "A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: application to a fungal phenol oxidase". *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 151-158 (1994).
- Parker, J.W.; Schwartz, C.S. "Modelling the kinetics of immobilized glucose oxidase". *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 724-735 (1987).
- Rhispon, J.; Shabtai, I.; Rosen, I.; Zibenberg, I.; Tor, R. y Freeman, A. "In situ glucose monitoring in fermentation broth by "Sandwiched" glucose-oxidase electrode (SGE)". *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 103-107 (1990).
- Röhr, M.; Kubicek, C.P. y Kominek, J. "Biotechnology". Capítulo 3. Ed. Rehm, H.J. y Reed, G. Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1983).
- Romero, L.E. "Estudio cinético del comportamiento de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa co-inmovilizadas en alginato. Operación en reactores TAC". TESIS DOCTORAL. Cádiz (1996).
- Romero, L.E.; Macias, M.; Caro, I.; Cantero, D. "Equipo modular de adquisición y control. Aplicación a reacciones enzimáticas". *Ingeniería Química*, 11, 171-174 (1997).
- Romero, M.D.; Romero, L.E. y Cantero D. "Efecto protector en catálisis enzimática: sistema glucosa oxidasa-catalasa". *Ingeniería Química*, 5, 219-221 (1998).
- Romero, L.E.; Cantero, D. "Utilización de técnicas de simulación en biocatálisis: aplicación al sistema glucosa oxidasa-catalasa". *Ingeniería Química* (ACEPTADO 1998).

- Romero L.E.; Macías M. y Cantero D. "Desarrollo de simuladores en biocatálisis. Estudio del sistema bi-enzimático glucosa oxidasa-catalasa". Comunicación a Congreso: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CATÁLISIS. Jaca (1997).
- Romero, M.D.; Romero, L.E. y Cantero, D. "Desactivación del sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa. Operación en reactor discontinuo". Comunicación a Congreso: 26 REUNIÓN BIENAL DE LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA. Cádiz (1997).
- Romero, L.E. y Cantero, D. "Study of the deactivation process of the glucose oxidase-catalase enzymatic system by means of simulation". Stability and Stabilization of biocatalysts. Córdoba (1998). CAPITULO DE LIBRO: Ed- Elsevier book series "Progress in Biotechnology".
- Schacht, E. y Vandichel, J.C. "Pesticides: Food and environmental implications. Proceedings of an International Symposium on Changing Perspectives in Agrochemicals". Vienna, (1988).
- Segel, I.H. "Enzyme kinetics". John Wiley & Sons, New York (1986).
- Selli, E.; D'Ambrosio, A. y Bellobono, I.R. "Enzymatic activity under tangential flow conditions of photochemically grafted membranes containing immobilized catalase". *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 474-478 (1993).
- Sitton, O.C. y Gaddy, J.L. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1735 (1980) en Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk, G. "Alginate as immobilization matrix for cells", *TIBTECH*, 8, 71-78 (1990).
- Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk, G. "Alginate as immobilization matrix for cells", *TIBTECH*, 8, 71-78 (1990).
- Smith, J. M. "Ingeniería de la Cinética Química". Compañía Editorial Intercontinental, S.A. México (1977).
- Solas, M.T.; Vicente, C.; Xavier, L.; Legaz, M.E. "Ionic adsorption of catalase on bioskin: Kinetic and ultrastructural". *J. Biotechnol.*, 33, 63-70 (1994).
- Srere, P.A. y Uyeda, K. "Methods in Enzymology", 44, 11-19, Ed. Academic Press, New York (1976).
- Statistical graphics corporation. "STATGRAPHICS User Manual (v.6.0)". United States (1986).
- Tarhan, L. y Telefoncu, A. "Effect of enzyme ratio on the properties of glucose oxidase and catalase immobilized on modified perlite". *Process. Biochem.*, 27, 11-15 (1992).
- Tarhan, L. y Uslan, A.H. "Descomposition of immobilized hydrogen peroxide with immobilized catalase in acrylamide gel". *J. Fac. Sci., Eng. Univ., Ser. 14*, 11-17 (1991).
- Tarhan, L. "Some kinetic parameters and inactivation of catalase immobilized on modified polyvinylalcohol". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 31, 109-117 (1991).
- Tarhan, L. "Properties of immobilized glucose oxidase-catalase and their operational stability in fluid bed reactors". *J. Fac. Sci., Eng. Univ., Ser., 14*, 19-27 (1991).
- Tatsuma, T.; Saito, K. y Oyama, N. "Enzyme electrodes mediated by a thermoshinking redox polymer". *Analytical Chem.*, 66, 1002-1006 (1994).
- Tatsuma, T.; Saito, K. y Oyama, N. "Enzyme-exchangeable enzyme electrodes employing a thermoshinking redox gel". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1853-1854 (1994).
- Thompson, R.Q. y Kim, H. "Flow kinetics of nylon open-tubular and beaded immobilized glucose oxidase reactors". *Biochem. Biophys. Acta*, 964 116-120 (1988).
- Tse, H.S.P. y Gough, D.A. "Time-dependent inactivation of immobilized glucose oxidase and catalase". *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 705-713 (1987).
- Tse, H.S.P.; Leypoldt, J.K.; Gough, D.A. "Determination of the intrinsic kinetic constants of immobilized glucose oxidase and catalase". *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 696-704 (1987).
- Vasudevan, P.T. y Thakur, D.S. "Soluble and immobilized catalase. Effect of pressure and inhibition on kinetics and deactivation". *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 49, 173-89 (1994).
- Vasudevan, P.T. y Weiland, R.H. "Deactivation of catalase by hydrogen peroxide". *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 783-789 (1990).
- Wiseman, A. "Manual de biotecnología de los enzimas". Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (1991).
- Wu, J. y Weng, H. "Transient response methods for evaluating the rate constants of reactions over immobilized enzymes". *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 922-926 (1990).
- Yamanaka, S.A.; Nishida, F.; Ellerby, L.M.; Nishida, C.R.; Dunn, B.; Valentine, J.S. y Zink, J.I. "Enzymatic activity of glucose oxidase encapsulated in transparent glass by the sol-gel method". *Chem. of Materials*, 4, 495-497, (1992).



*Este libro se terminó de componer el día 6 de septiembre,
fiesta de Santo Tomás Moro, quien, siendo lord canceller
de Inglaterra, atestiguó la libertad de la conciencia
y la honestidad de la función pública*



SERVICIO DE PUBLICACIONES
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

ISBN 84-7786-678-3



9 788477 866787