
DESARROLLO DE BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y AMBIENTAL

Presenta:

Mg. YULY ANDREA RAMÍREZ TAPIAS

Para optar al grado de

Doctora en Ciencia y Tecnología

Departamento de Ciencia y Tecnología

Doctorado en Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

Director:

Dr. Jorge Abel Trelles

Co-directora:

Dra. Cintia Wanda Rivero

Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología Sustentable

LIBioS, Universidad Nacional de Quilmes

Consejera de estudios:

Dra. Alejandra Zinni

Quilmes – Argentina, marzo de 2018





*Un amor que no se deja percibir más allá de la declamación,
no está.*

¿Se puede ocultar un arcoiris?

¿Se puede ocultar un incendio?

Marcelo Barros

CONTENIDO

Prólogo	9
Producción bibliográfica.....	12
Congresos y reuniones científicas	13
Resumen.....	14
Abstract	16
Introducción	18
Objetivos	24
General.....	24
Específicos	24
Marco conceptual	25
Enzimas pectinolíticas: generalidades.....	25
Poligalacturonasas (PG).....	25
Pectato liasas (PGL)	25
Pectin liasas (PL).....	26
Pectin metilesterasas (PME).....	26
El sustrato: compuestos pécticos.....	27
Poligalacturonasas	28
Mecanismo de acción.....	28
Fuentes naturales.....	30
Bacterias productoras	31
Regulación de la expresión enzimática	35
a. Inducción	36
b. Represión catabólica	37
c. Sistema de secreción enzimática.....	38
Procesos de recuperación y purificación de PG	39
Inmovilización enzimática	42
Formación de agregados	43
Unión a soportes	45
Atrapamiento	47
Matrices mixtas.....	51

Propiedades de los materiales	53
Biorreactores enzimáticos y escalado	55
a. Tanque agitado.....	56
b. Reactor de membrana.....	57
c. Reactor de lecho empacado.....	57
d. Reactor de lecho percolado	57
e. Reactor de lecho fluidizado.....	58
Consideraciones de proceso	58
Escalado.....	59
Aplicaciones: Biotatálisis con enzimas pectinolíticas	60
Metodología	62
1. Fermentación	63
<i>Screening</i>	63
Cuantificación de actividad enzimática.....	65
<i>Streptomyces halstedii</i> ATCC 10897, condiciones de fermentación y diseño de medio de cultivo	66
2. Aislamiento de la enzima	68
Precipitación con sulfato de amonio.....	68
Ultrafiltración	68
Caracterización de la enzima libre	69
Análisis de productos de la reacción.....	70
3. Inmovilización y biocatálisis	70
Unión a soportes	70
a. Glioxil-agarosa	71
b. MANAE-agarosa.....	71
c. PEI-agarosa	71
Atrapamiento	72
a. Alginato.....	72
b. Agares.....	73
Matrices mixtas	75
a. Agar-poliacrilamida.....	75
b. Agar-nanoarcillas	75

Cinética enzimática	75
Pruebas reológicas	76
Parámetros biocatalíticos.....	76
a. Reusabilidad	76
b. Estabilidad de almacenamiento	76
4. Aplicaciones y escalado.....	77
Alimentos y ambiente	78
a. Efluente de producción de papel.....	78
b. Clarificación de jugos.....	78
c. Sacarificación de residuos frutihortícolas.....	78
Escalado a biorreactor de lecho percolado.....	79
Análisis estadístico	82
Resultados y discusión	83
1. Fermentación	83
<i>Screening</i> de cepas bacterianas con potencial actividad poligalacturonasa	83
<i>Streptomyces halstedii</i> ATCC 10897, condiciones de fermentación y diseño de medio de cultivo.....	87
Conclusión parcial	96
2. Aislamiento de la enzima	96
Proceso de purificación y tamaño molecular.....	96
Efectos de la temperatura y el pH en la actividad enzimática	99
Estabilidad enzimática: Efecto de iones y solventes.....	101
Cinética enzimática	103
Cromatografía de capa fina.....	104
Diagrama de Proceso: obtención y recuperación de PG producida por <i>S. halstedii</i> 10897....	105
Conclusión parcial	106
3. Inmovilización y biocatálisis	107
Unión a soportes	107
Selección del soporte	107
Diseño y optimización del biocatalizador en glioxil-agarosa	109
Cinética enzimática: biocatalizador glioxil-agarosa con actividad PG.....	113
Estabilidad y reusabilidad del biocatalizador glioxil-agarosa.....	114

Atrapamiento	116
Matrices de alginato.....	116
a. Selección del biocatalizador: PG de <i>Streptomyces sp.</i> en alginato de sodio	116
b. Tiempo de gelificación ionotrópica	117
c. Diseño y optimización del biocatalizador en alginato	119
d. Cinética enzimática: biocatalizador en alginato con actividad PG	123
e. Estabilidad y reusabilidad del biocatalizador en alginato.....	124
Matrices de agar.....	125
a. Selección del termogel	125
b. Estabilización de la matriz por adición de cationes.....	127
c. Diseño y optimización del biocatalizador en agar bacteriológico	129
d. Cinética enzimática: biocatalizador en agar bacteriológico con actividad PG.....	131
e. Estabilidad y reusabilidad del biocatalizador en matrices de agar bacteriológico	133
Matrices Mixtas.....	135
a. Agar-poliacrilamida.....	135
b. Agar-nanoarcillas	137
Selección del sistema biocatalítico.....	139
Conclusión parcial	140
4. Aplicaciones y escalado.....	141
Tratamiento de aguas	141
Clarificación de jugos	142
Sacarificación de albedo de naranja	144
Diseño de biorreactor enzimático.....	146
a. Diseño de biorreactor de lecho percolado	146
b. Tratamiento de residuos de pera y pepino	152
Conclusión parcial	153
Lista de abreviaturas	154
Conclusiones generales.....	155
Bibliografía	158

PRÓLOGO

Una tesis doctoral reporta avances científicos y tecnológicos de novedad e impacto para la comunidad. Para cumplir este propósito nos embarcamos en una experiencia con pretensiones de conocimiento, el cual deberá ser respaldado por un título para tener validez en el contexto académico. Al llegar a este momento, en el que todo el proceso se condensa en el presente informe y en el que la obtención del título es aquello que por su valor simbólico suele llenar de satisfacción, me resulta imperativo expresar –así parezca obvio-, que estos cinco años de estudio de doctorado me condujeron a otras reflexiones tan necesarias y valiosas como las científicas, porque atravesaron profundamente mi condición como ciudadana y me llevaron a problematizar asuntos de la cultura y la historia de América Latina, a llenar de argumentos la crítica y a desarrollar habilidades para identificar, comprender y regular emociones propias a la luz de las diferentes dificultades que iban surgiendo en cada curva del camino.

En el momento en el que decidí enfrentarme a este reto tenía una motivación personal por comprender la manera como las enzimas hidrolíticas de diferentes polisacáridos podían usarse en el procesamiento de frutas y verduras, disminuir la cantidad de residuos vegetales o aprovechar estos desechos para producir otros azúcares útiles y convertirlos en productos con valor agregado. Sin embargo, durante el camino del ejercicio académico descubrí que también se trataba de una instancia de aprendizaje para forjar el carácter como mujer científica en un mundo en el que aún tenemos muchos caminos por allanar y espacios por conquistar. Lo que inició con una pregunta de investigación fundada por la curiosidad y un bagaje técnico someramente conocido, continuó con una profundización del tema hasta niveles moleculares, y empecé a dilucidar respuestas que me permitirían proponer algunas aplicaciones tecnológicas. Finalmente, el presente trabajo de Tesis Doctoral realizado en el Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología Sustentable lo escribí con la consciencia y rigurosidad que implica el desarrollo del método científico y la responsabilidad social de devolverle a la comunidad el producto de estos años de formación auspiciados por el Estado Argentino. El resultado no es sólo este texto que estoy presentando sino también un recurso humano, una investigadora que a pesar de las movidas políticas que desfavorecen los avances científicos, desea continuar en su labor académica, tanto en las aulas de clase con jóvenes que inician su formación profesional como en el laboratorio, experimentando y descubriendo el potencial de los microorganismos y su maquinaria metabólica para la obtención de bioproductos.

Mi formación doctoral finaliza aquí y se trata de un umbral donde al mirar hacia atrás gozo de la satisfacción de haber experimentado situaciones de alegría, frustración, retos, entusiasmo, dificultades, debilidad y la nostalgia de tener mi familia a una distancia de kilómetros, separados por selvas, planicies, ríos sinuosos y una imponente cordillera que, a pesar de lo escabrosa, nos conecta de norte a sur. Ahora miro hacia adelante y el sentimiento de gratitud es inmenso, doy gracias a la vida y a las elecciones que me trajeron a este punto.

Expreso mi agradecimiento sincero al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de Quilmes, que me permitieron dedicarme exclusivamente al doctorado; gracias al Dr. Jorge Abel Trelles y su esposa la Dra. Cintia Wanda Rivero por su guía, su especial asesoría en los temas de inmovilización enzimática y por ayudar a hacer de este informe uno más prolijo mediante una juiciosa revisión; gracias a la Dra. Claudia Britos siempre presente para atender las situaciones cotidianas del laboratorio; y a la Dra. Alejandra Zinni, mi consejera de estudios.

Gratitud hacia la Dra. Catalina Giraldo Estrada, quien fue mi mentora en mis inicios en la ciencia en el 2007 y todavía hoy hace parte de este camino, también a la Dra. Luz Deisy Marín Palacio, colega y amiga. Gracias a todos los compañeros y amigos del laboratorio por su aguante y permanente acompañamiento, gracias por sus palabras de aliento y por la amistad; cada uno de ustedes, Valeria, Eliana, Andrea, María José, Andrés, Alejandro, Hugo, Matías, Agustina, Mariana, Aldana, Julián, Iván y Antonella, conforman una diversidad extraordinaria, de todos aprendí acerca de la humanidad que somos, del amor, la compasión y de la importancia de sentirnos un grupo. A los chicos que llegan al laboratorio y con quienes he compartido poco, espero que continúen con la motivación para transitar esta vía del conocimiento.

Gracias a mi familia en Colombia, gracias a mis hermanos Vanessa, Esteban y Pablo, por el amor, la solidaridad y la compañía. Gracias a mis mujeres, las dos Clara, Inés y Rosa, madre y abuela, las dos con el mismo ímpetu y espíritu aguerrido para hacer crecer hasta las nubes a toda una familia. Gracias a todos, los tíos, los primos, a los Tapias-Puerta y su descendencia, me hicieron sentir en casa cuando la soledad abrumaba. Gracias a la familia que me visitó en Buenos Aires, fueron momentos inolvidables que me recargaron de energía. Gratitud a los amigos en Colombia, a Astro, la prima de aventuras, a María Yanet, la incondicional, gracias por las manos. Gracias al tango, especialmente a la Academia por el baile, la música y el sentimiento... cambiamos abrazos por angustias y al final, cuerpos livianos en un diálogo armonioso. Gracias a los maestros de aquí y de allá: Daniel C., Francisco G. y Marcelo B.

Gracias a la Argentina, una patria adoptiva, la que me acogió, una patria que me duele tanto como Colombia. Los dos, países que sueño en unidad, justos y en paz.

Me llevo un saco repleto de aprendizajes, pero también de preguntas sobre las cuales aspiro seguir trabajando para contribuir -cualquiera sea el lugar que ocupe en mi comunidad- a la construcción cotidiana de esos ideales de justicia y paz. En particular, desde la ciencia, sin duda es necesario volver la mirada sobre las jerarquías categóricas y las relaciones de poder, las cuales están condicionadas por un sistema social y político que marca los lineamientos de desarrollo y avances en educación, ciencia y tecnología en un contexto local, y éstos dentro de un marco internacional ávido de productividad que pareciera condicionar la escala de valores en el ejercicio científico. Si la ciencia pretende que vivamos mejor, entonces que el *hacer ciencia* nos edifique como seres humanos y que su construcción sea una experiencia grata, desde el respeto y el interés genuino por colaborar con otros para potenciar las ideas y alegrarnos los días.

Yuly Andrea Ramírez Tapias
Diciembre de 2017

PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA

El presente trabajo de investigación para optar por el título de Doctora en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes ha dado lugar a tres publicaciones internacionales con referato:

Ramírez-Tapias, Y.A., Lapasset Laumann, A.S., Britos, C.N., Rivero, C.W., Trelles, J.A., 2017. Saccharification of citrus wastes by immobilized polygalacturonase in an improved alginate matrix. *3 Biotech* 7, 380. doi:10.1007/s13205-017-1010-4

Ramírez-Tapias, Y.A., Rivero, C.W., Gallego, F.L., Guisán, J.M., Trelles, J.A., 2016. Stabilization by multipoint covalent attachment of a biocatalyst with polygalacturonase activity used for juice clarification. *Food Chem.* 208, 252–257. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.086

Ramírez-Tapias, Y.A., Rivero, C.W., Britos, C.N., Trelles, J.A., 2015. Alkaline and thermostable polygalacturonase from *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 with applications in waste waters. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1–8. doi:10.1016/j.bcab.2014.12.004

Artículo en evaluación por comité editorial:

Ramírez-Tapias, Y.A., Giraldo-Estrada, C., Trelles, J.A. Biodegradation of vegetable residues by polygalacturonase-agar using a trickle-bed biorreactor. *Food and Bioproducts Processing*. Elsevier.

CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

Los resultados parciales de la investigación fueron presentados en reuniones científicas en temáticas específicas del área de conocimiento:

Workshop AMBIENS 2017. Revista Iberoamericana Universitaria en ambiente, sociedad y sustentabilidad. Buenos Aires, 28 al 30 de agosto de 2017. Ponencia oral: *Enzimas hidrolíticas, tecnología para el aprovechamiento de subproductos frutihortícolas para el desarrollo de productos con valor agregado*. Ramírez-Tapias, YA; Lapasset-Laumann, AS; Trelles, JA.

XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Mar del Plata, 18 al 20 de septiembre de 2017. Ponencia oral: *Clarificación de jugos de fruta mediante biocatalizadores estabilizados por unión covalente en glioxil-agar*. Ramírez-Tapias, YA; Rivero, CW; Trelles, JA. Poster: *Degradación de subproductos frutihortícolas empleando biocatalizadores inmovilizados*. Ramírez-Tapias, YA; Trelles, JA.

LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, SAIB. Córdoba, 7 al 10 de noviembre de 2016. Poster: *Heterogeneous biocatalyst by hydrogel entrapment for pectin hydrolysis of vegetable residues*. Ramírez-Tapias, YA; Lapasset-Laumann, AS; Britos, CN; Trelles, JA. BIOCELL 40 (Suppl.1) 2016

LI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, SAIB. Mar del Plata, 3 al 6 de noviembre de 2015. Ponencia oral: *Development of immobilized biocatalyst with polygalacturonase activity for juice clarification*. Ramírez-Tapias, YA; Rivero, CW; Britos, CN; Trelles, JA. BIOCELL 39 (Suppl. 2) 2015

X Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE 2014. Mar del Plata, 2 al 4 de julio de 2014. Ponencia oral: *Screening of Bacterial Polygalacturonases with alkalophilic activity and its potential use in Environmental Industry*. Ramírez-Tapias, YA; Rivero, CW; Britos, CN; Trelles, JA.

RESUMEN

La tecnología enzimática es un pilar fundamental de la biotecnología industrial, su propósito es el diseño y desarrollo de nuevos productos y procesos en un marco de sustentabilidad, partiendo de la aplicación de enzimas como agentes catalíticos, aplicados en diversos procesos industriales del sector energético, textil, farmacéutico y los diferentes segmentos de la industria de alimentos. En este sentido, la inmovilización enzimática se basa en asociar el biocatalizador a un soporte o matriz insoluble para obtener un sistema heterogéneo de reacción y que el biocatalizador pueda ser reusado en reacciones sucesivas bajo condiciones fisicoquímicas que le preserven la estabilidad.

En el presente trabajo se propone el desarrollo de un biocatalizador inmovilizado con actividad poligalacturonasa para su utilización en industria de alimentos para la clarificación de jugos de fruta y en procesos de remediación ambiental para la degradación de subproductos frutihortícolas. El diseño del bioproceso incluyó la selección del microorganismo con mayor actividad enzimática, la optimización de las condiciones de fermentación y formulación de medio de cultivo, la inmovilización enzimática que permitiera máxima actividad y estabilidad catalítica y el diseño del biorreactor para su aplicación en clarificación de jugos y tratamiento de residuos.

Mediante técnicas de *screening* de diferentes cepas bacterianas, se seleccionó a *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 por su elevada producción extracelular de la enzima de interés. El cultivo celular a escala de matraz se optimizó en cuanto a condiciones de pH, agitación, temperatura y condiciones nutricionales, específicamente de fuente de carbono y nitrógeno orgánico. La productividad del cultivo permitió cosechar a tiempos cortos, se propuso una ruta de recuperación y purificación de la proteína mediante técnicas de precipitación por salado y ultrafiltración, el estudio de las características bioquímicas de la poligalacturonasa sugiere una estructura monomérica con peso molecular aproximado de 48 kDa, características de estabilidad a diferentes condiciones térmicas y en un amplio rango de pH en la región alcalina, así como tolerancia a solventes orgánicos y estrés iónico. La inmovilización enzimática por unión covalente al soporte glioxil-agarosa, permitió obtener un biocatalizador que permitió altos rendimientos en la reacción y con elevada estabilidad. El atrapamiento de la poligalacturonasa en matrices poliméricas resultó en un biocatalizador con mejores propiedades cinéticas.

Se diseñó un biorreactor de lecho percolado empacado con el biocatalizador heterogéneo inmovilizado en partículas de agar bacteriológico, se determinaron mínimas barreras

difusionales para la reacción en el biorreactor y éste fue aplicado para la hidrólisis de pectina presente en residuos frutihortícolas.

Finalmente, en el presente trabajo se propone un diseño de un bioproceso para el desarrollo de biocatalizadores con actividad poligalacturonasa para la hidrólisis enzimática de compuestos pécticos y su aplicación en procesos de industria alimentaria y ambiental.

Palabras clave: Poligalacturonasa – *Streptomyces halstedii* – Hidrólisis – Pectina – Ácido D-galacturónico – Reducción de viscosidad – Lecho empacado – Reacción heterogénea.

ABSTRACT

Enzymatic technology plays a key role in Industrial Biotechnology. The aim of this technology is to design and develop new products and sustainable processes using enzymes as biocatalyst in several industrial processes such as energetics, textile, pharmaceutical and in different sections of food industry. In this sense, enzymatic immobilization is based on the association of biocatalyst to a support or an insoluble matrix to obtain an heterogeneous reaction system. This allows the biocatalyst to be reused in successive reactions under physicochemical conditions that preserved stability.

In the present work, the development of an immobilized biocatalyst with polygalacturonase activity is proposed to be used in food industry for clarification of fruit juices and in environmental processes of remediation for degradation of agro-wastes. The design of the bioprocess included the selection of microorganism with the best enzymatic activity, optimization of fermentation conditions, culture medium formulation and enzymatic immobilization that allows maximum activity and catalytic stability. Finally, a bioreactor to be applied in juice clarification and in wastes treatment was designed.

By screening techniques of different bacterial strains, *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 was selected due to the high extracellular production of the interest enzyme. Cell culture conditions in a flask scale were optimized such as pH, agitation, temperature and nutritional conditions, specially the organic carbon and nitrogen source. Culture productivity permitted to harvest at short times, a route for recovery and purification of the enzymes protein was proposed by precipitation with salts and ultrafiltration techniques. The study of the biochemical characteristics of polygalacturonase suggested a monomeric structure of 48 KDa, stability at different temperature conditions and in wide range of alkaline pH, tolerance to organic solvents and ionic stress. While enzymatic immobilization by covalent attachment to the glyoxyl-agarose support allowed the obtention of a stable biocatalyst with high conversion yields, immobilization by entrapment in polymeric matrices resulted in a biocatalyst with better kinetic properties.

A trickle bed bioreactor was designed and the bed was packed with the heterogeneous biocatalyst immobilized in bacteriological agar particles. Minimal diffusional barriers were determined for the reaction in the bioreactor and it was applied for the hydrolysis of pectin present vegetable residues.

Finally, in this work the design of a bioprocess for the development of a biocatalyst with polygalacturonase activity for enzymatic hydrolysis of pectin compounds was proposed and the application to food industry and environmental processes.

Keywords: Polygalacturonase - *Streptomyces halstedii* – Hydrolysis – Pectin – Polygalacturonic acid – Viscosity reduction – Packed bed column – Heterogeneous reaction.

INTRODUCCIÓN

La biocatálisis se refiere a los mecanismos a través de los cuales se favorece la termodinámica de una reacción química para aumentar su velocidad mediante la acción de enzimas, ya sean aisladas, en una formulación específica o empleando células enteras. La condición biológica de estos agentes catalíticos indica que son parte de un sistema en la naturaleza más complejo y que involucra múltiples y simultáneas interacciones, lo cual resulta en una red de reacciones y procesos metabólicos fundamentales para el mantenimiento celular de todos los organismos vivos. En este contexto, cada enzima posee una función específica dentro de la maquinaria bioquímica de cada célula y es condicionada por diferentes factores presentes en el microambiente celular como pH, temperatura, tensión de oxígeno, tipos de iones, fuerza iónica, estrés hidrodinámico y otros. De otro lado, la síntesis enzimática ocurre en la célula viva bajo estricta regulación molecular de origen genético o como respuesta a cambios o estímulos del medio extracelular; de esta manera, las investigaciones basadas en el estudio de un sistema enzimático de interés permitirían desarrollar cultivos celulares para la producción enzimática, ya sea con microorganismos nativos o genéticamente modificados induciendo su síntesis para potenciales aplicaciones tecnológicas.

En la medida que se pueda modificar el metabolismo para provocar una producción abundante de las enzimas en la célula, se favorece su aislamiento y purificación con rendimientos aceptables para extrapolar el uso de éstas en sistemas no vivos, como es la aplicación en procesos industriales en diferentes campos como el energético, textil, farmacéutica y los diferentes segmentos de la industria de alimentos. Adicionalmente, los desarrollos tecnológicos basados en la biocatálisis orientan sus estudios a análisis funcionales para preservar, mejorar o modular la actividad catalítica de las enzimas bajo condiciones de proceso que no se asemejan al estado fisiológico y que resultan severas. Las técnicas pueden basarse en la estructura de la proteína como el diseño racional, mutagénesis y evolución dirigida, en enfoques desde la ingeniería como aplicaciones de líquidos iónicos o fluidos supercríticos y estabilización fisicoquímica como la inmovilización en diferentes tipos de soportes o matrices. La sinergia entre estas técnicas se convierte en una herramienta efectiva para la implementación de procesos de biotransformación y la síntesis de nuevos productos (Illanes *et al.*, 2012).

Existen cientos de enzimas en la naturaleza y tan sólo una fracción de las enzimas estudiadas e identificadas en los diversos procesos celulares es aplicada para el desarrollo de los productos enzimáticos disponibles en el mercado para su uso industrial. De éstas, cerca del 50% son de origen fúngico, un 35% provienen de fuentes bacterianas y el 15% restante son de origen animal y vegetal (Illanes *et al.*, 2012). La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha sistematizado la clasificación de las enzimas de acuerdo a su acción catalítica y a continuación se mencionan los seis los grupos principales: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. El primer grupo, cataliza las reacciones de oxidoreducción, el sustrato que es oxidado se reconoce como dador de hidrógeno. Las transferasas son enzimas que se encargan de transferir un grupo funcional de una molécula (dador) hacia otra (aceptor), las hidrolasas catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces glicosídicos, peptídicos, ester, fosfóricos, carbono-carbono, carbono-azufre, entre otros. El grupo de las liasas rompen enlaces mediante el mecanismo de eliminación formando en consecuencia enlaces dobles o anillos o, de manera inversa, adicionando grupos a los dobles enlaces. De otro lado, las isomerasas catalizan los cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula, y finalmente, las ligasas unen dos moléculas por formación de enlaces covalentes involucrando la hidrólisis de ATP.

Actualmente, las compañías líderes en la producción y comercialización de productos enzimáticos fundamentan su competencia en factores generales como la calidad, la relación costo-beneficio, el rendimiento de los productos y otros factores diferenciales como la propiedad intelectual, la investigación, innovación y desarrollo de productos y la sustentabilidad de los procesos. Novozymes es la empresa líder con el 48% del mercado global, otras empresas como BASF, Associated British Foods (AB Enzymes), Danisco/DuPont (Genencor Industrial Biosciences), Specialty Enzymes and Biotechnology, DSM, Maps Enzymes, Chr. Hansen and Biocatalysts son empresas con gran participación en el mercado, el cual ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos años debido a la demanda global de tecnologías limpias y eco-compatibles en reemplazo de procesos que usan productos químicos no renovables. En el período comprendido entre 2013 y 2016 se estimó un aumento de la tasa de crecimiento anual del mercado de 6.2% y una proyección conservadora pronostica que el incremento será del 4.7% hasta el 2021, lo cual correspondería a \$6300 millones de dólares.

El mercado global está segmentado por tipo de industria, el 30% de las ventas de catalizadores enzimáticos se destina a la producción de alimentos y bebidas siendo el área más grande de aplicación, en agricultura y alimentación animal la demanda es del 25%, para la industria farmacéutica y otras aplicaciones tecnológicas se emplea el 25% de la producción global y el 20% restante es usado para la fabricación de detergentes y productos

para el cuidado del hogar y limpieza industrial (BCC, 2017). Desde una perspectiva regional, se ha considerado que los mercados pequeños crecerán más rápidamente, es el caso de la región Asia Pacífico, con un incremento en la demanda de un 20% y América Latina en 15% (Freedonia Group 2013).

Si bien la industria de alimentos demanda el mayor número de soluciones enzimáticas para los procesos, también es cierto que éstos son diversos en materias primas y tipos de operaciones, de allí que la aplicación de las enzimas sea variada. En la fabricación de cerveza la α -amilasa, gluco-amilasa y pullulanasa aumentan significativamente los rendimientos de los cereales para la producción de azúcares fermentables, las xilanasas y arabino-glucanasas son una solución para la separación de mostos y filtrabilidad de la cerveza, un tipo de proteasa se emplea para la disponibilidad de aminoácidos en el producto final y así ajustar los niveles de nitrógeno, adicionalmente, la descarboxilasa previene la aparición del sabor indeseado por formación de diacetil. En los procesos de producción de productos panificados, se usan enzimas como amilasas y xilanasas para mejorar la elasticidad, sabor y textura de las masas, las asparaginasas se emplean para reducir contenido de acrilamida en los productos y la glucosa-oxidasa permite bajar la fracción de gluten en las formulaciones aprovechando el gluten natural de las harinas. De otro lado, para el procesamiento de lácteos las glucosidasas permiten la fabricación de productos libres de lactosa, y se emplea tripsina, quimosina y caseína con el propósito de coagular proteínas y acelerar la maduración de los quesos. En referencia a los productos cárnicos, las proteasas son deseables para mejorar textura y convertir subproductos en extractos protéicos que sirven como complementos nutricionales. Durante operaciones con grasas y aceites vegetales se emplean enzimas para hidrolizar gomas naturales y mejorar rendimientos, reducir el contenido de fósforo y la interesterificación enzimática para adecuar la consistencia sin producir grasas trans en margarinas como reemplazo de la hidrogenación química.

Las industrias de bebidas de frutas y producción de vinos hacen uso de las enzimas pectinolíticas, especialmente poligalacturonasas, las cuales son enzimas específicas para la extracción y clarificación de las pulpas de fruta porque al hidrolizar los compuestos pécticos conlleva a mejoras en aspectos del proceso como el rendimiento, tiempo de procesamiento, extracción, maceración, clarificación, filtrabilidad, estabilidad y sabor. Este grupo enzimático, capaz de hidrolizar la pectina, también tiene otras aplicaciones técnicas en el área ambiental, para el tratamiento de aguas residuales de efluentes en el procesamiento de productos frutihortícolas y, en las fábricas de papel, específicamente en la etapa de preparación de pulpa.

El escenario de oportunidades para aplicar la tecnología enzimática es amplio, la dinámica del mercado también se ha adaptado y propone soluciones concretas a problemáticas específicas. En América Latina, debido a su economía basada en la agricultura, se requiere de productos precisos para el procesamiento del material vegetal y la manufactura local de alimentos procesados. La pectina y diferentes glucanos son los principales polisacáridos constituyentes de las células vegetales, los cuales forman una red en cuya estructura se hallan productos derivados de frutos y verduras. En este sentido, las poligalacturonas adquieren un rol importante debido a su acción sinérgica como depolimerizante de las cadenas de ácidos pécticos que constituyen la pectina mediante la hidrólisis de los enlaces glicosídicos.

La diversidad de estructuras de las sustancias pécticas en las plantas da cuenta de la existencia de las características variadas de las enzimas pectinólíticas. Biológicamente, estas enzimas actúan en el ciclo de carbono como catalizadores en su reciclaje, degradando la pectina en galacturonanos que posteriormente se catabolizan a 2-ceto-3-desoxigluconato y finalmente a piruvato y 3-fosfogliceraldehído (Gummadi, S, Manoj y Kumar, 2007). Las pectinasas también están relacionadas con el proceso endógeno de maduración de los frutos modificando la pared celular y acortando las estructuras ramificadas del polisacárido y, como consecuencia, suavizando los tejidos. Adicionalmente, las pectinasas microbianas producidas por hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Botrytis*, especies de levaduras de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosacharomices* y bacterias de *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Clostridium* se expresan porque son parte de la patogénesis en plantas e intervienen como agentes de virulencia mediante el ablandamiento y podredumbre de los tejidos vegetales por degradación de la pared celular (Agris, 2005).

En este contexto, se evidencia la relevancia en la naturaleza de la actividad enzimática y se da cuenta del origen microbiano y vegetal de las pectinasas. A fin de extrapolar su función a sistemas artificiales para procesos ambientales y de manufactura de alimentos, las fuentes microbianas resultan más eficientes en términos de productividad, específicamente las bacterias. Los criterios para seleccionar la cepa productora de la enzima de interés se basan en la capacidad metabólica para su secreción al medio extracelular ya que esto permite que los procesos de aislamiento y purificación sean más sencillos comparado con los productos intracelulares. Adicionalmente, las células hospedadoras deben ser seguras (GRAS, *Generally Recognized As Safe*), particularmente por el interés de ser un producto para la aplicación en la industria de alimentos. También la actividad específica comparada entre organismos es un parámetro que puede mostrar cepas sobresalientes.

Una vez seleccionado el microorganismo, se pueden optimizar condiciones nutricionales y otros parámetros de operación en los cultivos celulares para maximizar la expresión de la enzima.

El primer paso para la recuperación de la proteína de interés es separar la biomasa celular del medio de crecimiento, para ello se aplican operaciones de separación sólido-líquido, iniciando con una centrifugación que permite clarificar el sobrenadante hasta un 95% seguida de una microfiltración a través de membranas de 0.45 μm para así obtener extractos libres de células. Previo al diseño de los procesos específicos de concentración y purificación de la proteína en un estado nativo con alta actividad enzimática, es necesario una caracterización preliminar, primero para identificar las condiciones en las que se maximiza la actividad como tipo de sustrato y concentración óptima, pH y temperatura de actividad y requerimiento de iones para estimular la actividad; y después para determinar el peso molecular aproximado y la presencia de otras proteínas en el extracto. Posteriormente, conocida la cantidad relativa de la proteína se seleccionan métodos selectivos para la purificación de la proteína de interés. Reportes bibliográficos de investigaciones enfocadas en enzimas pectinolíticas sugieren que procesos de precipitación ya sea con solventes como acetona o sales como sulfato de amonio, seguido de una ultrafiltración para concentrar las enzimas, posteriormente llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular con columna Sephadex seleccionada en el rango G-50 a G-150, según el peso molecular (Pedrolli *et al.*, 2009), y finalizar con un intercambio iónico empleando columnas como SP-Sepharose, DEAE-Sepharose o CM-Cellulose, son procesos convencionales que permiten la obtención de extractos enzimáticos purificados y en condiciones aceptables para ser aplicados.

Sin embargo, si se trata de someter las enzimas a condiciones operativas severas existe la posibilidad de que la actividad enzimática sea afectada rápidamente conduciendo a una inactivación irreversible. Además, si se desea separar la enzima de los productos de reacción para que sea reusada en procesos consecutivos, los extractos acuosos con la proteína purificada resultan inapropiados porque quedan solubles en el medio de reacción. En este contexto, se considera la inmovilización como una alternativa significativa para estabilizar el biocatalizador seleccionado y diseñar un sistema heterogéneo que permita separar de manera sencilla productos de reacción y biocatalizador. Adicionalmente, la inmovilización enzimática puede traer beneficios como incrementar la actividad, la especificidad y la selectividad.

Aplicando tecnologías de inmovilización, se restringen los grados de libertad del biocatalizador uniéndolo a un soporte o reteniéndolo dentro de una red tridimensional denominada matriz. Las estrategias para lograr esto son el entrecruzamiento covalente o

cross-linking que mediante la adición de un reactivo bifuncional, como el glutaraldehído, se favorece la unión de las enzimas y se logra obtener una estructura tridimensional denominada CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*) con resistencia a condiciones extremas de pH y temperatura. Esta técnica permite obtener derivados económicos, sin el requerimiento de soportes o complejas técnicas de inmovilización.

La unión a soportes se puede realizar mediante adsorción o unión covalente. En la adsorción, las interacciones son reversibles de carácter iónico y están en función de las fuerzas de *Van der Waals* o puentes de hidrógeno reguladas por el pH, la fuerza iónica y el diámetro del poro del soporte. La inmovilización de proteínas por unión covalente implica la formación de enlaces que son irreversibles y se da entre grupos disponibles de la enzima y el soporte funcionalizado con grupos aminos, carboxilos, hidroxilos, sulfidrilos entre otros. Adicionalmente, la técnica de atrapamiento se basa en mezclar el biocatalizador con una matriz y su posterior polimerización para confinar la enzima en el interior de la estructura tridimensional que se forma, tales matrices pueden ser polímeros naturales como hidrogeles (alginato, carragenano, quitosano) y termogeles (gelatina, agar, agarosa) o también se usan polímeros sintéticos (poliacrilamida, polivinilalcohol).

En definitiva, el desarrollo del sistema biocatalítico se concluye con el diseño del biorreactor adecuado en función del proceso de aplicación y de la forma y estructura del biocatalizador inmovilizado. El sistema más sencillo por su diseño y funcionamiento es el reactor de tanque agitado, otras opciones son las columnas de lecho empacado o fluidizado y los reactores de membranas, todas son opciones que pueden adaptarse, definiendo el tipo de operación continua o discontinua, los parámetros de operación, aspectos de la transferencia de masa y modos de control, para verificar viabilidad y actividad relativa a lo largo del tiempo del bioproceso, la cual puede cambiar debido a la naturaleza biológica de los catalizadores.

El presente trabajo de investigación, en el marco de las consideraciones particulares del sistema, tiene como propósito desarrollar un biocatalizador inmovilizado con actividad poligalacturonasa para aplicaciones en alimentos y ambiente, proponiendo una ruta de diseño de un bioproceso sustentable, que va desde la selección del microorganismo adecuado hasta la optimización de la producción de la enzima y de su inmovilización hasta la implementación de un biorreactor para la hidrólisis de compuestos pécticos. Los resultados de este trabajo constituyen un aporte al área de biotecnología a nivel local, que aprovecha los recursos tecnológicos precisos para proponer alternativas biocatalíticas a la cadena de operaciones del procesamiento frutihortícola y soluciones ambientales a industrias papeleras y textiles.

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar biocatalizadores inmovilizados con actividad poligalacturonasa que permitan diseñar potenciales bioprocesos sustentables de bajo impacto ambiental relacionados a la industria ambiental y alimentaria.

ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad metabólica para sintetizar poligalacturonasas de un banco de cepas bacterianas existentes en el Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología Sustentable (LIBioS) mediante técnicas de *screening* e identificar los microorganismos con la actividad deseada.
2. Identificar características bioquímicas de las poligalacturonasas obtenidas mediante técnicas instrumentales y moleculares.
3. Desarrollar procesos *downstream* de alta selectividad y bajo costo para la obtención de poligalacturonasas con elevada pureza.
4. Estabilizar la proteína deseada mediante diferentes metodologías de inmovilización como atrapamiento, adsorción y unión covalente a superficies.
5. Optimizar las condiciones de inmovilización utilizando la matriz seleccionada y evaluar el desempeño del biocatalizador obtenido.
6. Realizar estudios preliminares de modelos cinéticos y de escalado del bioproceso desarrollado para el potencial uso a nivel industrial.

MARCO CONCEPTUAL

ENZIMAS PECTINOLÍTICAS: GENERALIDADES

Las enzimas pectinolíticas tienen la función metabólica de catalizar la depolimerización de la pectina presente en los tejidos vegetales, disminuyendo el peso molecular del polisacárido. Los mecanismos para fraccionar la estructura polimérica son específicos según el tipo de enlace glicosídico, la composición de los monómeros, la proporción de residuos metilo y las ramificaciones laterales de las cadenas. Las diferencias entre los mecanismos de acción determinan la clasificación de las proteínas que constituyen este grupo enzimático, el cual actúa sinérgicamente en la desarticulación de la estructura polimérica de los compuestos pécticos (Jacob, 2009). Los principales tipos de enzimas pectinolíticas se describen a continuación y se muestran los esquemas de reacción en las figuras del 1 al 4.

Poligalacturonasas (PG)

Catalizan el rompimiento del ácido poligalacturónico mediante la hidrólisis del enlace glicosídico α -(1,4) que une las unidades de ácido D-galacturónico. Estas enzimas se clasifican en endopoligalacturonasas cuya acción es aleatoria dentro de la cadena y las exopoligalacturonasas que actúan en el extremo reductor del polímero.

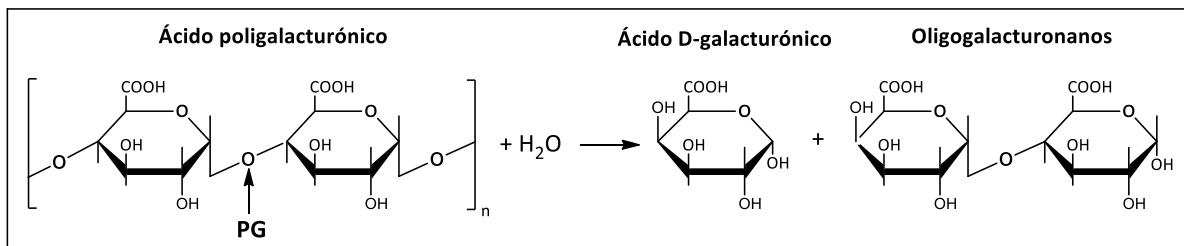


Figura 1. Esquema de reacción de poligalacturonasas (EC 3.2.1.15, EC 3.2.1.67).

Pectato liasas (PGL)

Enzimas que cortan la cadena del polímero mediante el mecanismo de β -eliminación del enlace glicosídico α -(1,4), eliminando un hidrógeno en C5, produciendo oligogalacturonatos insaturados en el enlace C4-C5 y un nuevo extremo reductor.

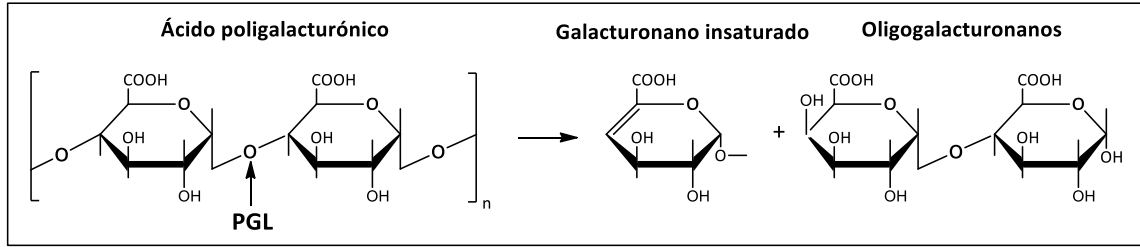


Figura 2. Esquema de reacción de pectato liasas (EC 4.2.2.2, EC 4.2.2.9).

Pectin liasas (PL)

Enzimas pectinolíticas que escinden el enlace α -(1,4) por β -eliminación reconociendo los galacturonanos con radicales metilester.

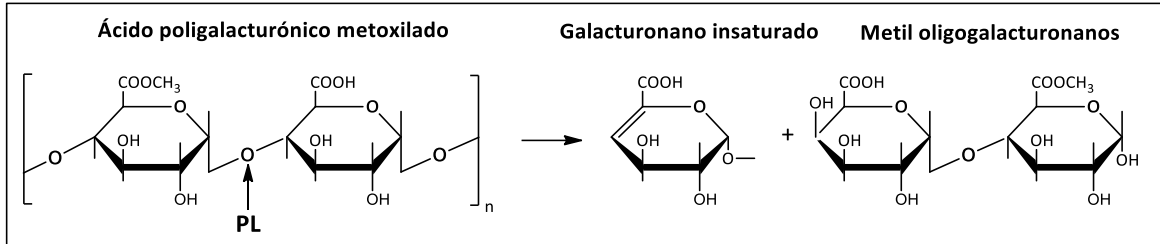


Figura 3. Esquema de reacción de pectin liasas (EC 4.2.2.10).

Pectin metilesterasas (PME)

Realizan la desesterificación hidrolítica del polímero liberando metanol por la remoción aleatoria de los grupos metilo presente en los galacturonatos sustituidos en C6. Dado que el grupo ester está constituido por un ácido y un alcohol, las unidades de monosacáridos actúan como ácidos y se genera el metanol.

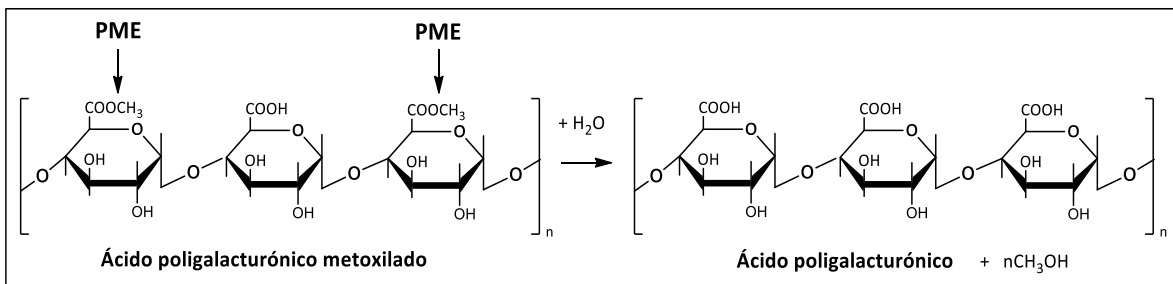


Figura 4. Esquema de reacción de pectin metilesterasa (EC 3.1.1.11).

La tabla 1 muestra un resumen de los tipos de enzima de acuerdo al IUBMB, la clasificación por grupos y la estructura según la base de datos CAZY (*Carbohydrate-Active enzymes*) que describe las familias de enzimas que degradan, modifican o forman enlaces glicosídicos y se clasifican según relaciones estructurales, dominios funcionales o módulos de unión a carbohidratos.

Tabla 1. Descripción de la clasificación de las enzimas pectinolítica.

Familia		Estructura	Mecanismo	Número IUBMB	Nombre
Glicosil hidrolasa	GH28	β -hélice	Hidrólisis	3.2.1.15	Endopoligalacturonasa
				3.2.1.67	Exopoligalacturonasa
				3.2.1.82	2-exopoligalacturonasa
Polisacárido Liasa	PL1 PL2	β -hélice Barril α/α	β -eliminación	4.2.2.2	Pectato liasa
				4.2.2.9	Pectato exoliasa
				4.2.2.10	Pectin liasa
Carbohidrato esterasa	CE8	β -hélice	Hidrólisis	3.1.1.11	Pectin metilesterasa

EL SUSTRATO: COMPUESTOS PÉCTICOS

Los componentes estructurales de la pared celular de las plantas son la celulosa, hemicelulosa y las sustancias pécticas. Las microfibras de celulosa confieren la fuerza a la pared celular, mientras que la hemicelulosa y los compuestos pécticos actúan como agentes cementantes de la red formada por la celulosa (Jacob, 2009; Yapo, 2011).

Los compuestos pécticos contribuyen a procesos fisiológicos como la velocidad y dirección del crecimiento de la planta y la diferenciación celular para determinar la integridad, rigidez y arquitectura de los tejidos (Jayani *et al.*, 2005). Son macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que varían entre 25 y 360 kDa, su naturaleza es de carácter ácido y de carga negativa y están presentes en la lámina media de la pared celular vegetal (0.5% – 7.0% peso fresco). Adicionalmente, ayudan a resistir la presión interna de las células, regulan la difusión de material a través del apoplasto y actúan como agente protector contra patógenos (Gummadi, S, Manoj y Kumar, 2007).

Estos compuestos están constituidos por una cadena principal denominada homogalacturonano (HG) con uniones α -(1,4) de ácido poli-D-galacturónico, con grupos carboxilo parcialmente esterificados con radicales metilo. Lateralmente, se unen otras moléculas de carbohidratos como β -D-xilosa formando xilogalacturonanos (XGA),

ramnogalacturonanos (RG) con arabinanos y arabinogalactanos unidas a la cadena, formando regiones ramificadas que constituyen un complejo conjunto de polímeros coloidales (Jayani *et al.*, 2005). En la figura 5 se muestra una estructura esquemática de las sustancias pécticas que pueden variar en longitud y composición.

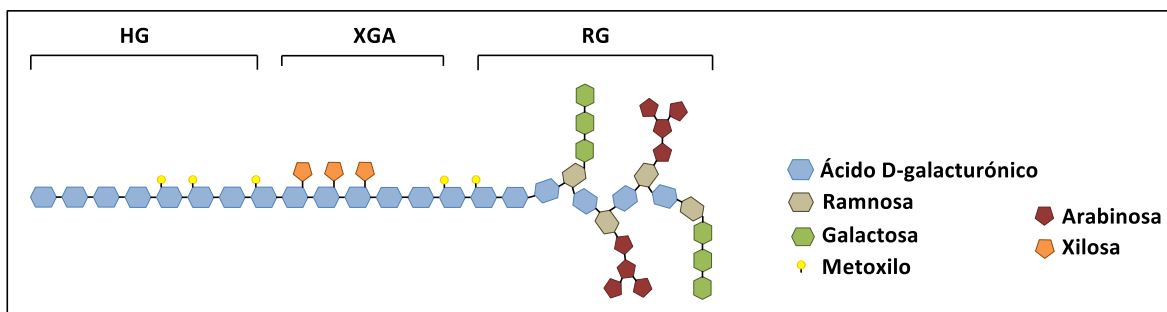


Figura 5. Esquema de la estructura de las sustancias pécticas presentes en los vegetales. Son biomacromoléculas complejas y pueden estar compuestas hasta por 7 tipos de azúcares.

La textura de las frutas y verduras durante su maduración y almacenamiento está influenciada principalmente por el tipo de pectina que presenta la estructura, ésta va cambiando según las modificaciones químicas y enzimáticas que ocurren durante estos procesos. Adicionalmente, las transformaciones de los frutos carnosos durante la maduración se atribuyen a la degradación enzimática y solubilización de las sustancias pécticas (Jacob, 2009). Dado que las sustancias pécticas son las responsables de la cohesión celular en los vegetales, su descomposición molecular deriva en suavidad y ablandamiento.

Según la composición y la estructura de la pectina, las enzimas que actúan en ella son específicas según el tipo de enlace y su ubicación en la cadena, ya sea terminal o intermedio. En este sentido, las poligalacturonasas son protagonistas en la desarticulación del polímero debido a que actúa sobre la cadena principal del homogalacturonano que tiene una longitud que supera las 100 unidades monoméricas, dejando libres los polisacáridos laterales que varían de tamaño entre 5 a 50 monosacáridos.

POLIGALACTURONASAS

Mecanismo de acción

La reacción de hidrólisis del ácido poligalacturónico por acción de las poligalacturonasas ocurre a través del mecanismo de inversión produciendo un desplazamiento simple, lo cual resulta en un producto saturado con una disposición espacial invertida alrededor del

carbono anomérico (Figura 6). Este tipo de hidrólisis se desarrolla a través de un ácido del catalizador que actúa como donador de protón al oxígeno del enlace glicosídico y participa un ácido/base catalítica que conduce al ataque nucleofílico de una molécula de agua en el carbono anomérico del galacturonano (Abbott y Boraston, 2007; Gummadi, S, Manoj y Kumar, 2007).

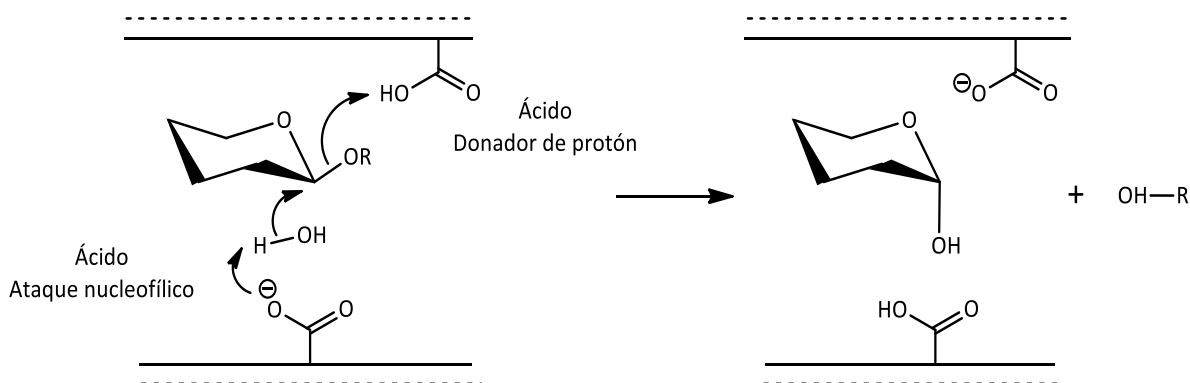


Figura 6. Mecanismo general de hidrólisis de polisacáridos a través de la inversión esteroquímica del carbono anomérico.

Los estudios de PG de diferentes fuentes indican que su estructura se conserva y consiste en un plegamiento en β -hélice que forma un cilindro formado de siete a diez vueltas helicoidales que se abren en ambos extremos permitiendo a la enzima envolver y atacar los enlaces glicosídicos del polisacárido. Dentro de tal estructura, existen cuatro regiones que se conservan estrictamente (Tabla 2) tanto en los aminoácidos como en distancias espaciales, independiente del tipo de PG que corresponda (Abbott y Boraston, 2007).

Tabla 2. Regiones conservadas de diferentes poligalacturonasas y su función en la hidrólisis del polisacárido.

Regiones conservadas	Función	Mecanismo
1 NTD	Unión al sustrato	Formación de puentes de hidrógeno con los grupos OH de los residuos adyacentes al enlace glicosídico.
2 RIK		
3 G/QDD	Sitio catalítico	DD: Nucleófilo - Estabiliza intermediarios H: Donador de protón
4 G/SHG		

N: Asparagina, T: Treonina, D: Ácido aspártico, R: Arginina, I: Isoleucina, K: Lisina, G: Glicina, Q: Glutamina, S: Serina, H: Histidina

Dentro de las enzimas glicosil hidrolasas el donador de protón y el nucleófilo corresponden invariablemente a ácidos carboxílicos, generalmente el ácido aspártico actúa como nucleófilo y el ácido glutámico como donador de protón (Stone, 2008). Sin embargo, en las

poligalacturonasas no hay evidencias de que se conservan residuos de glutamina, en su lugar intervienen dos residuos asparagina, uno direcciona el ataque nucleofílico y el otro es el donador de protón. Por otra parte, la presencia de histidina sugiere que tal aminoácido también puede actuar como donador de protón (Palanivelu, 2006).

Finalmente, con base en las evidencias disponibles basadas en las modificaciones químicas de los sitios activos, mutagénesis dirigida y cristalografía, el mecanismo de acción de las PG ocurre de la siguiente manera:

1. Posicionamiento de los sitios NTD y RIK a ambos lados del enlace glicosídico formando puentes de hidrógeno y distorsionando la cadena del polisacárido. Los aminoácidos H y N se ubican dentro del enlace.
2. Transferencia del protón de H al enlace glicosídico.
3. Escisión del enlace y formación de un enlace covalente entre el sustrato y el primer residuo N. Simultáneamente, se libera el primer producto (extremo reductor).
4. El segundo N ubica la molécula de agua y realiza el ataque nucleofílico. Se libera el segundo producto de reacción (extremo no reductor), se invierte la estereoquímica del C1 y se restablece el sitio activo de la enzima.

Fuentes naturales

Las PG han sido objeto de múltiples estudios debido a su importancia biológica en las interacciones entre plantas y microorganismos y las aplicaciones técnicas en el procesamiento de alimentos y tratamiento de aguas residuales efluentes de labores frutihortícolas. Las PG son naturalmente producidas por hongos, bacterias y levaduras, también por plantas superiores y algunos insectos y nemátodos parásitos de plantas (Jayani *et al.*, 2005). Las de origen microbiano en su mayoría son extracelulares e inducibles por el tipo de fuente de carbono, su síntesis es abundante en hongos saprofitos descomponedores de los tejidos vegetales, los cuales son de carácter filamentosos y pertenecen principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Botrytis* entre otros (Niture, 2008). Bajo condiciones de laboratorio en cultivos sumergidos, la producción de PG depende de la composición del medio de cultivo, especialmente de la fuente de pectina y de nitrógeno, el pH inicial del medio y la agitación. Los sistemas de cultivos en estado sólido también favorecen las fermentaciones de los hongos, en estos casos los sustratos derivados de agricultura son indispensables y factores como el contenido de humedad, actividad de agua y el pH son fundamentales. La mayoría de estos hongos bajo las condiciones de cultivo indicadas, secretan PG de carácter ácido, en un rango de 3 a 6 (Niture, 2008).

La especie fúngica más estudiada para la producción de PG es el *A. niger*, las investigaciones reportan diferentes estrategias para las fermentaciones ya sea empleando sustratos que

contienen salvado de trigo, cascarilla de arroz, maíz, residuos de cítricos o fracciones de semillas de algodón y girasol (Debing *et al.*, 2006; Fawole y Odunfa, 2003; Fontana *et al.*, 2005) o cultivos sumergidos con los nutrientes solubles (Gomes *et al.*, 2011). De igual modo, los reportes respecto de los requerimientos nutricionales y otros aspectos de regulación y propiedades bioquímicas son amplias y se describen detalladamente el modo de producción enzimática y sus efectos en el sustrato (Anuradha *et al.*, 2010; Blandino *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2006; Rombotus y Pilnik, 1980). Si bien la función biológica de las PG es específica, éstas se dan en la naturaleza de múltiples formas y varían en sus características cinéticas, peso molecular, punto isoeléctrico y pH de acción, lo cual evidencia la plasticidad y adaptación al ambiente de los organismos productores.

El hecho que los hongos y algunas levaduras de especies de *Aureobasidium*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Blanco *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2009) produzcan además de las poligalacturonasas, múltiples enzimas adicionales no pécticas asociadas a su metabolismo (proteasas, amilasas, celulasas, arabinofuranosidasas, xilanasas), pueden tener un efecto no deseado en las aplicaciones técnicas finales y afectan los procesos de recuperación y purificación haciéndolos más complejos y disminuyendo el rendimiento. Adicionalmente, dado que el ciclo de crecimiento celular de los hongos es más prolongado comparado con las bacterias, éstas últimas resultan en una fuente promisorias y más productiva, sin embargo, aún son acotados los estudios de PG bacterianas. Actualmente, hallar una cepa bacteriana que produzca la enzima en tiempos cortos y con alta actividad hidrolítica mediante una técnica de *screening* es fundamental para el desarrollo de un biocatalizador aceptable con el fin de ser aplicado en la industria alimentaria y ambiental.

Bacterias productoras

En la bibliografía se describen enzimas pectinolíticas de bacterias del género *Erwinia*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Ahlawat *et al.*, 2009; Beg *et al.*, 2000a; Reverchon *et al.*, 1996). Una característica particular es su carácter de acción desde pH neutro hasta la alcalinidad lo cual amplía el rango de acción y aplicaciones industriales permitiendo su uso en papillas vegetales, tratamientos de fibras o telas de algodón, acondicionamiento de pulpas para papel y tratamiento de efluentes, procesos que demandan el uso de un pH más elevado. Lo antes dicho contrasta con las PG fúngicas, las cuales sólo son activas a pH ácido (Jayani *et al.*, 2010).

Las primeras pectinasas bacterianas identificadas son de especies de *Clostridium* y *Erwinia* y se descubrieron a partir de estudios enfocados en fitopatología. Van Rijssel *et al.* (1993) estudiaron sobrenadantes de la cepa *Clostridium thermosaccharolyticum* cultivada en

medio con pectina e identificaron actividad PG y PME, los productos de reacción identificados por técnicas cromatográficas mostraron galacturonanos de 2 y 3 unidades monoméricas saturadas y metanol. Además, fue evidente la acción coordinada de ambas enzimas ya que, al monitorear la reacción en el tiempo, en primera instancia se liberaban los grupos carboxilo y posteriormente aparecían los oligómeros. De otro lado, en *E. chrysanthemi* se identificó la producción de múltiples tipos de isoenzimas de PGL y PG extracelulares cuya acción conjunta completa la degradación enzimática de los polímeros y forman galacturonanos de cadena corta que entran a la célula y son catabolizados hasta 2-ceto-3-desoxigluconato. Asimismo, se demostró que las pectinasas que requieren Ca^{+2} son del tipo liasas y la función del ion es estabilizar los intermedios formados en el proceso de escisión por eliminación. Analizando el catabolismo de la pectina en *E. carotovora* y *Y. enterocolitica* se comprobó la expresión de hidrolasas de la familia GH28, especialmente exopoligalacturonasas, cuya ubicación se evidenció en el espacio periplasmático, sugiriendo así que estas enzimas operan como un puente funcional en el transporte de productos de la hidrólisis de pectina hacia el interior de la célula (Reverchon *et al.*, 1996).

Las investigaciones orientadas al estudio de plagas en plantaciones de soja determinaron que diferentes cepas de *P. syringae* ocasionan enfermedades en los tejidos de tallos, hojas y vainas e identificaron que el principal factor de virulencia son las enzimas pectinolíticas, específicamente PG y PL. Mediante electroforesis enfocadas en punto isoeléctrico (IEF) y tinciones con rojo rutenio revelaron una PG (pI 8.5) y dos tipos de PL (pI 9 y 9.5) que requieren Ca^{+2} a una concentración de 1 mM en la reacción (Hoondal *et al.*, 2002). De modo similar, *X. campestris* produce diferentes pectinasas durante la patogénesis de frutos y hortalizas (Agrios, 2005).

Más recientemente, con la demanda de la tecnología enzimática para usos industriales, el objeto de estudio ha sido directamente la actividad catalítica para la degradación de pectina con el objeto de aplicarlo en procesamiento de alimentos de origen frutihortícola. En este sentido, emergieron cepas de *Bacillus* y *Streptomyces* como las más productivas, sencillas de cultivar y con elevada actividad pectinolítica. En términos generales, estas cepas productoras son aisladas de suelo, de subproductos del procesamiento de frutas y verduras, y de material vegetal en descomposición. Los cultivos celulares se dan en estado sólido o sumergido y las fuentes de carbono frecuentemente seleccionadas son la pectina cítrica, bagazo de cítricos u orujo de otros frutos. Su identificación ha sido establecida por técnicas bioquímicas, microbiológicas y moleculares por secuencia del gen 16S rRNA. En la tabla 3 se resumen algunos estudios de pectinasas producidas por diferentes especies del género *Bacillus*, detallando la fuente de los aislados, peso molecular (P.M) de la proteína, pH y temperatura de la actividad enzimática.

Tabla 3. Caracterización de pectinasas de diferentes cepas de *Bacillus*.

Cepa	Aislamiento	pH	T (°C)	P.M (kDa)	Denominación	Referencia
<i>B. sp.</i> NT33	Suelo	10 - 11	60 - 70	ND	Pectin liasa	(Cao <i>et al.</i> , 1992)
<i>B. sp.</i> NT82					Poligalacturonasa	
<i>B. sp.</i> KSM P15	ND	10.5	55	20.3	Pectato liasa	(Kobayashi <i>et al.</i> , 1999)
<i>B. sp.</i> MG-cp2	Semillas de <i>Celastrus paniculatus</i>	10	60	ND	Poligalacturonasa	(Beg <i>et al.</i> , 2000a)
<i>B. sp.</i> DT7	Residuos de frutas	8	60	106	Pectin liasa	(Kashyap <i>et al.</i> , 2000)
<i>B. sp.</i> KSM P443	Suelo	7	60	45	Exopoligalacturonasa	(Kobashi <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. pumilus</i>	ND	8.5	70	8.5	Pectato liasa	(D. C. Sharma y Satyanarayana, 2006)
<i>B. subtilis</i>	Suelo	7 - 8	60	ND	Pectinasa	(Ahlawat <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. pumilus</i>						
<i>B. subtilis</i> RCK	Residuos de cocina	10.5	60	ND	Exopoligalacturonasa	(Gupta <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. sphaericus</i> MTCC 7542	Vegetales en descomposición	7	30 - 40	ND	Poligalacturonasa	(Jayani <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. subtilis</i> EFRL01	Suelo	8	45	ND	Pectinasa	(Sattar <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. clausii</i>	Suelo alcalino	10	60	35	Pectin liasa	(Li <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. subtilis</i> PEL 168	ND	9.5	50	46	Pectin liasa	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. halodurans</i> M29	Suelo	10	80	39	Pectinasa	(Mei <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. firmus</i>	Residuos de frutas	7 - 8	50	ND	Pectinasa	(Roosdiana <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. sp.</i> MBRL576	Vegetales en descomposición	4	45	66	Pectinasa	(Bhardwaj y Garg, 2014)
<i>B. subtilis</i> NVFO19	Residuos de agricultura	10	60	ND	Pectinasa	(El-sayed, 2015)
<i>B. licheniformis</i> KIBGE IB21	Suelo	10	45	153	Poligalacturonasa	(Rehman <i>et al.</i> , 2015)

Además de los diferentes *Bacillus*, otro género que ha sido notable en la producción de las enzimas pectinolíticas es *Streptomyces*, bacterias que también conforman poblaciones típicas en el suelo de bosques con material vegetal en descomposición. *S. lydicus* cultivada en medio con pectina (5 g/L) tuvo máxima actividad hidrolítica a pH 6 y 50 °C, la enzima se identificó como exopoligalacturonasa con un peso molecular de 43 kDa (Jacob *et al.*, 2008a). Kuhad, Kapoor, y Rustagi (2004) realizaron un *screening* de aislados nativos de suelo y la cepa *Streptomyces sp.* RCK-SC se destacó por la producción de una pectinasa alcalina

después de 24 horas de incubación en cultivo líquido con pectina cítrica; un aporte de 2,5 g/L de glucosa al medio maximizó la producción de la enzima. Otro estudio identificó a *S. erumpens* MTCC 7317 como productora de una PG con actividad a pH neutro y se demostró su aplicación en la extracción de pulpas de frutos y vegetales, aumentando el rendimiento de proceso hasta el 20% (Kar y Ray, 2011). A nivel molecular, se estudió el gen *pl-str* que codifica para una PGL, se clonó de *Streptomyces sp.* S27 y se expresó en *Escherichia coli* Rosetta, el peso molecular fue de 35 kDa y su actividad enzimática fue máxima a pH 10 y 60 °C. La sobreproducción de la enzima permitió aplicarla a un proceso textil de desgomado de fibras, el impacto fue positivo permitiendo la reducción de la viscosidad de las gomas y aumentando la higroscopicidad de las telas, siendo éstos resultados comparables con los del producto comercial Scourzyme (Yuan *et al.*, 2012). Por otra parte, con la cepa *Streptomyces sp.* QG-11-3 se demostró actividad xilanasas adicional a la pectinolítica, el sustrato sólido compuesto por restos de semillas de algodón y viruta de madera permitieron obtener extractos con alta actividad enzimática y una acción sinérgica de ambas enzimas en xilogalacturonanos (Beg *et al.*, 2000a).

Metodológicamente, se llega a concluir y seleccionar una mejor cepa mediante técnicas de *screening*, las cuales consisten en usar un procedimiento selectivo que permita la detección o aislamiento de aquellos microorganismos de utilidad entre una gran población microbiana. De esta manera, se van descartando las cepas con la menor actividad metabólica de interés y se van acotando e identificando los microorganismos destacados. El *screening* es una etapa clave en el desarrollo de bioprocesos y es una herramienta útil para la búsqueda de enzimas que catalicen reacciones novedosas para el desarrollo de bioproductos y, simultáneamente al descubrirse nuevas enzimas, se hallarían indicios para diseñar nuevos procesos enzimáticos. En ambos sentidos, se describen tres condiciones importantes para implementar en una estrategia de *screening*: definir el tipo de actividad enzimática de interés, decidir un grupo de microorganismos amplio y representativo y diseñar un ensayo sensible y conveniente que permita detectar tantos microorganismos como sea posible, sin sesgos y de manera aleatoria (Ogawa y Shimizu, 1999). Un *screening* primario permite identificar cuáles microorganismos tienen el potencial de producir el metabolito de interés sin proporcionar información específica a cerca del nivel o rendimiento de producción. Seguidamente, se puede realizar un *screening* secundario que permita una clasificación adicional de aquellos microorganismos que tienen un valor real para los procesos industriales y se descarten con contundencia aquellos que carecen del potencial, típicamente se implementa con mediciones experimentales más específicas.

El *screening* para pectinasas puede realizarse mediante incubación en platos de agar con pectina y su posterior revelado con HCl, yodo o cetrimida para determinar halos de

degradación (Jacob *et al.*, 2008a; Masoud y Jespersen, 2006; Soares *et al.*, 1999), ésta es una técnica más cualitativa y de carácter primario. Asimismo, mediante cultivos líquidos con pectina cítrica como fuente de carbono y la cuantificación de actividad hidrolítica en los sobrenadantes por liberación de azúcares reductores o reducción de la viscosidad es un método más detallado, que ha sido considerado como *screening* secundario (Highley, 1997; Jayani *et al.*, 2010).

Regulación de la expresión enzimática

El metabolismo celular tiene que estar coordinado para asegurar que, en un momento particular, sólo las enzimas necesarias y una cantidad definida de ellas, sean producidas; una vez cumplida su función biológica, se detiene su síntesis y las expresadas decrecen en su actividad catalítica debido a diferentes mecanismos regulatorios específicos. Los principales mecanismos de control que permiten la regulación de las funciones de síntesis están asociados a agentes nutricionales, especialmente las fuentes de carbono (Sanchez y Demain, 2002).

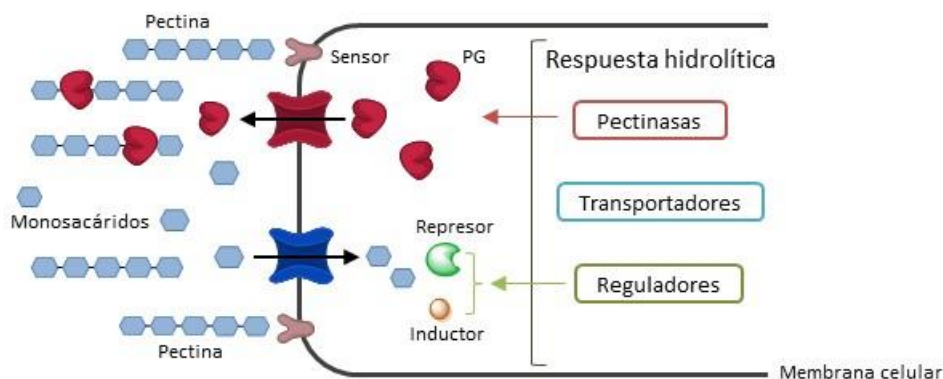


Figura 7. Esquema representativo del mecanismo molecular de la regulación enzimática para la síntesis de PG.

La figura 7 es una representación gráfica de los mecanismos de regulación enzimática, las bacterias productoras de PG, mediante proteínas de membrana y otras de señalización celular, reciben y responden a los estímulos externos dados por el tipo y la fuente de carbono disponible. De un lado, la pectina cítrica o de manzana y sustratos naturales complejos como el salvado de trigo, cascarilla de arroz, cáscaras de cítricos o residuos del procesamiento de algodón estimulan la producción de las enzimas pectinolíticas, mediante un mecanismo denominado inducción metabólica (Beg *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2012). Y de otro modo, la glucosa, galactosa y ácido galacturónico promueven el crecimiento celular de bacterias productoras, sin embargo, no permiten la expresión de PG debido a la activación

de un mecanismo regulatorio denominado represión catabólica (Kohli y Gupta, 2015; Raj Kashyap *et al.*, 2003).

a. Inducción

Los microorganismos con actividad pectinolítica reconocen los compuestos pécticos en el ambiente extracelular bajo variadas condiciones fisiológicas, se adaptan a las variaciones en su composición y los identifican como una potencial fuente de carbono. La respuesta a la presencia de pectina es la activación de los mecanismos de síntesis y secreción de diferentes proteínas, entre ellas las enzimas pectinolíticas que degradan el polisacárido y otras que modifican, transportan y permiten asimilar los residuos de azúcares liberados. La degradación completa de la pectina por la acción enzimática genera principalmente el monómero de ácido D-galacturónico y otros azúcares como ramnosa, galactosa, xilosa y trazas de metanol, estos azúcares luego son ingresados al citoplasma y metabolizados para obtener energía y promover el crecimiento celular (Reverchon *et al.*, 1996).

Los estudios de la expresión de las enzimas pectinolíticas bacterianas indican que éstas son fundamentalmente de carácter inducible, además sugieren que los compuestos relacionados estructuralmente al sustrato, son los inductores preferidos por los microorganismos. Es decir, las enzimas son producidas solamente cuando se necesita la degradación de la pectina para acceder a la fuente de energía. Sin embargo, se han identificado bajos niveles de actividad de carácter constitutivo que permitiría hidrolizar el polisacárido y liberar productos de bajo peso molecular que podrían actuar como inductores posteriores (Sanchez y Demain, 2002).

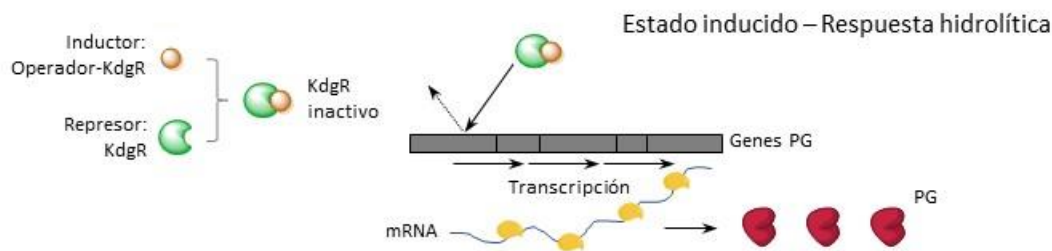


Figura 8. Modelo esquemático de la inducción de la síntesis de PG dado por la presencia de pectina en el medio extracelular y que activa el operador-KdgR.

En bacterias, el sistema regulatorio para la síntesis de enzimas pectinolíticas más estudiado es el de *Erwinia chrysanthemi*, un fitopatógeno responsable de desórdenes en la pared celular de plantas y que secreta hasta diez diferentes tipos de enzimas, incluyendo PG y PGL que forman mono y disacáridos que se catabolizan en una ruta metabólica intracelular hasta 2-ceto-3-desoxigluconato. Los genes de estas enzimas se expresan a partir de diferentes cistrones independientes para cada enzima y la transcripción se favorece bajo la presencia de pectina y extractos vegetales, fase estacionaria del crecimiento celular, baja temperatura y limitaciones de oxígeno y hierro. Sin embargo, la expresión diferencial de las enzimas podría responder a diferentes mecanismos de infección. El represor KdgR regula la síntesis de los genes en presencia de pectina y controla los genes necesarios el proceso de secreción de las enzimas pectinolíticas (Figura 8). Otras proteínas en citoplasma como PecS, PecT, LysR intervienen en la síntesis enzimática como reguladoras de la transcripción (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996).

b. Represión catabólica

Las fuentes de carbono como los carbohidratos simples (fructosa, glucosa, xilosa, sacarosa, maltosa) o poliméricos (pectina, almidón, celulosa), además de algunos polioles y ácidos orgánicos, son comúnmente usadas como sustratos para el crecimiento celular y la producción de metabolitos de interés mediante procesos fermentativos. Sin embargo, la síntesis, especialmente de enzimas hidrolíticas, es afectada negativamente por fuentes de carbono simples. Este mecanismo regulatorio denominado regulación catabólica por carbono o CCR (*carbon catabolite repression*) es representado en la figura 9 y se considera que es ampliamente distribuido en sistemas microbianos para garantizar un uso secuencial y organizado de las fuentes de carbono disponibles (Sanchez y Demain, 2002). Bajo esta condición, la célula cataboliza la fuente de carbono más sencilla, es decir, la que más rápidamente satisface energía para el crecimiento y, a su vez, se reprime la síntesis de enzimas que permitirían utilizar los otros sustratos hasta que el primario haya sido agotado. Así, la expresión de los genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono secundarias es impedida por la presencia de sustratos simples con el objetivo de optimizar la tasa de crecimiento en ambientes naturales que proveen mezclas complejas de nutrientes (Stülke y Hillen, 1999).

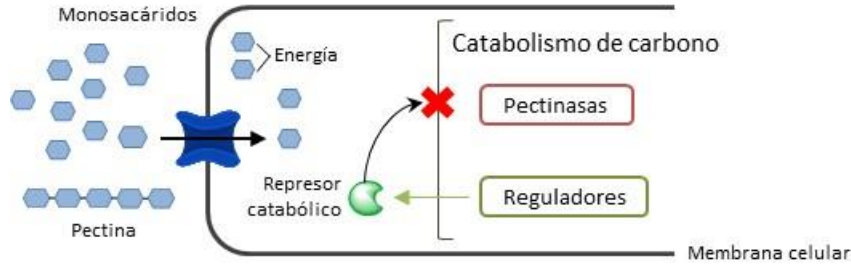


Figura 9. Modelo esquemático de la represión de la expresión enzimática por presencia de fuentes de carbono simples.

Los mecanismos de la represión catabólica difieren entre bacterias y se han agrupado en 4 rutas diferenciadas, éstas son para bacterias Gram negativas entéricas (*E. coli*) y no entéricas (*Pseudomonas*, *Ralstonia*), para Gram positivas con bajo contenido GC (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*) y alto contenido GC (*Streptomyces*). En términos generales, los ácidos orgánicos son represores en bacterias no entéricas y la glucosa y otros monosacáridos son los represores en bacterias entéricas y Gram positivas, en las cuales el consumo del azúcar y los sistemas de fosforilación y transporte generan las señales que promueven la represión catabólica.

c. Sistema de secreción enzimática

Las PG tienen que ser transportadas al medio extracelular para actuar en el sustrato y se ha reportado que se activa la maquinaria de secreción cuando la proenzima ha sido sintetizada con una secuencia señal. El mecanismo de transporte estudiado en bacterias para todas las enzimas pectinolíticas en general, es del Tipo II (Figura 10).

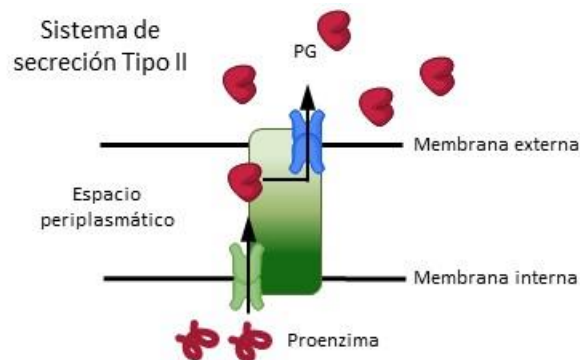


Figura 10. Representación esquemática del sistema de secreción bacteriano denominado de Tipo II para el transporte de las enzimas al medio extracelular.

el cual ocurre en dos pasos. Primero, se reconoce la proenzima por su secuencia señal y es llevada hacia el espacio periplasmático, durante el paso a través de la membrana interna se separa el péptido señal. Luego en el periplasma, la proteína se pliega y adopta su conformación final, además atraviesa la membrana externa asistida por una maquinaria de 15 proteínas cuyos genes están organizados en 5 unidades de transcripción. Aunque la función exacta de cada proteína no es completamente conocida, se encontró que algunas son constitutivas y otras son co-reguladas por el mecanismo de síntesis de la enzima (Agrios, 2005).

PROCESOS DE RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PG

Una vez que las enzimas han sido expresadas y transportadas al exterior de la célula, éstas quedan expuestas en el medio donde cumplen su función biológica de hidrolizar el sustrato para ingresar azúcares más simples y obtener la energía requerida para el metabolismo. En los procesos fermentativos, se diseñan las condiciones para maximizar la producción enzimática, así que las PG deben recuperarse del ambiente externo, aislarlas de otras proteínas, aumentar su concentración o maximizar su cantidad relativa conservando su actividad catalítica con rendimientos de proceso aceptables.

En este sentido, el primer paso para la recuperación de la proteína es separar la biomasa celular del medio de cultivo al término de la fermentación, se realiza una centrifugación para clarificar el sobrenadante hasta un 95% seguida de una microfiltración a través de membranas de 0.45 μm para así obtener extractos libres de células (Naidu, 1998). Cuando se realizan cultivos en estado sólido para la obtención de las enzimas, se procede a realizar una extracción sólido-líquido cuyo objetivo es solubilizar las enzimas adheridas a los sustratos hasta minimizar el contenido de éstas en el material sólido. Así, todo el producto de fermentación es sometido a agitación con un solvente que puede ser solución fisiológica, una solución buffer que otorgue estabilidad a la enzima libre o sales inorgánicas diluidas que actúan como conservantes para prevenir posterior contaminación (metabisulfito de sodio). Una vez que la enzima ha sido solubilizada, se realiza una filtración para obtener el extracto enzimático libre de sólidos insolubles (Jayani *et al.*, 2005; Raj Kashyap *et al.*, 2003). Posteriormente, se diseñan procesos específicos de concentración y purificación según las características particulares de las enzimas como peso molecular o carga iónica y de otras proteínas presentes en los extractos, así como iones u otros componentes del medio de cultivo que son indeseados. A mayor conocimiento de las características del extracto enzimático, puede ser más selectivo el proceso, sin embargo, a mayor cantidad y similitud

entre diferentes proteínas presentes, mayor será la cantidad de etapas de purificación afectando rendimiento total.

En investigaciones enfocadas en pectinasas bacterianas, se han empleado procesos de precipitación ya sea con solventes (etanol, acetona) o sales (sulfato de amonio), diálisis y ultrafiltración para concentrar y obtener parcialmente purificada la enzima de interés (Pedrolli *et al.*, 2009). Posteriormente, las técnicas cromatográficas son procesos convencionales que permiten mayor grado de purificación; mediante la exclusión molecular o filtración en gel con una columna Sephadex seleccionada en un rango entre G-50 y G-150 según el peso molecular específico, o cromatografía de intercambio iónico a través de columnas como SP-Sepharose, DEAE-Sepharose o CM-Cellulose, se puede obtener de la enzima purificada (Bhardwaj y Garg, 2014; Jacob, 2009; Naidu y Panda, 1998).

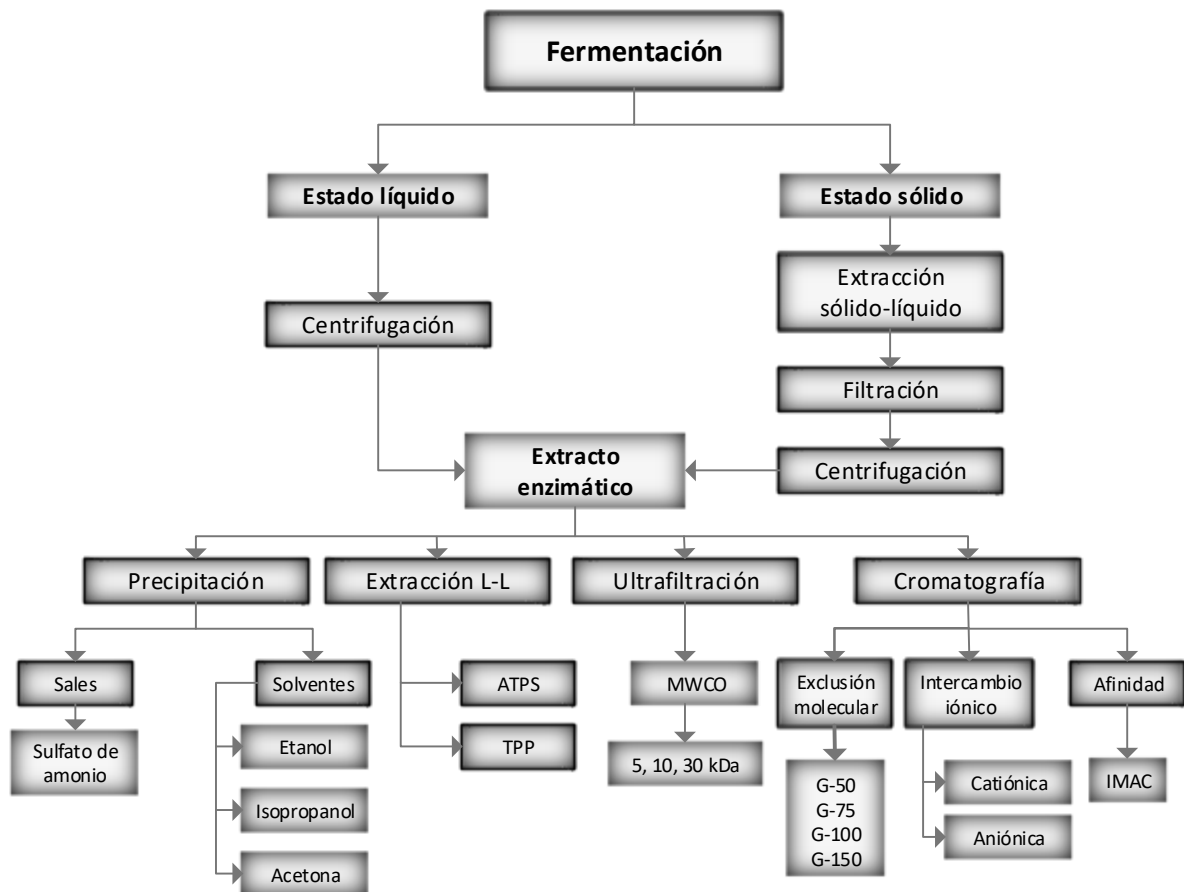


Figura 11. Alternativas para la selección de los procesos de recuperación, concentración y purificación enzimática.

En la figura 11 se muestran las estrategias para la obtención de extractos purificados de PG; las condiciones particulares para la implementación de cada método dependerán de cada sistema en estudio y la cantidad de pasos seleccionados estarán en función del grado de concentración y pureza del extracto crudo y el deseado al final del procedimiento. Al momento de validar la estrategia metodológica, es necesario verificar la cantidad de proteína a cada paso y su actividad enzimática, ello indicará el grado de purificación obtenido en cada etapa y el rendimiento del proceso. Otro indicador de la pureza de la proteína de interés, se obtiene a partir del patrón de bandas observado en gel de electroforesis en poliacrilamida, tanto en estado nativo como desnaturizante (SDS-PAGE), así se identifica la presencia de la enzima de interés y de otras proteínas contaminantes basado en la diferencia de peso y tamaño molecular. De otro lado, una técnica para conocer el peso molecular exacto de la proteína sería realizar una secuenciación de aminoácidos. Dado que el objetivo es obtener extracto con actividad, no hay que perder de foco éste objetivo, porque existen métodos para caracterizar y aislar la proteína purificada, pero pueden desnaturizar la enzima.

Además de las técnicas convencionales referenciadas, los procesos de extracción líquido-líquido son objeto de estudio reciente como alternativa para obtener extractos sólo con la enzima de interés en menor cantidad de pasos de purificación, valiéndose de las diferentes propiedades de las proteínas en el extracto. Por un lado, la extracción mediante bifases acuosas (ATPS *Aqueous Two-Phase System*), consiste en la formación de dos fases inmiscibles y se basa en la afinidad de la enzima para migrar hacia una de ellas. Los ATPS pueden ser del tipo polímero-polímero y polímero-sal, regidos por las interacciones hidrofóbicas y por el potencial eléctrico, respectivamente. Cuando la concentración de estos componentes supera un valor crítico determinado se forman ambas fases en equilibrio y los factores que afectan significativamente la separación y por ende el coeficiente de partición, son el peso molecular del polímero, la viscosidad, la temperatura, la densidad, la tensión superficial y las fuerzas iónicas (Nadar *et al.*, 2017). Asimismo, la partición en tres fases (TPP *Three Phase Partitioning*) consiste en adicionar una determinada cantidad de sal (sulfato de amonio, fosfato de potasio o citrato de sodio) y de solvente orgánico (t-butanol, 2-butanol, 1-propanol o 2-propanol) al extracto crudo. Una mezcla homogénea y la posterior decantación, generará tres fases diferentes: una superior orgánica, otra inferior acuosa y la tercera corresponde a la interfase enriquecida con la proteína. Algunas moléculas de bajo peso molecular e impurezas de carácter no polar como lípidos, compuestos fenólicos, pigmentos o detergentes migrarán a la fase superior. Resulta interesante este procedimiento debido a la acción conjunta de diferentes principios tales como precipitación por salado, co-solventes y características isoiónicas y cosmotrópicas de las proteínas (Nadar *et al.*, 2017).

Finalmente, cuando haya sido elegido la secuencia mínima de etapas para la recuperación y purificación de las enzimas de interés, se obtienen extractos líquidos con altas concentraciones de proteína y una actividad enzimática elevada, de esta manera se maximiza el rendimiento y la actividad específica, es decir, relativa a la cantidad de proteína de interés. La preservación de estos extractos obtenidos depende de las características de estabilidad de cada enzima en particular, sin embargo, existen estrategias de almacenamiento para evitar o retardar la desnaturalización progresiva de las proteínas.

Las alternativas para la conservación de la integridad de las estructuras de las proteínas y de su actividad biológica depende de las características particulares de cada molécula, sin embargo, algunos lineamientos sugieren el uso de crioprotectores como glicerol y etilenglicol a una concentración final de 20 a 50%, la adición de agentes antimicrobianos como azida de sodio 0.02 – 0.05% o Timerosal a 0.01%. Se usa EDTA a concentraciones entre 1 y 5 Mm, el cual actúa como quelante evitando la oxidación de los grupos –SH inducida por metales y ayuda a mantener las proteínas en un estado reducido. También se recomienda la adición de agentes reductores como 1,4-ditiotreitol y 2-mercaptoetanol (1 – 5 mM), los cuales actúan protegiendo las cisteínas presentes evitando su oxidación. Los compuestos mencionados y otros polialcoholes y azúcares están reportados como moléculas que fortalecen las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos no polares, favoreciendo la protección de sitios catalíticos y la resistencia a la desactivación térmica (Gekko y Timasheff, 1981; Pierce Biotechnology, 2005).

INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

La inmovilización enzimática es un proceso mediante el cual las enzimas en estado soluble se confinan o localizan en una región definida del espacio, restringiendo parcial o totalmente sus grados de libertad para dar lugar a un estado insoluble, en el que se conserva su actividad catalítica y permite la reutilización en reacciones sucesivas (Guisán, 2006). Las estrategias de inmovilización son variadas y su diseño e implementación es objeto de estudio para la innovación de métodos y materiales resistentes mecánicamente y compatibles con sistemas biológicos, con el propósito último del diseño de biorreactores para catálisis heterogénea.

Una clasificación sencilla de los métodos de inmovilización, da cuenta del agente o material adicional a la proteína que permite la formación del estado insoluble, de esta manera, la formación de agregados, unión a soportes, atrapamiento y matrices mixtas, son los principales métodos (Figura 12). Sin embargo, dentro de cada metodología, las

interacciones entre proteínas y el material pueden ser de naturaleza física o química y estas diferencias en las interacciones son las que determinan la complejidad de los procesos de inmovilización y van condicionando su implementación según cada enzima estudiada.

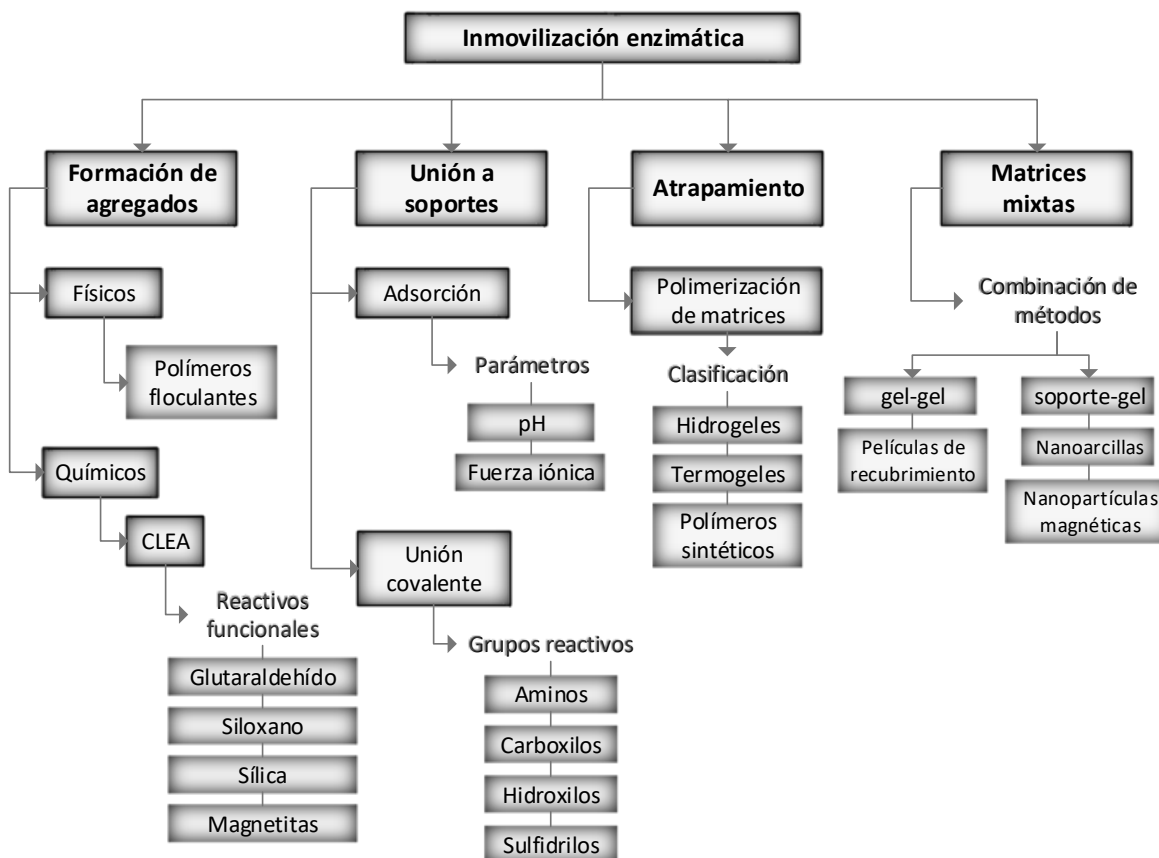


Figura 12. Clasificación y descripción general de los métodos de inmovilización enzimática.

Formación de agregados

Este tipo de inmovilización consiste en favorecer las interacciones entre proteínas para permitir la formación de agregados a la manera de flóculos. Las interacciones pueden ser de naturaleza física adicionando polímeros floculantes o química a través de reactivos bifuncionales como el glutaraldehído, sulfato de amonio y polietilenglicol. Los agregados físicos son más usados cuando se desean inmovilizar células enteras, provocando las uniones por adhesión entre la pared celular de un cúmulo de células, de esta manera quedan inmovilizadas entre ellas, lo cual permite mejoras en procesos biotecnológicos aplicados en alimentos, biocombustibles y producción industrial de péptidos (Bauer *et al.*, 2010). De otro lado, los agregados por agentes químicos denominados CLEA (*cross-linked enzyme aggregates*) tienen mayor aplicación en sistemas enzimáticos porque se basan en

las técnicas convencionales de precipitación de proteínas como *salting-out* y precipitación por solventes o polímeros. Este método es atractivo en biocatálisis debido a que no se necesita un soporte para la enzima, lo cual lo hace más simple y de bajo costo de producción. Sin embargo, los agregados poseen alta densidad de las proteínas lo cual produce restricciones difusionales entre sustratos y productos al interior de los agregados (Illanes *et al.*, 2012). En la figura 13 se muestra esquemáticamente la inmovilización por formación de agregados.

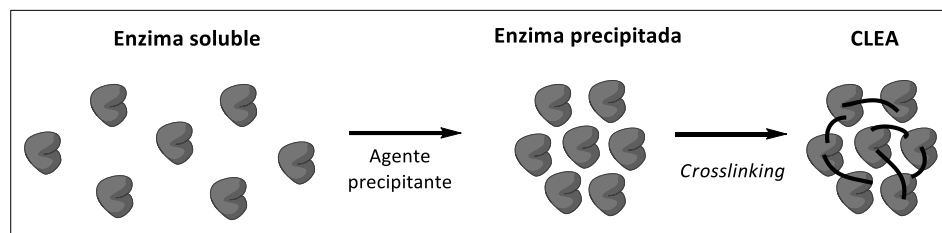


Figura 13. Clasificación y descripción general de los métodos de inmovilización enzimática.

Los desarrollos en CLEA de última generación involucran el uso de materiales como siloxano para reforzar y modular las propiedades físicas del agregado tales como las interacciones de hidrofóbicas e hidrofílicas y el tamaño de partícula final. La formación de los agregados en emulsiones agua-en-aceite también son métodos recientes que permiten su aplicación en enzimas como lipasas. Producir CLEAs adicionando magnetitas proporcionan características magnéticas que permiten la decantación magnética o que pueden ser usadas en reactores fluidizados por magnetismo aportando combinaciones novedosas de bioconversiones y etapas de recuperación y purificación de productos. Otro enfoque con relevancia ambiental es la aplicación de CLEAs en procesos en cascada para minimizar etapas de reacción y subproductos, se trata de acoplar enzimas para direccionar el equilibrio químico hacia los productos cuando las características de equilibrio son desfavorables, esto se logra por co-precipitación enzimática y la formación de CLEAs con dos enzimas de interés, denominada “combi CLEA”. Un ejemplo es la combinación de catalasa y glucosa oxidasa para la degradación rápida del peróxido de hidrógeno formado en la oxidación aeróbica de la glucosa (Sheldon y van Pelt, 2013)

Las aplicaciones de CLEAs en enzimas pectinolíticas se han basado en precipitación por salado y adición de glutaraldehído, formando agregados que también tuvieron actividad residual de celulasas y xilanasas (Hiteshi *et al.*, 2013). Dalal *et al.*, (2007) caracterizaron diferentes sistemas CLEA adicionando n-propanol, acetona o dimetoxietano como agentes precipitantes y estabilizando los agregados variando las concentraciones de glutaraldehído hasta 40 mM, obteniendo actividad pectinolítica elevada.

Unión a soportes

La inmovilización por unión a soportes se basa en fijar las enzimas a la superficie de un material sólido valiéndose de atracciones por adsorción o por la formación de enlaces covalentes entre residuos de aminoácidos de la proteína y la superficie funcionalizada del material. Los soportes pueden ser materiales inorgánicos como sílice, arcillas, óxidos de metales, vidrio y cerámicas. También existen variados materiales orgánicos, los más usados son los polímeros naturales derivatizados, principalmente agarosa, celulosa, alginato, quitina y quitosano con modificaciones en su superficie para promover la unión enzimática. En el mismo sentido, han sido empleados algunos polímeros sintéticos como poliolefinas y polímeros acrílicos para la inmovilización de proteínas por unión a soportes (Arroyo, 1998).

Las uniones por **adsorción** se dan por fuerzas iónicas de *Van der Waals* y puentes de hidrógeno, están reguladas por factores como el pH que modifica las cargas tanto de la proteína como del soporte y la presencia de iones que provee la fuerza iónica para conservar o modificar las interacciones. La naturaleza reversible de este tipo de interacciones, fundamentalmente electrostáticas, requiere de un equilibrio en las condiciones de pH y fuerza iónica. Los soportes más empleados, mostrados en la figura 14, son de partículas de agarosa modificada en su superficie con grupos amino, es el caso de DEAE-agarosa (dietilaminoetil), MANAE-agarosa (monoaminoetil-N-aminoetil), IDA-agarosa (ácido iminodiacético) y PEI-agarosa (polietilenimina).

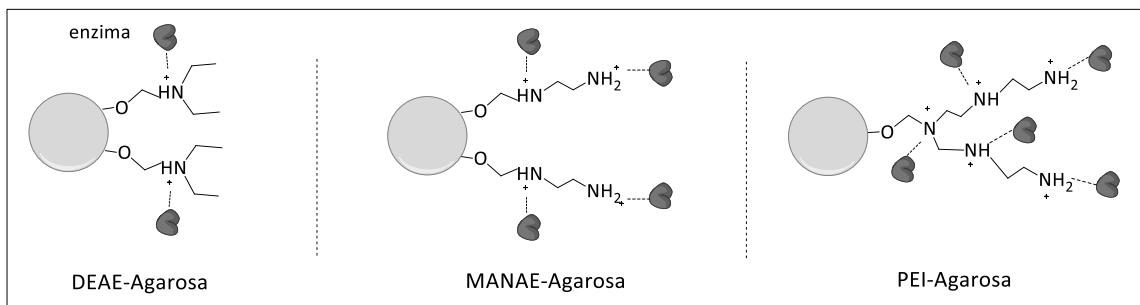


Figura 14. Representación esquemática de enzimas inmovilizadas en soportes por adsorción.

Las uniones **covalentes** se dan por la formación de un enlace entre el soporte y aminoácidos expuestos de la proteína. Los grupos reactivos usados para este tipo de inmovilización son los aminos, carboxilos, hidroxilos y sulfhidrilos; los soportes son de carácter hidrofílico, comúnmente son polisacáridos como celulosa, dextrano y agarosa modificados para promover la formación de los enlaces químicos. Adicionalmente, los grupos hidroxilo sin reaccionar proveen un ambiente polar que estabiliza la estructura de las proteínas próximas al soporte o también se neutralizan para que éste no quede activo (Figura 15).

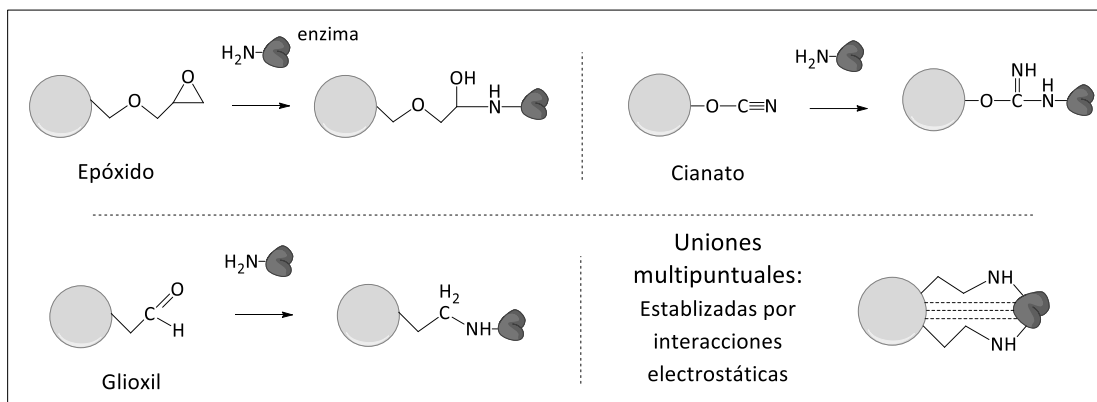


Figura 15. Representación esquemática de enzimas inmovilizadas en soportes por unión covalente.

La implementación de unión a soportes de diferentes proteínas de interés biocatalítico, ya sea por adsorción o enlaces covalentes, ha mostrado beneficios respecto de la estabilidad enzimática, mayor adaptabilidad a condiciones de reacción en rangos amplios de pH, estrés iónico y presencia de agentes quelantes y de iones metálicos. Sin embargo, las condiciones específicas de inmovilización, la carga protéica, los niveles de saturación del soporte y las condiciones de reversibilidad de los procesos adsortivos, dependen de cada grupo enzimático en particular. Estudios con lipasas, alcohol deshidrogenasas, catalasas, lacasas, lisozima y reductasas, inmovilizadas en partículas porosas de sílica, partículas de agarosa, celulosa y resinas porosas comerciales como Lewatit, demuestran diferentes estrategias metodológicas para la inmovilización y su posterior aplicación como derivados con elevada actividad enzimática (Bolivar *et al.*, 2015). Para enzimas pectinolíticas, se han usado resinas de intercambio iónico con elevadas interacciones electrostáticas (St-DVB), y también han resultado adecuados materiales como glioxil-agarosa y sílica gel aminada. Más recientemente, se ha demostrado que los huesos residuales de industria de aves de corral, con tratamientos de molienda y activación con grupos reactivos también pueden ser usados para la inmovilización de pectinasas comerciales (Hiteshi *et al.*, 2013). La selección del material de soporte, será entonces una decisión basada en sus características, la disponibilidad y viabilidad económica y la compatibilidad con las propiedades bioquímicas de la proteína de interés.

Atrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima dentro de una matriz porosa constituida por polímeros que conforman una red entrecruzada, los cuales retienen agua en su estructura otorgando al material características del estado coloide con apariencia sólida (Figura 16). El proceso de inmovilización se desarrolla mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero o del prepolímero. Posteriormente, se realiza la polimerización por la adición de un agente químico que favorece la polimerización completa (hidrogeles) o por un cambio de temperatura (termogeles). Dado que la enzima queda confinada en la red polimérica, ésta no sufre ninguna alteración en su estructura. Sin embargo, el atrapamiento requiere de un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína.

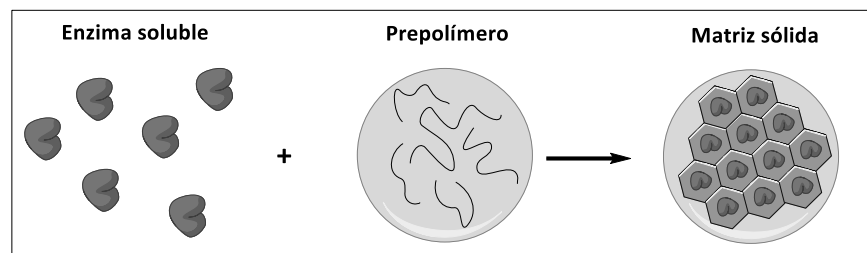
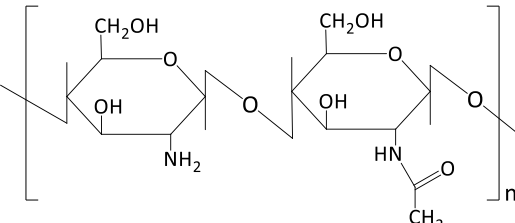
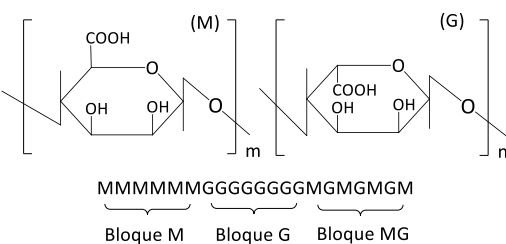
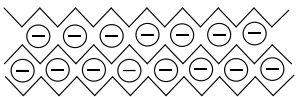
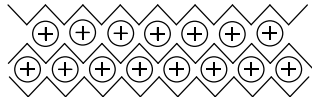


Figura 16. Representación del proceso de inmovilización por atrapamiento.

- a. La polimerización de los **hidrogeles** se produce por la presencia de iones que favorecen la formación de zonas de unión en la cadena polimérica en un medio de reacción con el pH adecuado para la estabilización de las cargas del polímero. De esta manera, las condiciones para la polimerización ionotrópica dependerán de las características y naturaleza química del polímero; los más usados para la inmovilización enzimática son el quitosano y el alginato. En la tabla 4 se presenta un resumen de la estructura y características de los hidrogeles formados por estos polímeros naturales.

Tabla 4. Características generales de los hidrogeles quitosano y alginato para la inmovilización enzimática.

Características	Quitosano	Alginato
Fuente	Quitina desacetilada Crustáceos	Ácido alginico Algas pardas
Monómeros	D-glucosamina Acetil-D-glucosamina	Ácido gulurónico Ácido manurónico
Estructura		
Carga	Catiónica	Aniónica
Polimerización ionotrópica	Iones fosfato Polifosfatos	Cationes divalentes (Ba ⁺² , Sr ⁺² , Ca ⁺² , Zn ⁺² , Mn ⁺²)
pH estabilidad	9 - 13	4 - 8
Desintegración	Medio ácido	Medio alcalino
Modelo <i>egg-box</i>		

b. Algunos hidrogeles son **polímeros sintéticos** que también son empleados para el atrapamiento de proteínas. Los más usados son la poliacrilamida y el polivinilalcohol (PVA), ambos homopolímeros con estructuras como se muestran en la figura 17. Éstos pueden formar reticulados y ramificar sus cadenas con reactivos adicionales como alcoholes y ácidos. El gel de poliacrilamida se forma a partir del monómero y dos catalizadores, el persulfato de amonio (PSA) como iniciador que genera radicales libres y el tetrametiletilendiamina (TEMED) que propaga la polimerización. Aunque el monómero de acrilamida posee un elevado grado de toxicidad, al completarse la polimerización se disminuye la concentración del mismo y en consecuencia su toxicidad, por lo cual puede ser aplicado en sistemas biológicos como biocatálisis. De otro lado, el PVA se prepara indirectamente, primero por polimerización del vinilacetato y después, en un medio de reacción alcalino y con etanol, es convertido al PVA eliminando los grupos acetato.

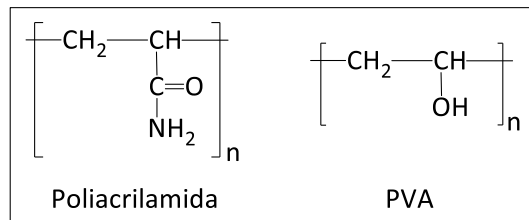


Figura 17. Estructura molecular de los polímeros sintéticos poliacrilamida y polivinilalcohol (PVA).

Estas matrices poseen características químicas de mayor resistencia que los polímeros naturales, son capaces de tolerar elevadas temperaturas o la presencia de agentes quelantes. Sin embargo, las condiciones de polimerización en presencia de las proteínas pueden alterar irreversiblemente los grupos reactivos de las enzimas.

- c. Las matrices de **termogeles** se producen por efecto térmico y la polimerización se desarrolla debido al enfriamiento de una solución caliente del prepolímero (60 – 90 °C). Inicialmente se produce una formación de hélices de la cadena polimérica, luego éstas se van asociando hasta formar zonas de unión que se rigidifican y forman el gel estable e insoluble. Este proceso es reversible, la forma soluble del gel se denomina estado sol y durante el enfriamiento se presenta la transición sol-gel hasta que se conforma la estructura sólida de la matriz (Figura 18).

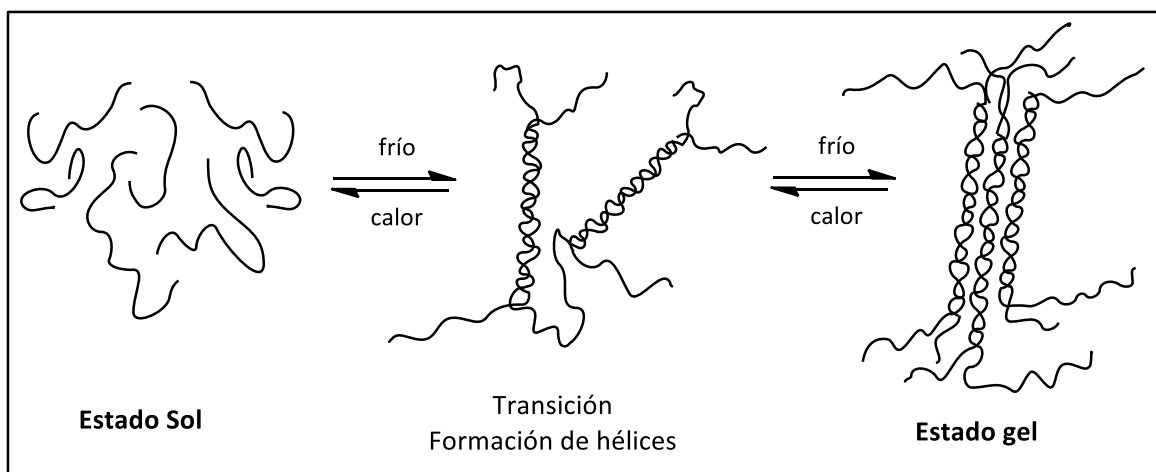


Figura 18. Proceso de solidificación de termogeles por formación de zonas de unión.

Los termogeles empleados usualmente para la inmovilización son la agarosa, agar y carragenano, polisacáridos naturales provenientes de algas marinas. También se usa la gelatina, un polipéptido constituido principalmente de colágeno de origen animal.

Los polisacáridos están correlacionados molecularmente debido a que su unidad estructural es el disacárido de la galactosa y la galactosa anhidra (Figura 19).

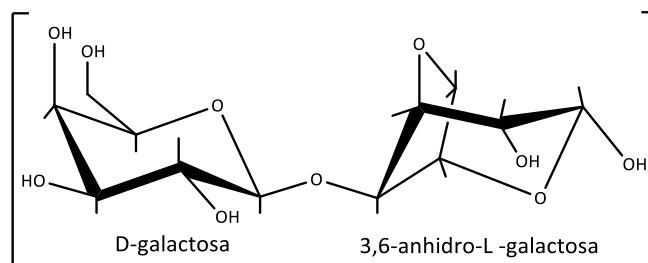


Figura 19. Disacárido estructural de termogeles naturales.

La agarosa es un polímero neutro con unidades repetidas del disacárido, el agar es una mezcla de agarosa y agaropectina en la que se alternan unidades de galactosa y galactosa modificada por grupos ácidos y piruvato y su carga es ligeramente aniónica (Mohammed *et al.*, 1998). Finalmente, el carragenano es altamente sulfatado y de acuerdo a la ubicación de los grupos sulfato dentro del disacárido estructural, se clasifica en κ -carragenano, ι -carragenano y λ -carragenano. Debido a su carga altamente aniónica, su polimerización y estabilización también se favorece por la presencia de cationes, de modo similar de los hidrogeles como el alginato.

Los biocatalizadores enzimáticos inmovilizados en matrices poliméricas conservan la actividad enzimática debido a la naturaleza física de la retención de las proteínas, es por ello que los rendimientos de las reacciones catalizadas se mantienen en niveles altos. Una retención efectiva de las enzimas dentro de la matriz depende principalmente de la concentración del polímero, ya que a mayor concentración se reduce el tamaño de poro mejorando el atrapamiento, sin embargo, tiene que existir un balance tal que la porosidad de la matriz retenga las enzimas sin afectar negativamente la difusión dentro del material para el intercambio de sustratos y productos (Gulrez *et al.*, 2003). El atrapamiento de celulasas, amilasas, glucosidasas y una fructosiltransferasa en alginato ha permitido elevada actividad catalítica empleando alginato en un rango del 2 al 6% usando principalmente calcio como agente para la polimerización ionotrópica (Andriani *et al.*, 2012; Gangadharan *et al.*, 2009). El uso de agar para el desarrollo de catalizadores con actividad xilanasas, α -glucosidasas también resultó eficiente y permitió la reutilización del catalizador durante varias reacciones sucesivas (Bibi *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2014b). De modo similar, la poli(acrilamida) (10% p/v) retuvo satisfactoriamente una pectinasa bacteriana con actividad alcalofílica, proporcionándole especial estabilidad a 50 °C.

Matrices mixtas

El concepto de matrices mixtas deriva de la combinación de métodos y materiales para la inmovilización de proteínas resultando en una matriz polimérica aditivada que permite su contención, para ello se usan diferentes tipos de hidrogeles que mezclados favorecen la estabilidad de la matriz mejorando algunas propiedades como la resistencia térmica y mecánica; también se usan las enzimas unidas a soportes con tamaño de partícula de orden nanométrico que posteriormente se atrapan dentro de la matriz. Estos métodos son más recientes y han resultado de la necesidad de incrementar la productividad de los procesos biocatalíticos produciendo nuevos desarrollos en materiales que provean protección a los sitios catalíticos de las enzimas, resistan por largos períodos las condiciones de operación de las reacciones, como el estrés mecánico y la fuerza iónica, minimicen los efectos de barrera difusional y la actividad enzimática específica se conserve a niveles similares a los de la enzima libre.

El uso de nanoarcillas para la adsorción de enzimas y la elaboración de matrices mixtas ha sido un tema de novedad para su aplicación en bioprocesos debido a su elevada superficie específica, su disponibilidad como mineral natural y sus características fisicoquímicas que lo hace un material biocompatible.

Morfológicamente, las nanoarcillas poseen una estructura plana formada por capas individuales de aluminosilicatos que, según el tipo de mineral, pueden estar compuestas por dos, tres o 4 hojas de octaedros de $[\text{AlO}_3(\text{OH})_3]^6$ o tetraedros de $[\text{SiO}_4]^{-4}$, ordenadas y apiladas una sobre otra con interacciones del tipo *Van der Waals* que son regulares entre ellas. Estas capas poseen una carga neta negativa que puede ser estabilizada mediante cationes o moléculas que ocuparían el espacio inter-capas, siendo los más usados el Na^+ , K^+ , Mg^{+2} y el Ca^{+2} (Essabir *et al.*, 2016). Las arcillas principales son las vermiculitas, cloritas, halositas, bentonitas y montmorilonitas, sus capas pueden modificarse funcionalizando la superficie e incorporando polímeros para el desarrollo de nanocompuestos que pueden ser aplicados a sistemas biológicos (Gopinath y Sugunan, 2006). Existen reportes en los que se inmovilizan amilasas, invertasas, lipasas y pectinasas con resultados positivos, incluso a escalas mayores en diferentes configuraciones de biorreactores.

Algunos ejemplos de matrices mixtas por combinación de polímeros (gel-gel) dan cuenta de la factibilidad técnica y biocatalítica de implementar este sistema cuya principal ventaja es un efecto plastificante que reduce la fragilidad de las matrices haciéndolas más elásticas y por ende menos quebradizas (Datta *et al.*, 2013). En este sentido, se reportó la inmovilización de una celobiasa usando alginato de sodio y quitosano y resultó en un

biocatalizador de alta actividad para la conversión de celobiosa a glucosa, un paso importante en la degradación completa de celulosa a unidades de glucosa (Wang *et al.*, 2009). En otro estudio, se empleó una matriz compuesta por metilmetacrilato recubierta de quitosano de diferente peso molecular para el desarrollo de un biocatalizador con actividad lipasa y pectinasas positiva. El sistema dual desarrollado presentó una actividad catalítica elevada y estabilidad operacional siendo aplicado efectivamente para la remoción de residuos aniónicos de aguas residuales de industria del papel (Liu *et al.*, 2012). Adicionalmente, la inmovilización por formación de agregados empleando glutaraldehído y su posterior atrapamiento en quitosano, permitió mayor grado de entrecruzamiento de la matriz (Kohli y Gupta, 2015).

Por otro lado, la inmovilización a través de matrices compuestas del tipo soporte-gel ha resultado adecuada para algunos sistemas biocatalíticos, empleando tanto células enteras como enzimas. Un estudio en el que se usa sílica recubierta de quitosano para la inmovilización de una poligalacturonasa comercial (Fluka) mostró mejoras en algunas características como estabilidad al pH, a la temperatura y a diferentes condiciones de almacenamiento (Lei *et al.*, 2007). También se han desarrollado matrices compuestas de partículas magnéticas de Fe₃O₄ empleando capas de polielectrolitos (PEI/sílica), mostrando elevada actividad enzimática y facilidad en la separación de los productos de reacción (Lei *et al.*, 2007). Con respecto de nanocompuestos con arcillas, Abd Rahim *et al.*, (2013) emplearon alginato de sodio reforzado con caolinita para inmovilizar celulasa, α -amilasa, y glucoamilasa y se cuantificaron los parámetros cinéticos para cada sistema, obteniendo ventajas en afinidad por diferentes sustratos y reusabilidad en las reacciones. De manera similar, Gopinath y Sugunan (2006) estudiaron un sistema mixto, la nanoarcilla adicionada fue montmorillonita y se inmovilizaron α -amilasa, invertasa y glucoamilasa mediante dos técnicas, adsorción y unión covalente por activación con grupos carboxilo, para posteriormente implementar los biocatalizadores en dos configuraciones de reactor, batch agitado y de columna empacada. Los resultados fueron más favorables usando el biorreactor de columna, debido probablemente a menores restricciones difusionales. En el laboratorio de Investigaciones en Biotecnología Sustentable se han desarrollado matrices nanocompuestas inmovilizando células enteras de *Lactobacillus animalis* ATCC 35046 para la biosíntesis de floxuridina, se optimizaron las condiciones de inmovilización determinando la composición (% p/v) de bentonita, alginato de sodio y la concentración de CaCl₂ que permitiera mejores propiedades mecánicas con máximos rendimientos de conversión (Cappa *et al.*, 2016).

PROPIEDADES DE LOS MATERIALES

Las propiedades del material influyen en las interacciones con la enzima que se desea inmovilizar, su conformación espacial y acceso al sitio activo, la actividad enzimática aparente, la transferencia de masa de sustratos y productos y la reología en el medio de reacción. La naturaleza química de la superficie del material, así como el tamaño de las partículas y propiedades viscoelásticas condiciona las interacciones en la interfase sólido-líquido del biocatalizador inmovilizado, afectando las velocidades de reacción (Talbert y Goddard, 2012).

En la figura 20 se presentan las propiedades de los materiales para la inmovilización enzimática clasificados según su impacto en la reactividad que condiciona interacciones entre la enzima, el material y el medio de reacción, la capacidad de carga de proteínas, la movilidad espacial y las características viscoelásticas del material.

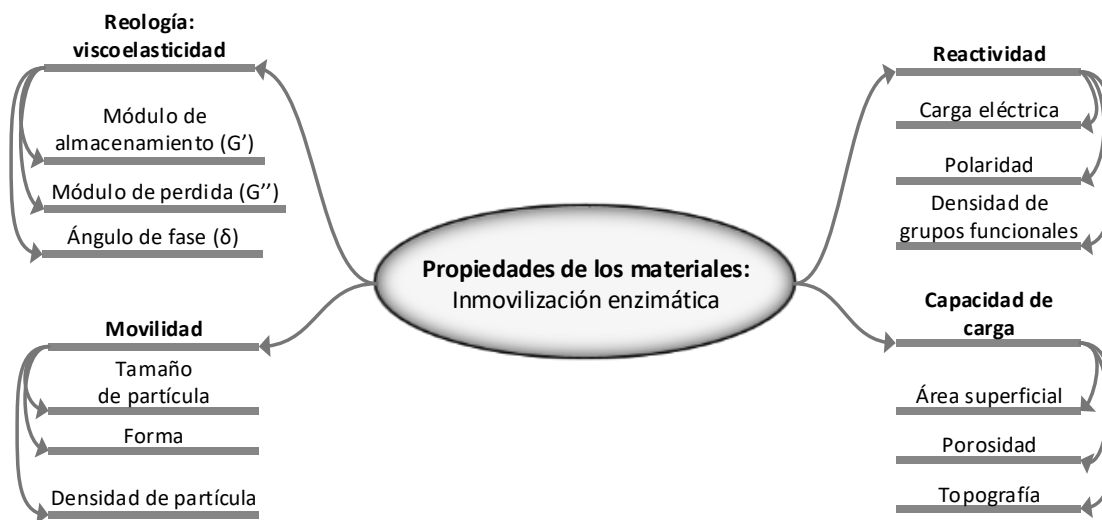


Figura 20. Clasificación de las propiedades de los materiales para la inmovilización enzimática.

Los efectos de la carga eléctrica, la polaridad, hidrofiliicidad y densidad de los grupos funcionales en la superficie del material para la inmovilización pueden gobernar las atracciones o repulsiones con los aminoácidos expuestos de la enzima. Cuando la proteína se encuentra en contacto con el material, se pueden maximizar o minimizar estas interacciones distorsionando la estructura tridimensional de la biomolécula o su orientación y, particularmente, las uniones covalentes pueden rigidificar la estructura de la enzima. Finalmente, estas interacciones pueden alterar significativamente la actividad enzimática.

La capacidad de carga o la carga catalítica expresa la cantidad de proteína que puede retenerse por unidad de masa del material, es por ello que a mayor área superficial de las partículas por unidad de masa o volumen, se puede contener mayor cantidad de enzimas. También la porosidad y las formas de las cavidades y la topografía de las partículas, limitan la carga protéica. Sin embargo, un aumento de tal parámetro no necesariamente produce mayor actividad enzimática del biocatalizador inmovilizado, debido a que las interacciones entre proteínas y su disposición espacial también condicionan el contacto entre la enzima y el sustrato y por ende la velocidad de reacción (Talbert y Goddard, 2012).

Aspectos como el tamaño de partícula, la forma y la densidad de las partículas del material, afectan la movilidad y características de empaquetamiento de las mismas. Estas propiedades son de significancia en cuanto a su implementación en biorreactores, los cuales pueden ser agitados o de lecho, ya sea fijo o fluidizado. La movilidad y características de empaquetamiento del material, así como la viscosidad del medio de reacción, determinan la frecuencia de las colisiones moleculares entre la enzima y el sustrato, de otro lado la porosidad del lecho empacado que se forma al disponerse en una columna, también impactan la cinética de reacción. Los estudios de Jia *et al.*, (2003), demostraron que una reducción en la movilidad de las enzimas unidas a nanopartículas, sumado a otros factores como cambios conformacionales de la proteína, se contribuye a una pérdida de la actividad de las enzimas inmovilizadas.

Las propiedades viscoelásticas de los materiales miden la respuesta mecánica de una muestra bajo un esfuerzo de compresión y la deformación que experimenta el material, éstas consideran las relaciones entre elasticidad, flujo y movimiento de materiales poliméricos (Anseth *et al.*, 1996). Los ensayos que prueban las respuestas mecánicas se realizan bajo condiciones específicas de tensión o compresión, sin embargo, cuando se trata de hidrogeles, son convenientes los ensayos dinámicos los cuales miden la respuesta del material bajo un esfuerzo periódico, es decir, con magnitudes variables en una frecuencia determinada. Estas pruebas, de características sinusoidales, cuantifican un módulo dinámico, definido por las variables denominadas módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G''). El módulo G' describe la porción elástica de los materiales, lo cual indica que a un esfuerzo externo una cantidad de energía es absorbida y almacenada por el material mostrando características de una conformación más sólida y resistente del material. De otro lado, G'' representa la porción viscosa de los materiales, es decir que, ocasionado el esfuerzo externo, la energía que no es almacenada actúa deformando y permitiendo fluir al material, exhibiendo estructuras flexibles que tienden a comportamientos similares a los líquidos. Otra variable característica, es el ángulo de fase (δ) el cual relaciona ambos módulos, considerándose como un factor de amortiguación o

disipación de la energía. Este ángulo varía entre 0° y 90° , siendo valores ideales que no llegan a manifestarse en las pruebas experimentales. Sin embargo, si δ tiende a 0° se puede interpretar que el material es más sólido y presenta mayor resistencia mecánica y si se acerca a 90° las características son más líquidas.

Así que, mediante los estudios dinámicos de reología de los materiales, en un contexto de operaciones en biorreactores, pueden dilucidarse características del grado de polimerización, compactación y ordenamiento de las moléculas en los materiales poliméricos, especialmente de las matrices de inmovilización de proteínas. Y estas magnitudes se pueden analizar bajo efectos de pH, temperatura, fuerza iónica y agentes quelantes. Adicionalmente, puede definirse la energía de fractura de las matrices, analizar procesos de abrasión relacionados a microfracturas continuas en la superficie de las partículas y determinar tiempos de fatiga de los biocatalizadores inmovilizados (Martins Dos Santos *et al.*, 1997).

BIORREACTORES ENZIMÁTICOS Y ESCALADO

Los reactores enzimáticos son unidades de proceso en los cuales ocurren transformaciones bioquímicas catalizadas por enzimas para generar un producto deseado, son ampliamente usados en procesamiento de alimentos, farmacéuticos, biosensores y biotransformaciones. En general, consisten en uno o varios tanques o cilindros que contienen los reactivos y la enzima en una única fase o en fases heterogéneas, como líquidos, gases y sólidos. Adicionalmente, se requiere una transferencia de masa y calor eficiente y transferencia de momento entre fases. Para ello, el biorreactor deberá proveer agitación adecuada, sistemas de regulación de la temperatura (chaquetas o serpentines de calentamiento o enfriamiento), control de pH y válvulas o mecanismos para la recuperación y separación de productos y catalizadores, en el caso que éstos se usen inmovilizados (Doran, 1955; Zhang y Xing, 2011)

Con base en el modo de operación, un reactor enzimático puede clasificarse en continuo o discontinuo. En operación discontinua, las enzimas y sustratos tienen un tiempo de residencia idéntico dentro del reactor y lo ideal es que no existan variaciones espaciales en la concentración de las especies involucradas, reactivos, productos y catalizadores. De otro lado, en la operación continua, el sustrato fresco es alimentado en un flujo másico o volumétrico continuo mientras que la solución de reacción también es removida para conservar un volumen constante (Zhang y Xing, 2011). Ambos modos de operación dependen del sistema enzimático, la estabilidad del biocatalizador y los volúmenes de

producción, entre otros. En la tabla 5 se describen las ventajas y desventajas de cada tipo de operación.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de las operaciones en continuo y discontinuo.

Reactores enzimáticos		
	Discontinuos	Continuos
Ventajas	Operación simple y flexible Fácil control Bajo costo de capital	Operación automatizada Calidad de productos estandarizada Bajo costo de mano de obra
Desventajas	Diferencias entre lotes de proceso Tiempos muertos entre lotes Alto costo de mano de obra	Sistemas de control sofisticados Poca flexibilidad en la operación Alto costo de capital

Independiente del tipo de operación seleccionado para la implementación del proceso, existen diferentes configuraciones de biorreactores para sistemas heterogéneos, los cuales aplican para biotransformaciones con enzimas inmovilizadas. La figura 21 muestra un esquema de los tipos de biorreactores que pueden ser usados para reacciones con enzimas inmovilizadas, en operaciones en continuo o discontinuo.

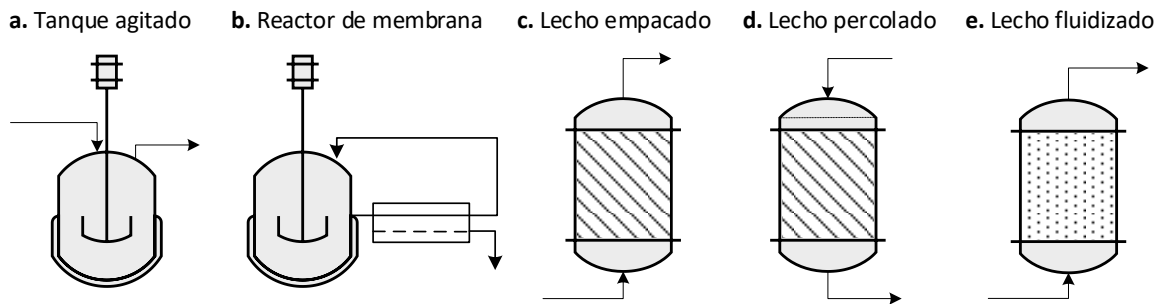


Figura 21. Tipos de reactores enzimáticos para sistemas heterogéneos.

a. Tanque agitado

Consiste en un tanque cilíndrico equipado con un impulsor adherido a un eje de rotación activado por un motor externo. Los tanques en su interior pueden tener deflectores para mejorar los patrones de mezclado y aumentar la transferencia de masa y algunas configuraciones tienen un sistema rociador de aire en la parte inferior para favorecer la transferencia de oxígeno. Este es el tipo de biorreactor más usado y de operación simple, los sustratos y las enzimas se introducen al tanque y son mezclados para llevar a cabo la reacción. El diseño e implementación de tanques agitados con biocatalizadores

inmovilizados debe ser cuidadoso en cuanto que se debe prevenir la desintegración de las partículas sólidas por efectos de cizalla y el estrés mecánico (Catapano *et al.*, 2009; Zhang y Xing, 2011).

b. Reactor de membrana

El biorreactor de tanque agitado se puede acoplar a un módulo de membrana en una configuración de recirculación con el propósito de filtrar o separar continuamente el medio de reacción que contiene reactivos, productos y biocatalizadores, dejando pasar selectivamente los productos de reacción y recirculando el medio. Se han propuesto configuraciones en las que el biocatalizador está inmovilizado dentro de la membrana o estar en agitación dentro del tanque. Las geometrías de la membrana pueden ser tubulares, planas o de fibras ahuecadas y estar en compartimentos independientes y sucesivos para aumentar la frecuencia de contacto entre enzimas y sustratos (Catapano *et al.*, 2009; Zhang y Xing, 2011).

c. Reactor de lecho empacado

También llamado biorreactor de lecho fijo, consiste en una columna llena de un material sólido que soporta las enzimas y está estacionario, es decir, las partículas sólidas tienen restringidos sus grados de libertad y el lecho que forma es perfundido por el flujo continuo de la solución que contiene los sustratos, a medida que los sustratos atraviesan longitudinalmente el lecho va ocurriendo la reacción. El flujo puede ser ascendente o descendente y es usual que haya recirculación del fluido porque así se aumentan los contactos entre enzimas y sustratos y porque en un reservorio adicional a la columna (reservorio de acondicionamiento) se puede acondicionar el medio de reacción en términos de oxígeno, pH o adición de otros reactivos (Catapano *et al.*, 2009; Zhang y Xing, 2011).

d. Reactor de lecho percolado

Este biorreactor es una variación del reactor de lecho empacado en el cual la solución del sustrato es alimentada por la parte superior de la columna y por medio de un rociado, cae gota a gota descendiendo a través del lecho y el líquido forma capas que recubren las partículas, también quedan fracciones de aire entre los espacios del lecho, de esta manera, se presentan tres fases al interior del reactor, la fase sólida que soporta las enzimas, la fase líquida que contiene los sustratos y una fase de aire entre las fracciones vacías del lecho y que no llegan a llenarse del fluido por efecto del rociado. Esta configuración es más usada

cuando las reacciones demandan mayor cantidad de oxígeno o en sistemas de saneamiento de aguas residuales (Doran, 1955; Ilse y Kerim, 2016).

e. Reactor de lecho fluidizado

Consiste en una columna con un lecho de partículas sólidas cargadas con las enzimas inmovilizadas que, a diferencia del lecho empacado, éstas tienen grados de libertad para el movimiento y se conservan en flotación o fluidización por efecto de la velocidad de flujo ascendente de la solución de sustrato. La velocidad del fluido debe ser tal que pueda sustentar las partículas, equilibrando las fuerzas de fricción y flotación y superando la fuerza ejercida por el peso del lecho. Al final, esta velocidad depende del tamaño, forma, porosidad y densidad de las partículas y de la densidad y viscosidad del medio de reacción (Catapano *et al.*, 2009; Zhang y Xing, 2011).

Consideraciones de proceso

Los factores más importantes a analizar para la selección del tipo de biorreactor heterogéneo con enzimas inmovilizadas son las características de las partículas del biocatalizador como tamaño, forma, densidad, estabilidad y compresibilidad, por ejemplo, las partículas pequeñas son convenientes para lechos fluidizados, materiales porosos son útiles para lechos empacados. Adicionalmente, las propiedades físicas de los sustratos, su solubilidad, densidad y viscosidad son factores importantes, si los sustratos tienen baja solubilidad se recomienda usar el biorreactor en operación discontinua o si el fluido de reacción es muy viscoso es difícil de implementar un lecho fluidizado. Son igualmente importantes los requerimientos de la reacción como pH, temperatura, suministro o remoción de gases y demanda de cofactores entre otros. Si por ejemplo la reacción requiere de un ajuste de pH continuamente, conviene un tanque agitado o si es dependiente de oxígeno, un lecho percolado o fluidizado sería una mejor opción. La estabilidad de las enzimas y la resistencia mecánica del material que las soporta también son características a tener en cuenta, además de la cinética de la reacción, las cuales condicionan los tiempos de reacción y la productividad del proceso (Zhang y Xing, 2011).

La cinética enzimática en sistemas con biocatalizadores inmovilizados debe ser estudiada y comparada con la misma enzima en su estado libre. La diferencia en los valores de velocidad máxima de reacción (v_{max}) y afinidad por el sustrato (K_m) están condicionadas por fenómenos de transferencia de masa; la resistencia al contacto entre la enzima y el sustrato y al intercambio de sustratos y productos, es atribuida a la barrera adicional que constituye el material sólido. Una aproximación al comportamiento cinético de los sistemas

enzimáticos es posible mediante la ecuación propuesta por Michaelis Menten y los diferentes métodos de linealización descritos por otros autores (Tabla 6). Durante la reacción enzimática la relación enzima-sustrato cambia según la concentración del sustrato disponible, es así como se puede dilucidar una concentración de saturación de las enzimas disponibles y estudiar fenómenos de inhibición enzimática debido a otras especies en el medio de reacción que puedan interactuar con la enzima y su sitio activo.

Tabla 6. Modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten y sus diferentes ajustes de regresión lineal.

Michaelis Menten: $v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$		
Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee	Hanes-Woolf
$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$	$v = -K_m \frac{v}{[S]} + v_{max}$	$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{max}} [S] + \frac{K_m}{v_{max}}$

Donde v es la velocidad de reacción, v_{max} la velocidad máxima de reacción enzimática a una concentración de sustrato que satura el sistema, [S] la concentración de sustrato y K_m la constante de Michaelis, que expresa la concentración de sustrato en la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.

Escalado

Durante el diseño de un bioproceso de catálisis enzimática, en las últimas etapas de implementación y validación de modelos, es necesario aumentar la escala del mismo, inicialmente las pruebas de laboratorio continúan y se realizan a una mayor capacidad volumétrica y posteriormente el escalado se da a un orden de magnitud que pueda satisfacer procesos para aplicaciones industriales. Durante el escalado, se busca una intensidad del proceso similar a las pruebas de laboratorio, es decir, obtener cantidades similares de producto por unidad de volumen a una mayor capacidad volumétrica del proceso. Existen diferentes métodos para el escalado, el prerequisite para desarrollar los modelos es que se conserve similitud geométrica de las unidades de reacción, lo cual indica que las formas del reactor tendrían que conservarse, manteniendo relaciones como entre la altura y el diámetro de tanques o columnas, entre diámetros de impulsores y tanques o entre dimensiones de deflectores respecto del diámetro del tanque. Posteriormente, se elige el método, que puede ser fundamental, semifundamental o basado en reglas empíricas, en la figura 22 se describe un resumen de dichos métodos.

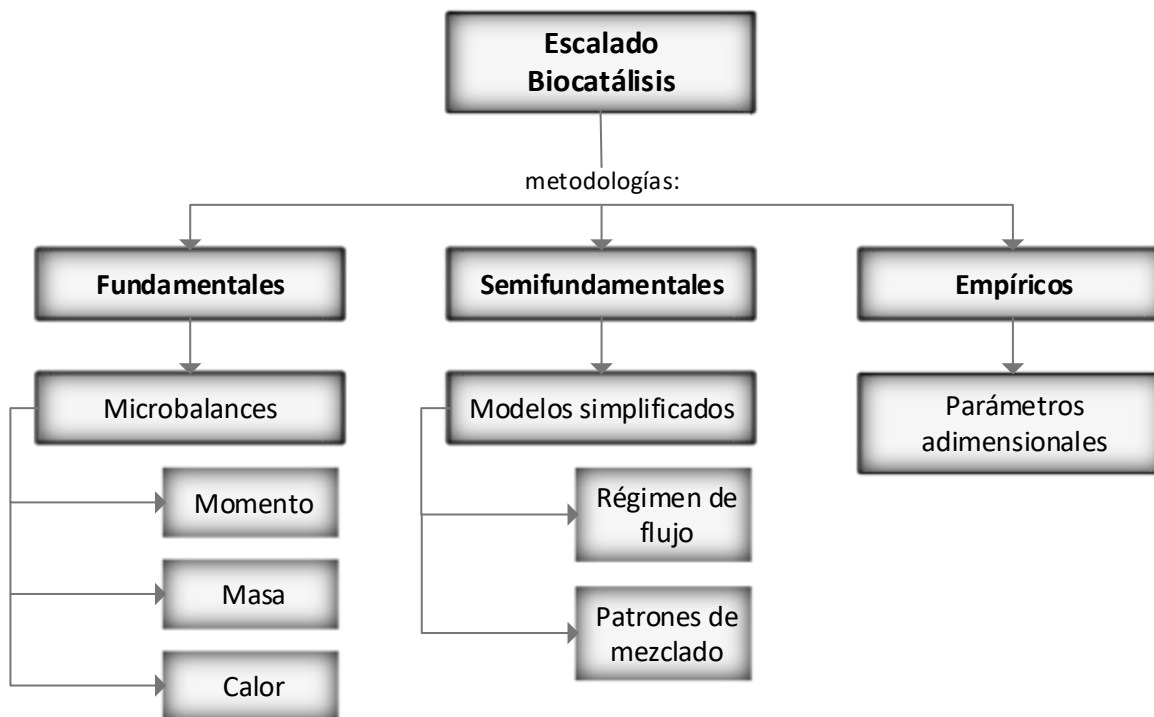


Figura 22. Tipos de reactores enzimáticos para sistemas heterogéneos.

Finalmente, las variables que se consideran más críticas durante el escalado de los procesos son la transferencia de calor para el control de la temperatura, la disipación de la energía medida por la potencia por unidad de volumen, la caída de presión en reactores de lecho empacado, el mezclado, determinado por la velocidad del agitador, el número de Reynolds y la velocidad de los fluidos y, muy significativo en bioprocesos, la contaminación del medio de reacción por microorganismos u otras especies reactivas (Tufvesson *et al.*, 2010).

APLICACIONES: BIOCATÁLISIS CON ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Las enzimas pectinolíticas son de interés comercial por sus aplicaciones en diferentes sectores de la industria. En la figura 23 se indican los principales sectores industriales que se benefician de la actividad catalítica de las enzimas pectinolíticas.

En el procesamiento de alimentos, específicamente para la remoción de cáscaras, la extracción y clarificación de jugos de fruta, se logran mejoras en aspectos como rendimiento y tiempo de procesamiento, extracción y maceración, clarificación y filtrabilidad, estabilidad y sabor (Tapre y Jain, 2014). Adicionalmente, para los consumidores son más atractivos los jugos de baja viscosidad, alta claridad y valor nutricional. También

los biocatalizadores con actividad pectinolítica son útiles para procesos de fermentación de té y café en la hidrólisis de las sustancias pécticas indeseables y, en la preparación de mostos durante la fabricación del vino, generan mayor disponibilidad de azúcares fermentables además que intensifican sabores y colores en el producto final (Garg *et al.*, 2016). En la industria textil, las pectinasas en acción conjunta con amilasas, lipasas, celulasas y hemicelulasas se utilizan para remover impurezas del algodón y evitar el uso de soda cáustica para este propósito, también son útiles para remover residuos no celulósicos de las fibras. Asimismo, facilitan el desgomado de fibras vegetales empleadas en textileras, ofreciendo una alternativa económica y ambientalmente viable (Jayani *et al.*, 2005). En el sector papelerero, estas enzimas se usan como agentes para depolimerizar la pectina de pulpa de papel mejorando los procesos de filtración y de blanqueamiento. Adicionalmente, se han encontrado diferentes ventajas al usar las enzimas en procesos de extracción de aceites vegetales, sabores y pigmentos de origen vegetal y en el tratamiento de aguas residuales con contenido péctico (Garg *et al.*, 2016). Otras aplicaciones de estas enzimas son la preparación de alimentos para animales, mejorando la liberación y adsorción de nutrientes y extracción de virus de plantas (Merín *et al.*, 2011). Más recientemente, las enzimas pectinolíticas se han usado en biorefinerías para hidrolizar la pectina presente en residuos agroindustriales, los cuales se procesan y se depolimerizan hasta azúcares simples que son convertidos a bioetanol o se formulan en medios de cultivo para diferentes biotransformaciones. Adicionalmente, si se controla el grado de depolimerización, se pueden producir fructooligosacáridos, productos con elevado valor agregado usado como nutracéutico.

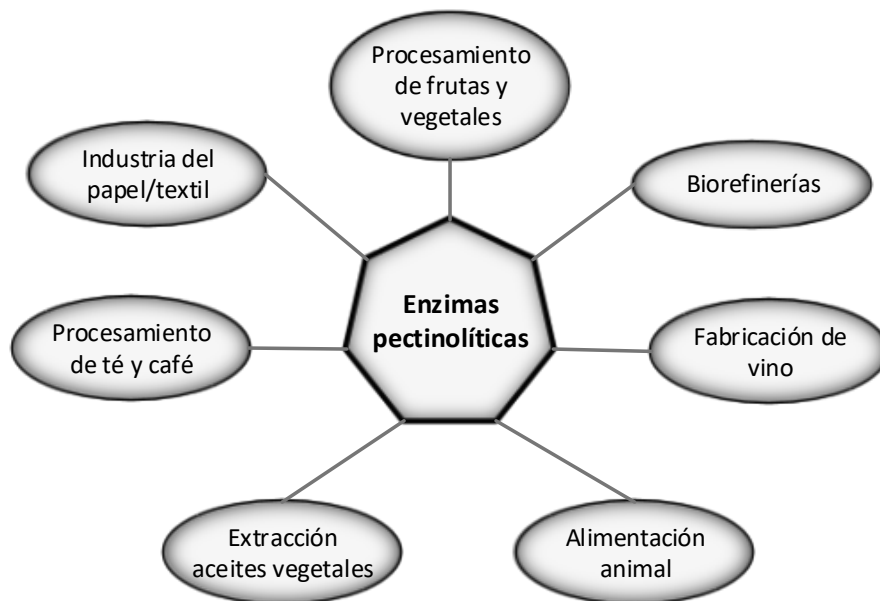


Figura 23. Aplicaciones de enzimas pectinolíticas en diferentes industrias.

METODOLOGÍA

La estrategia metodológica para la ejecución de este trabajo de tesis doctoral se desarrolló de acuerdo a los objetivos específicos formulados oportunamente y clasificados en 4 bloques principales denominados *Fermentación*, *Aislamiento de la enzima*, *Inmovilización y biocatálisis* y *Aplicaciones y escalado* (Figura 24).

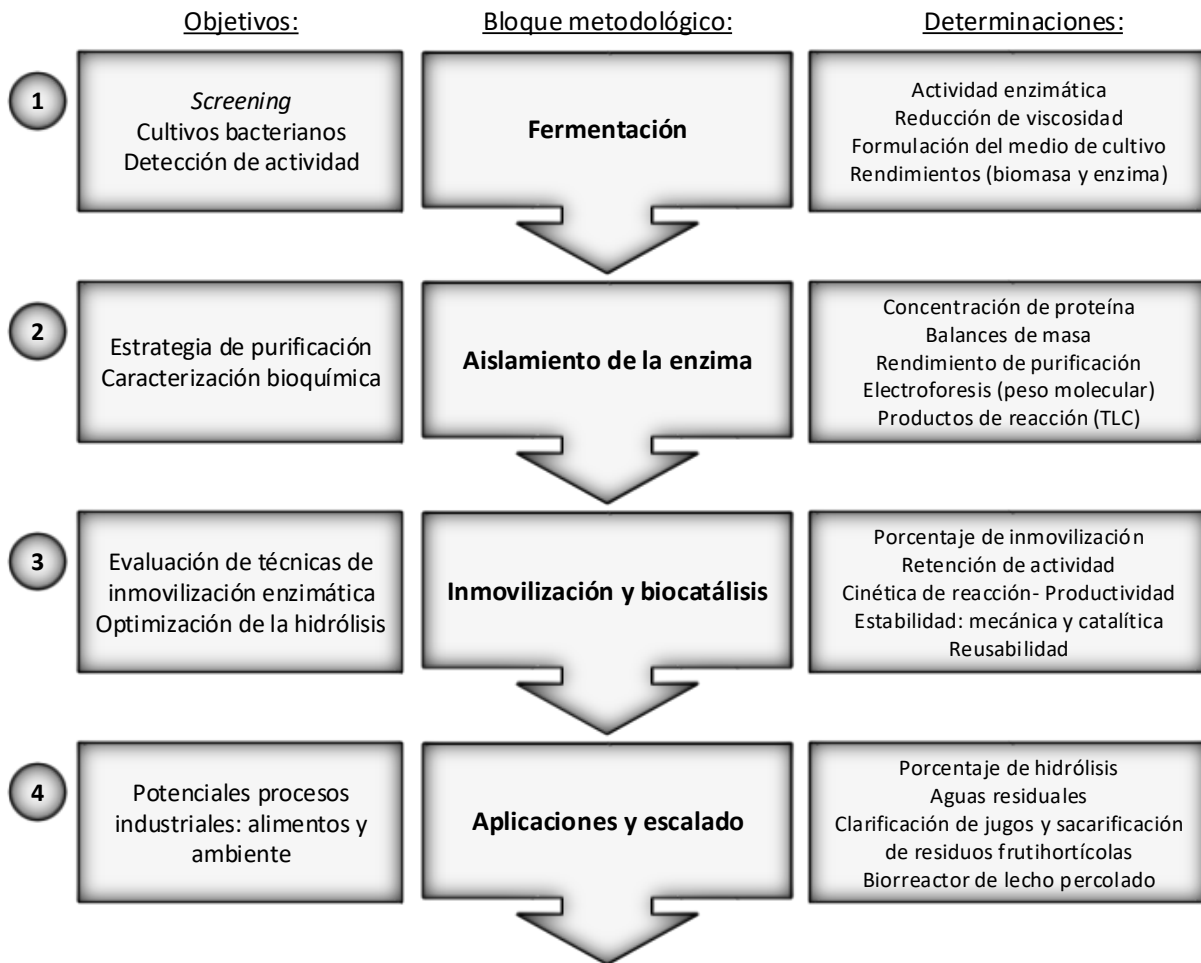


Figura 24. Estrategia metodológica para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados y su aplicación en la industria alimentaria y ambiental.

Las actividades experimentales se iniciaron por el bloque de *Fermentación* con un *screening* sobre el banco de cepas disponible en el Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología Sustentable (LIBioS) de la Universidad Nacional de Quilmes (Argentina) para identificar las bacterias con actividad poligalacturonasa (PG). Se identificaron los microorganismos con potencial para la producción de PG y se procedió a la selección de la mejor cepa bacteriana

en términos de productividad, tanto de la fermentación como de la reacción enzimática. Adicionalmente, se plantearon diseños experimentales para la ingeniería de medio de cultivo y la determinación de condiciones de operación con el fin de favorecer una mayor producción enzimática. La etapa de *Aislamiento de la enzima* se fundamentó en la recuperación, concentración y purificación de la proteína de interés obtenida por métodos de precipitación, ultrafiltración y electroforesis. Posteriormente, se identificaron características de estabilidad de la enzima libre a pH, temperatura y almacenamiento y se determinaron las condiciones de reacción que maximizaron la hidrólisis del ácido poligalacturónico. Seguidamente se desarrolló el bloque de *Aplicaciones y escalado*, empezando por la inmovilización de la enzima evaluando métodos de unión a soportes por adsorción y enlaces covalentes, atrapamiento y matrices mixtas, optimizando las condiciones del proceso de inmovilización. A continuación, se evaluaron parámetros de biocatálisis como estabilidad de los inmovilizados y reusabilidad. Finalmente, en la etapa de *Aplicaciones y escalado* se plantearon procesos con potencial industrial de los biocatalizadores inmovilizados con actividad poligalacturonasa y se evaluó el desempeño de un biorreactor de lecho percolado.

1. FERMENTACIÓN

El estudio de los cultivos bacterianos se realizó mediante fermentaciones, iniciando con condiciones generalizadas con el propósito de realizar un *screening* primario que permitiera descartar las cepas sin actividad PG y continuando con condiciones de fermentación optimizadas en cuanto a nutrientes y tiempos de producción enzimática de la cepa seleccionada.

Screening

A través de una revisión de literatura se identificaron los géneros bacterianos que han demostrado ser positivos para actividad pectinolítica. A partir de la información analizada, se seleccionaron 100 cepas pertenecientes al banco bacteriano de LIBioS para evaluar su capacidad metabólica de hidrolizar pectina, las cepas se conservaron en glicerol estéril al 20% (p/v) a -80 °C. Las células se activaron en cultivos líquidos entre 16 y 24 horas en agitación a 180 rpm en *shaker* orbital (Forma Scientific 439) a la temperatura de incubación y el medio de crecimiento de acuerdo a cada género (Tabla 7). Los cultivos celulares se realizaron a escala de matraz de 100 mL y un volumen ocupado de 10 mL tomando una alícuota de los crioviales de conservación.

Tabla 7. Géneros de las cepas bacterianas evaluadas en el *screening* de actividad poligalacturonasa y composición del medio de cultivo para el crecimiento celular.

Género bacteriano	Cantidad cepas	Medio de crecimiento	Composición (g/L)
<i>Arthrobacter</i>	2	LB	
<i>Escherichia</i>	1	LB	Extracto de levadura: 5
<i>Enterobacter</i>	3	LB	Peptona de carne: 10
<i>Pseudomonas</i>	3	LB	NaCl: 10
<i>Flavobacterium</i>	1	LB	
<i>Achronobacter</i>	2	2	
<i>Aeromonas</i>	8	2	
<i>Agrobacterium</i>	1	2	
<i>Klebsiella</i>	2	2	Extracto de carne: 1
<i>Proteus</i>	3	2	Extracto de levadura: 2
<i>Bacillus</i>	7	2	Peptona de soja: 5
<i>Brevibacterium</i>	2	2	NaCl: 5
<i>Erwinia</i>	4	2	
<i>Citrobacter</i>	3	2	
<i>Enterococcus</i>	3	2	
<i>Lactobacillus</i>	6	8	
<i>Chromobacterium</i>	1	8	
<i>Micrococcus</i>	1	8	Tripeína: 15
<i>Lactococcus</i>	1	8	Peptona de soja: 5
<i>Weibsellia</i>	1	8	NaCl: 5
<i>Pediococcus</i>	1	8	
<i>Leuconostoc</i>	2	8	
<i>Cellulomonas</i>	2	33	Extracto de levadura: 10
<i>Thermonospora</i>	2	33	Glucosa: 20
<i>Corynebacterium</i>	2	33	
<i>Xanthomonas</i>	4	54	Infusión de papas: 200
<i>Serratia</i>	3	54	Glucosa: 20
<i>Streptomyces</i>	17	56	Extracto de levadura: 4
			Extracto de malta: 10
<i>Geobacillus</i>	3	56	Glucosa: 4
Psicrófilos*	9	2	(*especies sin identificar)

El inóculo de cada cepa se realizó en el medio de crecimiento, a partir de las 16 horas del cultivo se realizaron mediciones de densidad óptica en espectrofotómetro UV-visible (PG Instruments) a una longitud de onda de 600 nm (DO₆₀₀) cada 2 horas hasta determinar la mayor concentración celular para inocular las bacterias en un medio de cultivo con contenido de pectina para inducir la síntesis enzimática. El medio de cultivo inductor

contiene los siguientes componentes: 10 g/L de pectina cítrica, 1 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona de soja, 2.5 g/L de NaCl, 0.5 g/L de MgSO₄ y 1 g/L de KH₂PO₄ (Ismail, 1996). Se ajustó el pH a 7 y se inocularon los cultivos con una concentración celular de 5x10⁷ unidades formadoras de colonia UFC/mL de cada una de las cepas evaluadas.

A partir de 16 horas de fermentación se midió la DO₆₀₀ de los cultivos y se realizaron mediciones periódicas a intervalos de 2 horas hasta determinar el tiempo de máxima concentración de biomasa, momento en el cual se colectaron 2 mL del medio líquido y se centrifugó a 8000g durante 10 minutos (Presvac EPF-12). Los extractos libres de células se almacenaron a una temperatura de 4 °C durante un tiempo máximo de 36 horas para determinar su actividad PG. La pureza de los cultivos se confirmó por tinción de Gram y sembrado en placa Petri por el método de agotamiento, confirmando la morfología de las colonias a las 16 horas de crecimiento en incubadora (ORL S.A.).

La selección de las cepas bacterianas con mayor potencial para la síntesis de PG se realizó con base en la actividad PG (U/mL y reducción de la viscosidad) que presentó el extracto de cada una de las bacterias a las 24 horas. El control negativo fue un tratamiento abiótico y como control positivo se utilizó una cepa de *Bacillus sp.* Los cultivos del *screening* y sus correspondientes mediciones de actividad PG se realizaron por duplicado.

Posteriormente, se validaron los resultados del *screening* mediante nuevos cultivos de las 12 cepas que presentaron mayor actividad enzimática, dicho procedimiento fue realizado por triplicado. Finalmente, se seleccionaron 5 cepas a las cuales se les realizó un estudio más detallado, identificando la cinética de fermentación y la actividad enzimática en cada etapa del crecimiento celular

El análisis de la cinética de fermentación se realizó mediante cultivos en matraz de 250 mL con 25 mL de medio tomando muestras de 1 mL cada 4 horas durante 48 horas y se midió DO₆₀₀ y actividad PG y los resultados obtenidos permitieron identificar la cepa con máxima actividad y mayor productividad.

Cuantificación de actividad enzimática

La cuantificación de actividad PG se realizó por métodos espectrofotométricos y viscosimétricos modificados y adaptados según reportes previos (Debing, 2006). Se tomaron 0.1 mL del extracto enzimático y se adicionaron 0.4 mL del sustrato de la reacción enzimática, preparado con ácido poligalacturónico (Sigma Aldrich) al 1% (p/v) en solución 0.1 M de buffer citrato-fosfato a pH 7. Las muestras se incubaron a 45 °C durante 20 minutos

y la generación de azúcares reductores se midió con el método DNS (Miller, 1959) empleando ácido D-galacturónico como estándar. Adicionalmente, se prepararon dos tipos de blancos, uno de sustrato que corresponde a la misma solución de pectina (0.4 mL) con 0.1 mL de buffer citrato-fosfato, y el segundo blanco corresponde al extracto enzimático, el cual es la mezcla de 0.1 mL del extracto enzimático y 0.4 mL del buffer. Ambos blancos se sometieron al mismo procedimiento de las muestras y se emplearon para restarle a cada reacción la cantidad de azúcares reductores que aportan tanto la solución de pectina como el extracto enzimático.

Una unidad de actividad PG (U/mL) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar la pectina y formar 1 μmol de ácido D-galacturónico por minuto en las condiciones de reacción especificadas.

La determinación viscosimétrica se basó en la cuantificación del porcentaje de reducción de la viscosidad por efectos la acción depolimerizante de la enzima (% reducción- η). Se mezclaron 0.1 mL del extracto enzimático con 0.9 mL de la solución del sustrato y la mezcla se incubó a 45 °C durante 10 minutos, la reacción se detuvo mediante ebullición y se midió la viscosidad (Pa.s) en un reómetro de platos paralelos (AR-G2/TA Instrument) a 24 °C fijando una razón del esfuerzo de corte a 300 s^{-1} durante 3 minutos.

***Streptomyces halstedii* ATCC 10897, condiciones de fermentación y diseño de medio de cultivo**

Con el propósito de optimizar las condiciones de operación de la fermentación y los componentes nutricionales para *S. halstedii* ATCC 10897 que permitieron obtener la máxima actividad enzimática, se implementó una metodología de diseños de experimentos secuenciales. Se inició con un diseño unifactorial para determinar el efecto del pH inicial del cultivo, seguido de dos diseños adicionales para determinar la fuente de carbono y de nitrógeno que maximiza la producción enzimática. Finalmente, se realizó una cinética de la fermentación bajo las condiciones óptimas. En la tabla 8 se describen los tratamientos evaluados en cada diseño experimental, las variables de respuesta definidas y los análisis estadísticos de los resultados.

Tabla 8. Secuencia de diseños experimentales para la fermentación de *S. halstedii* ATCC 10897 y formulación de medio de cultivo para actividad PG.

Diseño 1		Diseño 2		Diseño 3	
Unifactorial		Unifactorial		Factorial 3 ²	
pH inicial		Pectina cítrica (g/L)		Peptona de soja (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
3		0.0		0	0
4		2.5		0	3
5		5.0		0	6
6		7.5		3	0
7		10.0		3	3
8		12.5		3	6
9				6	0
10				6	3
				6	6

Variables de respuesta: Biomasa (DO₆₀₀) – Actividad PG (U/mL y %-reducción-η)

Análisis: ANOVA, comparación de medias (prueba LSD) - nivel de confianza 95%

El cultivo del microorganismo se inició con la preparación del preinóculo como se describió en el inciso anterior, la fermentación se realizó por un período de 24 horas, se conservó la formulación de las sales según el medio inductor (Ismail, 1996) manteniendo la temperatura a 28 °C y agitación a 180 rpm. Al término del período se recuperó el extracto enzimático para evaluar DO₆₀₀ y actividad PG.

Para la formulación de las principales fuentes de carbono y nitrógeno, se realizó una revisión bibliográfica enfocada tanto a la demanda nutricional del género *Streptomyces* como a los componentes que pueden inducir la actividad PG en bacterias, razón por la que fueron seleccionadas la pectina cítrica, el extracto de levadura y la peptona de soja como componentes principales que aportan carbono y nitrógeno a las concentraciones indicadas en la tabla 7. Los diseños experimentales se realizaron por triplicado y los resultados fueron analizados mediante ANOVA y prueba de rangos múltiples con el método LSD, considerando un nivel de confianza del 95%. Una vez seleccionado el medio de cultivo se realizó una cinética de la fermentación, midiendo a intervalos de 4 horas el crecimiento celular (DO₆₀₀) y actividad PG y se compararon estas variables con los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas con el medio de cultivo del *screening* y el optimizado.

2. AISLAMIENTO DE LA ENZIMA

El proceso de aislamiento de la enzima inició con la identificación de las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo al finalizar la fermentación. Para ello, se concentraron muestras de 1 mL en un factor volumétrico de 50x a través de un *SpeedVac* (Avanti) y se realizó un PAGE nativo. De esta manera, se identificó el patrón de bandas de proteínas característico de la fermentación, las cuales fueron sometidas a pruebas de precipitación por salado y ultrafiltración. Al evaluar en forma conjunta la actividad PG de las fracciones de purificación, las bandas en los geles de electroforesis y el contenido de proteína total, se aisló la enzima de interés, aumentando la actividad específica del extracto final debido a un aumento de actividad PG por unidad de masa de proteína.

Los métodos de electroforesis PAGE se realizaron al 12% en un campo eléctrico fijo a 12 mA/h durante 90 minutos y se usó un patrón de peso molecular (Biodiagnóstica). El revelado de las bandas se realizó con solución de plata para los procedimientos de PAGE nativo y con colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 para los geles SDS-PAGE. La cuantificación de proteína total se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm, empleando el reactivo de Bradford (Biorad) y BSA como referencia, las absorbancias se determinaron usando microplacas para detector Biotek.

Precipitación con sulfato de amonio

Se realizaron ensayos preliminares para determinar la concentración de saturación de sulfato de amonio favorable para la recuperación de la enzima de interés, se fijó al 60% de saturación de sal la operación de la precipitación por salado. Se realizó una mezcla con el sobrenadante de cultivo y se incubó a 4 °C durante 8 horas con agitación suave. Posteriormente, se centrifugó a 10000g por 30 minutos y se separó el sobrenadante de la fracción precipitada, la cual fue resuspendida en buffer glicina-NaOH 0.1 M pH 8. El desalado se realizó mediante membranas de ultrafiltración de 10 kDa (MWCO) de peso molecular de corte (Vivaspin™) haciendo pasar 5 volúmenes de la solución buffer. Tanto a la fracción retenida como la permeada se le cuantificó proteína total, se realizaron PAGE nativo y SDS-PAGE y se cuantificó actividad PG. Adicionalmente, se estimó el peso molecular de la proteína con actividad PG.

Ultrafiltración

Una vez identificada y aislada la proteína de interés, se planteó realizar una ultrafiltración del sobrenadante, empleando volúmenes de 1 L hasta obtener la enzima concentrada en

un factor volumétrico de 20x. Para ello, se recuperó el sobrenadante obtenido de la fermentación en matraces de 1000 mL mediante centrifugación en lotes de 250 mL a 10000g durante 20 minutos (Beckman J2-MC) y se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm . Posteriormente, se usó la unidad de ultrafiltración Vivaflow (Sartorius) que opera mediante flujo tangencial a través del *cassette* de 10 kDa MWCO a un flujo volumétrico constante de 10 L/h. Se recuperaron las fracciones de retenido y permeado, se cuantificó actividad PG y la concentración de proteína total. Al final se realizó un balance de masa para determinar rendimientos del proceso.

Caracterización de la enzima libre

Con el propósito de determinar la temperatura óptima para la actividad PG de la enzima libre, se cuantificó la actividad enzimática modificando la temperatura de incubación para la reacción enzimática. Las temperaturas evaluadas fueron 4 °C en heladera (Gafa), 20 °C en incubadora (Ferca) y 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C en baño termostático (Viking).

Para identificar el mejor pH de actividad PG se realizaron pruebas de actividad enzimática a la temperatura óptima identificada y variando el pH en un rango de 5 a 12 e intervalos de una unidad. Para ello, se empleó la solución buffer citrato-fosfato 0.1 M para evaluar en el rango de pH 5 a 8 y el buffer glicina-NaOH 0.1 M para valores entre 9 y 12.

La estabilidad térmica de la enzima libre en diferentes ambientes térmicos fue analizada mediante la preincubación de la solución enzimática a temperaturas entre 30 y 70 °C. Se tomaron alícuotas para realizar el procedimiento de actividad PG a intervalos regulares hasta la desactivación enzimática y se calculó la actividad relativa expresada en porcentaje con relación al valor inicial de la actividad, es decir, sin exposición al ambiente térmico.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de diferentes iones y solventes sobre la actividad enzimática, realizando la reacción de hidrólisis según las condiciones estandarizadas previamente. Para este propósito, la solución de sustrato con ácido poligalacturónico 1% (p/v), se preparó en el buffer de reacción conteniendo los iones por adición de sales de cloruro a una concentración de 20 y 200 mM. Los iones evaluados fueron Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} y Al^{+3} . Con respecto de los solventes, se determinó la actividad PG en presencia de etanol, metanol, isopropanol, acetona, hexano, acetato de etilo, acetonitrilo y glicerol a concentraciones del 20 y 50% (v/v). También se estudió la estabilidad por un período de 120 horas bajo las condiciones del solvente a 4°C.

Se evaluó la cinética enzimática usando la enzima a una concentración de 0.25 mg/mL y variando la concentración del sustrato en valores de 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00%, y 2.50% (p/v), de esta manera se identificaron los parámetros cinéticos v_{max} y K_m aplicando el método de regresión lineal de Lineweaver-Burk.

Análisis de productos de la reacción

Mediante cromatografía de capa fina (TLC *Thin Layer Chromatography*) se analizó el contenido del producto de la reacción obtenido con la PG en estudio, para comprobar la producción de oligómeros o monómeros. Para ello se usaron placas de aluminio con Sílica-Gel F254 (Merck) de 10 cm de altura, en las cuales se sembró sucesivamente un volumen de muestra de 0.5 μ l y se dejó secar entre cada punto sembrado, hasta completar aproximadamente 4 μ g de azúcares en la muestra. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo: acetato de etilo: propanol: agua en proporciones 85:20:50:50. Se dispuso la mezcla en la cuba, se dejó saturando durante 40 minutos y a continuación se dispuso la placa hasta que el frente de corrida de la fase móvil ascendió (40-45 minutos), se secó la placa y se repitió nuevamente el procedimiento (3 ascensos en total). Al final, se realizó el revelado (Robyt, 2000).

La mezcla para el revelado se preparó con p-anisaldehído, ácido sulfúrico, etanol y ácido acético en volúmenes de 0.5, 0.5, 8.9 y 0.1 mL, respectivamente. Se sumergió la placa seca y luego se llevó a 120 °C hasta la aparición de señales.

3. INMOVILIZACIÓN Y BIOCATALISIS

La estabilización de PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 se realizó mediante la aplicación de diferentes técnicas de inmovilización. Unión a soportes, por adsorción y unión covalente, atrapamiento en matrices de alginato y agar y también se evaluaron matrices mixtas del tipo gel-gel y de gel compuesto con nanoarcillas.

Unión a soportes

El soporte empleado para el proceso de inmovilización fue agarosa CL-10B, producto comercial (General Electric) con diámetro medio de partícula de 100 μ m y activado superficialmente con 10% de 2,3-dibromopropanol. A partir de este producto, se derivatizó la agarosa con diferentes grupos reactivos. Se usó PEI y MANAE para evaluar la unión de los grupos amino en el soporte con las enzimas por el mecanismo de adsorción y también

se evaluó el grupo glioxil, que son aldehídos lineales formando bases de Schiff con grupos aminos para la formación de enlaces covalentes, principalmente con las lisinas de superficie de la proteína.

a. Glioxil-agarosa

El soporte fue obtenido por reacción con glicidol en 20 mM de bicarbonato de sodio a pH 10 y una reacción posterior de oxidación con periodato de sodio para obtener glioxil-agarosa de acuerdo al método descrito por Guisán (2006), considerando que cada mol del reactivo de oxidación genera un mol del grupo glioxil. El soporte se almacenó a pH 10 en buffer glicina-NaOH 0.1 M hasta su uso.

b. MANAE-agarosa

La activación del soporte con grupos MANAE se realizó a partir de glioxil-agarosa siguiendo el método propuesto por Fernandez-Lafuente *et al.* (1993). En primer lugar, se adiciona gota a gota etilendiamina 2 M a la suspensión de las partículas de glioxil-agarosa en buffer carbonato y se mantiene la mezcla de reacción bajo condiciones de agitación continua. Posteriormente, a las 2 horas se adiciona NaBH₄ para producir una reacción de reducción y finalmente el soporte aminado es lavado con abundante agua destilada y almacenado en buffer fosfato 5 mM pH 7.

c. PEI-agarosa

Este soporte también fue obtenido a partir de glioxil-agarosa usando el polímero iónico PEI con tamaño molecular de 1.3 kDa en solución al 10% (p/v) para recubrir las partículas de agarosa y producir un soporte policatiónico con alta densidad de grupos reactivos (Pessela *et al.*, 2005). El soporte se almacenó en buffer fosfato 30 mM pH 7.

Una vez obtenidos los 3 tipos de soportes, se realizó el proceso de inmovilización de las enzimas con cada uno de ellos. La solución enzimática se diluyó a una concentración de 1 mg/mL empleando la solución buffer de almacenamiento según cada soporte, seguidamente se resuspendió el soporte en la solución enzimática en una proporción de 0.1 g por mL de solución de enzima y se incubó durante 3 horas a 28 °C en agitación a 100 rpm y se tomaron alícuotas de muestra cada 30 minutos para cuantificar la concentración de proteína libre y el valor correspondiente de porcentaje de inmovilización. Después de las 3 horas, se adicionó 1 mg de NaBH₄ sólido por cada mL de suspensión al soporte de glioxil-agarosa y se continuó la agitación por 30 minutos adicionales. Al final se realizó un lavado

con abundante agua destilada y se conservó el producto de inmovilización en el buffer de almacenamiento en la proporción de 0.1 g/mL.

La reacción enzimática con los inmovilizados obtenidos se realizó mezclando en relación volumétrica 1:1 la suspensión del soporte y el sustrato, las condiciones de reacción fueron de 45 °C, 200 rpm y 20 horas. Se tomaron muestras de 100 µL cada hora durante 5 horas y a las 20 horas medir la formación de producto por la acción enzimática. Posteriormente, se realizó un diseño experimental que condujo a la optimización de las condiciones de inmovilización en el soporte que demostró mejores rendimientos de la reacción. En la tabla 9 se muestran las condiciones del diseño, que correspondió a 15 tratamientos realizados por duplicado de manera independiente. Finalmente, se obtuvieron las condiciones de inmovilización en el soporte glioxil-agarosa para la obtención de un biocatalizador heterogéneo con actividad PG.

Tabla 9. Diseño multifactorial para la optimización de las condiciones de inmovilización enzimática en glioxil-agarosa.

Diseño factorial completo 5 x 3	
Factor 1	Factor 2
Concentración de proteína (mg/mL)	Cantidad de soporte (g/mL)
0.25	0.05 0.10 0.20
0.50	
1.00	
1.50	
2.00	
Variables de respuesta: inmovilización (%), producto (mg/mL) y rendimiento (g/g)	
Análisis: ANOVA, comparación de medias (prueba LSD) - nivel de confianza 95%	

Atrapamiento

a. Alginato

Experiencias anteriores en LIBioS, han indicado que las soluciones de alginato de sodio se pueden preparar sin dificultades técnicas hasta un máximo de 6% (p/v), concentraciones superiores resultan en unas características de fluidez que no permiten su manipulación. Por

esta razón y a modo de evaluaciones preliminares para el atrapamiento de las PG bacterianas, se prepararon biocatalizadores a partir de una solución de alginato de sodio al 5% (p/v) por gelificación con calcio y se determinó el tiempo de proceso que resultó en un mejor porcentaje de atrapamiento y generación de producto en la reacción catalítica.

De esta manera, se preparó una solución de alginato de sodio al 5% (p/v) con solución fisiológica y fue mezclada hasta homogeneidad con la solución de enzima en una relación volumétrica de 1:1. La mezcla obtenida fue adicionada gota a gota a una solución 0.2 M con CaCl_2 para permitir la formación de perlas por gelificación ionotópica. Las perlas formadas se mantuvieron en agitación suave durante 10, 30 y 60 minutos, luego se filtraron y lavaron con agua desionizada estéril. Al agua de lavado se le cuantificó la cantidad de proteína total para calcular el porcentaje de atrapamiento de la matriz. Finalmente, se midió el tamaño de perlas ($n=30$) mediante un calibre Vernier y se almacenaron en agua desionizada estéril.

La reacción catalítica se realizó fijando la masa de biocatalizador tal que la cantidad de proteína fuera de 0.5 mg por mL de reacción, la solución de sustrato fue preparada en buffer 25 mM Tris-HCl a pH 7. La incubación se realizó a 45 °C con agitación (200 rpm) durante 4 horas y se estudió la cinética de reacción a intervalos de 30 minutos.

Adicionalmente, se evaluaron las PG de las 4 mejores cepas del género *Streptomyces* estabilizadas en alginato. Se seleccionó la mejor cepa y se procedió a optimizar las condiciones de inmovilización y de reacción. Para ello, se evaluaron concentraciones de alginato de sodio a 4 y 6%, CaCl_2 y SrCl_2 como dos agentes catiónicos a 0.2 M para la gelificación y dos niveles de carga de proteína para la reacción enzimática; 0.25 y 0.50 mg/mL. Se realizaron los análisis estadísticos factoriales, de análisis de varianza y comparación de medias que permitieron seleccionar las mejores condiciones para la preparación del biocatalizador con actividad PG por atrapamiento en alginato.

b. Agares

El atrapamiento de las PG en diferentes tipos de agar se llevó a cabo preparando soluciones de cada termogel al 4% (p/v) en agua desionizada, se calentaron hasta ebullición para lograr solubilidad completa en baño termostático y se conservaron a 60 °C para realizar la inmovilización enzimática. Para ello, fueron empleados los agares denominados *Gracilaria*, *Pterocladia*, *Gelidium* y bacteriológico, cada uno que se mezcló con la solución enzimática a una relación volumétrica 1:1. La mezcla se depositó gota a gota en aceite vegetal a 8 °C, lo cual permitió la formación de perlas por el descenso de la temperatura y se dejó durante 10 minutos en agitación suave. Posteriormente, las perlas fueron filtradas y lavadas con hexano y abundante agua, al agua de lavado se le cuantificó proteína total para la

determinación de porcentaje de atrapamiento. Posteriormente, se midió el tamaño de las perlas usando el calibre Vernier y se almacenaron en agua estéril hasta su uso en las reacciones.

La reacción catalítica con los diferentes inmobilizados según el tipo de agar, se realizó con una cantidad de proteína atrapada de 0.5 mg por mL de reacción, la solución de sustrato fue preparada en buffer glicina-NaOH a pH 10 y la incubación se realizó a 45 °C con agitación a 200 rpm durante 4 horas. Finalmente, se estudió la cinética de reacción a intervalos de 30 minutos y se seleccionó el agar con mejores propiedades mecánicas que promovieron un óptimo desempeño de la reacción catalítica.

Tabla 10. Diseño de experimentos de mezclas binarias para la optimización del atrapamiento de PG en agar bacteriológico.

Diseño 1		Diseño 2	
Unifactorial		Diseño de mezcla binaria	
Cationes		Proteína	Agar
		Fracción (v/v)	
Na ⁺		0.100	0.900
K ⁺		0.350	0.650
Mg ⁺²		0.600	0.400
Ca ⁺²		0.350	0.650
Mn ⁺²		0.225	0.775
Al ⁺³		0.475	0.525
		0.100	0.900

Variables de respuesta: inmovilización (%), producto (%), rendimiento (g/g) y estabilidad (%)

Análisis: ANOVA, diseño Simplex-Látice - nivel de confianza 95%

Seguidamente, se evaluó el efecto de cationes en la estabilidad mecánica de la matriz seleccionada y se realizó un diseño experimental con el objeto de optimizar el proceso de inmovilización y de reacción (Tabla 10). El diseño de mezclas binario se realizó con la restricción que la fracción de proteína varía entre el 10 y 60% (v/v) y constó de 7 tratamientos experimentales incluyendo dos réplicas en el punto central. Los datos fueron analizados a través de un modelo cuadrático para identificar los efectos simples y de interacción.

Matrices mixtas

a. Agar-poliacrilamida

Se evaluó la inmovilización por atrapamiento en una matriz mixta de un polímero natural y uno sintético. Para ello, se preparó una mezcla de agar, poliacrilamida y solución enzimática a igual relación volumétrica, resultando en concentraciones finales de 10% (p/v), 1% (p/v) y 0.7 mg/mL, respectivamente. Para lograr la polimerización del material, se tomaron 500 μ L de agar bacteriológico a 60 °C, 500 μ L de la solución de acrilamida 30% (p/v) - bisacrilamida 0.8% (p/v) y 500 μ L de proteína y se mezclaron. Posteriormente, se adicionaron 15 μ L de PSA 10% (p/v) y 5 μ L de TEMED para catalizar la polimerización y rápidamente se depositó esta mezcla en un recipiente rectangular de 1 x 3.5 cm hasta la polimerización. Finalmente, se cortó el gel obtenido con bisturí en cubos de 3 mm, éstos fueron lavados con agua desionizada estéril y se cuantificó proteína liberada.

b. Agar-nanoarcillas

El desempeño catalítico de una matriz mixta de agar reforzada con nanoarcillas fue evaluado mediante diferentes estrategias experimentales para la inmovilización y se compararon con respecto de los parámetros catalíticos empleando bentonita sódica y montmorillonita. El acondicionamiento de la bentonita se realizó mediante hidratación con agua desionizada estéril y en la solución enzimática mediante agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugó la suspensión de nanoarcillas para separar el sobrenadante, al cual se le cuantificó proteína total. La fracción de las nanoarcillas hidratadas se empleó para preparar la matriz reforzada según fue descrito en la sección de atrapamiento enzimático en agares. Se evaluó la carga de bentonita en un rango de 10 a 50 mg por gramo de biocatalizador.

Cinética enzimática

Las características cinéticas de los diferentes biocatalizadores inmovilizados se cuantificaron usando una carga de proteína equivalente a 0.25 mg/mL y variando la concentración del sustrato en valores de 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00%, y 2.50% (p/v). Los tiempos de muestreo fueron adaptados según cada biocatalizador para tomar los datos necesarios que permitieran calcular las diferentes velocidades de reacción. Se identificaron los parámetros cinéticos v_{max} y K_m aplicando el método de regresión lineal de Lineweaver-Burk.

Pruebas reológicas

Los diferentes geles empleados para la inmovilización por atrapamiento fueron caracterizados reológicamente mediante pruebas dinámicas oscilatorias usando un reómetro de doble plato (AR-G2 TA Instruments) equipado con geometrías paralelas de 30 mm de diámetro. La respuesta mecánica de los materiales se midió en un rango entre 0.1 y 10 Pa a una frecuencia fija de 1.0 Hz. Adicionalmente, los termogeles fueron sometidos a pruebas térmicas evaluando rampas a razón de 5 °C/min entre 10 °C y 80 °C para determinar comportamientos durante el calentamiento y enfriamiento del material. La distancia entre platos fue definida a 1500 μm y entre ellos se depositaron 2 mL de muestra y los platos fueron recubiertos para prevenir la evaporación del agua de composición de los geles. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y se cuantificaron los parámetros de módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y ángulo de fase (δ).

Parámetros biocatalíticos

a. Reusabilidad

Los ciclos de reusabilidad de los diferentes biocatalizadores inmovilizados se determinaron con base en los tiempos de máxima formación de producto de acuerdo a los estudios de la cinética enzimática de cada sistema en particular. Después de cada reacción, se separaron las fases del medio de reacción y del biocatalizador, éste último fue lavado con agua desionizada y reusado por ciclos consecutivos de reacción. A cada ciclo se le cuantificó la formación de ácido D-galacturónico (mg/mL), la reducción de viscosidad (reducción- η) y se calculó la actividad relativa a la primera reacción hasta la desactivación del biocatalizador, considerada como el 50% de la actividad obtenida en la primera reacción.

b. Estabilidad de almacenamiento

Los biocatalizadores obtenidos mediante las diferentes técnicas de inmovilización fueron sometidos a un almacenamiento a 4 °C en agua destilada. Periódicamente, se tomaron muestras de cada biocatalizador y se le evaluó su actividad enzimática. Se consideró que el biocatalizador se conservó activo desde su preparación hasta el momento que su actividad relativa al primer ciclo fue del 50%.

4. APLICACIONES Y ESCALADO

En la etapa de escalado del proceso biocatalítico y sus potenciales aplicaciones en alimentos y ambiente, se evaluó el efecto de los biocatalizadores en procesos de tratamiento de agua residual proveniente de la fabricación de papel, en clarificación de jugos de uva y ciruela y la degradación enzimática de albedo de naranja y residuos generados en la producción de jugos prensados en frío por una empresa local llamada CurubaLab. Adicionalmente, se eligió un biocatalizador con base en el desempeño global del bioproceso y en un análisis comparativo de las variables catalíticas descritas en la tabla 11, con el objetivo de diseñar un biorreactor discontinuo de lecho percolado con recirculación.

Tabla 11. Definición de las variables biocatalíticas usadas como criterio para la selección del mejor biocatalizador inmovilizado con actividad PG.

Parámetro	Unidades	Definición
Tiempo de reacción	(h)	Tiempo de la reacción enzimática en el cual se obtiene la máxima concentración de producto.
Producto	(mg/mL)	Concentración de ácido D-galacturónico obtenida por hidrólisis enzimática.
Productividad	(mg/mL·h)	Cantidad de producto generado por unidad de tiempo de reacción.
Hidrólisis	(%)	Fracción másica hidrolizada por efecto enzimático. Es la relación entre la cantidad de sustrato inicial y la cantidad de producto.
Rendimiento	(g/g)	Rendimiento de reacción expresado como cantidad de producto por unidad de masa de proteína.
Tiempo de reusos	(h)	Tiempo durante el cual se conserva estable el biocatalizador inmovilizado después de reacciones sucesivas.
Producción total	(mg)	Cantidad de producto generado en la vida útil del biocatalizador.
Productividad global	(mg/h)	Relación de la producción total y el tiempo de reusos.
Km	(M)	Constante de Michaelis-Menten de afinidad hacia el sustrato.
Vmax	(μ mol/min)	Velocidad máxima de reacción.

Alimentos y ambiente

a. Efluente de producción de papel

La primera aproximación a las aplicaciones de la enzima con actividad PG fue la aplicación en estado libre para el tratamiento de agua residual con alto contenido de sustancias orgánicas coloidales derivados de pectina y celulosa. Se caracterizó la viscosidad inicial de la muestra de agua y se trató en con la enzima libre en una relación volumétrica de 1:9 de enzima y agua residual. Se evaluó el efecto de la temperatura en el tratamiento enzimático en un rango de 24 a 50 °C y la viscosidad fue monitoreada hasta viscosidad constante, utilizando el reómetro a una razón fija del esfuerzo de corte a 300 s⁻¹.

b. Clarificación de jugos

Se prepararon jugos de estación con frutas maduras empleando ciruelas (*Prunus domestica*) y uvas (*Vitis vinifera*) obtenidas de un mercado local. Éstos se prepararon al 70% (p/v) de sólidos totales con agua destilada usando una licuadora automática durante 3 minutos. Los jugos fueron filtrados con tamiz de diámetro medio de 1 mm para retirar partículas grandes y posteriormente se calentaron a 80 °C para la desactivación de enzimas endógenas. Se cuantificaron características iniciales de viscosidad, turbidez, contenido de azúcares y sólidos solubles. Las pruebas de clarificación fueron realizadas con la enzima inmovilizada en glioxil-agarosa durante 4 horas a 40 °C usando 10 mg de biocatalizador por mL.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1000g durante 5 minutos para separar el biocatalizador, el grado de clarificación se determinó midiendo las absorbancias en el espectro de 400 a 700 nm de longitud de onda y las referencias usadas fueron el jugo sin tratamiento enzimático y el mismo clarificado por filtración a 80 °C con sistema de vacío a 0.25 psi y un área de filtración de 23.75 cm² y diámetro de poro de 2.5 µm. El porcentaje de clarificación fue definido como la relación entre el área bajo la curva de los jugos tratados enzimáticamente y los de referencia.

c. Sacarificación de residuos frutihortícolas

En esta etapa de aplicación de los biocatalizadores desarrollados se trabajó sobre los desechos generados por una productora local de jugos prensados en frío (CurubaLab), la cual fue la proveedora de los residuos de naranja, pera y pepino, seleccionados para su tratamiento.

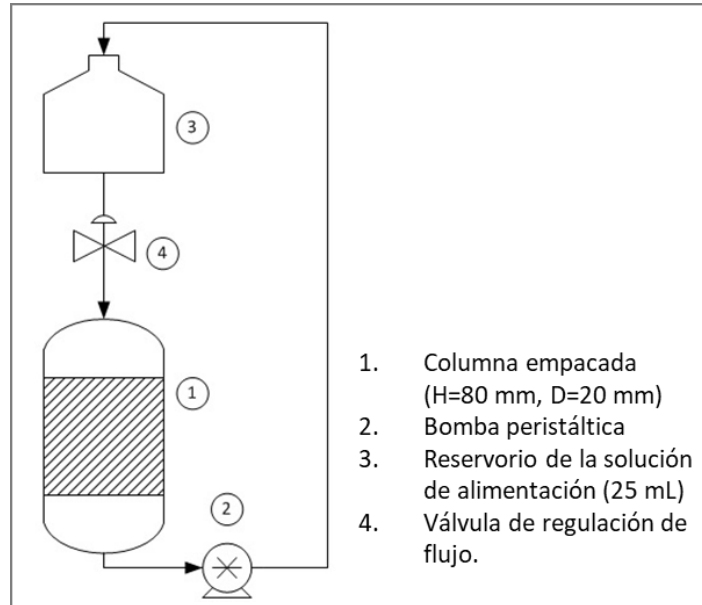
Las cáscaras de naranja fueron colectadas y se separó manualmente el albedo, éste fue calentado en agua destilada hasta ebullición durante 10 minutos. Seguidamente, se filtró el

albedo y fue secado en horno de convección a 60 °C hasta peso constante. El material fue molido en procesador culinario de cuchillas (Liliana) y se tamizó en malla 50 (0.325 mm). El producto de tamaño uniforme se resuspendió con una carga de sólidos del 2% (p/v) en solución buffer 25 mM Tris-HCl pH 7 y fue incubado con el biocatalizador inmovilizado en matriz de alginato a 50 °C bajo agitación orbital de 200 rpm durante 2 horas. A intervalos de 30 minutos se tomaron muestras para cuantificar el curso de la reacción enzimática mediante la determinación de azúcares reductores y de viscosidad. La cantidad de biocatalizador empleado fue de 0.5 mg de proteína por cada mL de suspensión con albedo. Finalmente, se halló el grado de sacarificación del residuo por cuantificación de azúcares reductores.

Los residuos de pera y pepino fueron colectados y caracterizados en cuanto a sólidos suspendidos, viscosidad y azúcares. Posteriormente, fueron filtrados para descartar sólidos con diámetro de partícula superior a 1 mm y se trabajó con la corriente fluida, la cual fue empleada para la sacarificación mediante recirculación en biorreactor de lecho empacado. A la corriente del producto se le analizó el contenido de azúcares reductores.

Escalado a biorreactor de lecho percolado

De acuerdo a la figura 25, se dispuso de una columna de polipropileno con una relación de altura y diámetro de 4 ($H/D = 4$) conteniendo 20 mL del biocatalizador inmovilizado en agar bacteriológico (V_T =volumen de lecho). El flujo volumétrico de recirculación de la columna fue controlado mediante una válvula de alimentación. Los ensayos experimentales fueron realizados a dos condiciones de flujo (1 mL/min y 8 mL/min) y se controló la temperatura del reservorio de la solución de sustrato a 40 °C mediante baño termostático. Como factores de diseño de la columna, se calculó la masa total de biocatalizador en el lecho empacado (m_T), la densidad aparente de las partículas (ρ_g), porosidad del lecho empacado (ϵ) por diferencia de volumen del lecho ocupado por las perlas de agar y el contenido de las mismas después de ser fundidas por ebullición, el *holdup* específico de la columna medido como el volumen de líquido en circulación por hora por volumen de reactor empacado (Martins Dos Santos *et al.*, 1997).



1. Columna empacada (H=80 mm, D=20 mm)
2. Bomba peristáltica
3. Reservorio de la solución de alimentación (25 mL)
4. Válvula de regulación de flujo.

Figura 25. Esquema del biorreactor de lecho percolado. Columna empacada con el biocatalizador inmovilizado por atrapamiento en agar bacteriológico.

Se determinaron las propiedades físicas del biocatalizador inmovilizado como masa de partícula (m_p), diámetro de partícula (d_p), factor de esfericidad ($0 < \phi < 1$) como la relación entre la longitud de eje axial y longitudinal ($N = 30$), volumen de partícula, superficie específica, densidad de partícula y densidad aparente. Las ecuaciones del 1 al 8 indican el modelo de cálculo para la determinación de las propiedades físicas.

Ecuación 1. Factor de esfericidad

$$\phi = \frac{\Sigma(a/b)}{N}$$

Ecuación 2. Volumen de partícula

$$V_p [cm^3] = \frac{1}{6} \pi D_p^3$$

Ecuación 3. Densidad de partícula

$$\rho_p \left[\frac{g}{cm^3} \right] = \frac{m_p}{V_p}$$

Ecuación 4. Densidad aparente del lecho

$$\rho_g \left[\frac{g}{cm^3} \right] = \frac{m_T}{V_T}$$

Ecuación 5. Superficie de partícula

$$S_p [cm^2] = \pi D_p^2$$

Ecuación 6. Superficie específica

$$S_g \left[\frac{cm^2}{g} \right] = \frac{S_p}{m_p} \cong \frac{6}{\phi \rho_p d_p}$$

Ecuación 7. Volumen vacío por masa de biocatalizador

$$V_g \left[\frac{cm^3}{g} \right] = \frac{V_T \varepsilon}{m_T}$$

Ecuación 8. Radio medio de poro en el lecho

$$\bar{a} [\mu m] = \frac{2V_g}{S_g}$$

Se cuantificó el desempeño de la hidrólisis enzimática de una solución de ácido poligalacturónico al 0.5% (p/v) en la columna de lecho percolado en las dos condiciones de operación y se seleccionó la mejor para hidrolizar residuos vegetales de pera y pepino según se describió en el inciso anterior. La figura 25 muestra un esquema de la configuración experimental de la columna.

El factor de efectividad experimental del proceso de biocatálisis heterogénea se halló mediante la relación de la velocidad de reacción de la enzima libre y la enzima inmovilizada por atrapamiento y el factor de efectividad según modelos y correlaciones de catálisis heterogénea con enzimas (Engasser, 1978; Fogler, 2011; Ilsen y Kerim, 2016).

Ecuación 9. Número de Reynolds $Re = \frac{d_p \rho_s v}{\eta_s}$

Ecuación 10. Factor de transferencia de masa (j_D) $j_D = 1.66 \cdot Re^{-0.51}$

Ecuación 11. Difusividad molecular $D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_H}$

Ecuación 12. Difusividad efectiva $D_{eff} = \frac{D\epsilon}{\tau}$

Ecuación 13. Coeficiente de transferencia de masa externo $h = \frac{j_D v}{\left(\frac{\eta_s}{\rho_s D}\right)^{2/3}}$

Ecuación 14. Concentración de sustrato en superficie $[S]_s = [S] - \frac{v_r}{h \cdot S_p}$

Donde,

d_p (m):	Diámetro de partícula
T (K):	Temperatura de reacción
ρ_s (kg/m ³):	Densidad sustrato
v (cm/s):	Velocidad de percolación
η_s (Pa·s):	Viscosidad de solución
η (Pa·s):	Viscosidad del agua
k_b (J/K):	Constante de Boltzman
r_H (m):	Radio hidrodinámico
v_r (mg/s):	Velocidad de reacción
$[S]$ (mg/cm ³):	Concentración de sustrato
K_m (mg/cm ³):	Constante de Michaelis-Menten
ϵ :	Porosidad de partícula
τ :	Tortuosidad de partícula

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Se verificaron los supuestos del ANOVA por medio del test de Shapiro Wilks y Kolmogorov para el supuesto de Normalidad, el test de Bartlett's para la igualdad de varianza homocedasticidad y el análisis de residuos para el supuesto de independencia. La diferencia entre las medias de los tratamientos fue evaluada con un análisis de rangos múltiples por medio de la prueba LSD y se realizó un análisis de diferencias de medias entre el control y los diferentes tratamientos. El software utilizado fue Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados según la estrategia metodológica planteada en los cuatro bloques principales: *Fermentación*, *Aislamiento de la enzima*, *Inmovilización y biocatálisis* y, finalmente, *Aplicaciones y escalado*. Se discuten y argumentan en un marco de los procesos bioquímicos, la factibilidad de operación del proceso biocatalítico desarrollado y su potencial aplicación. En primer lugar, se da cuenta de los cultivos bacterianos en medio líquido para cuantificar la actividad PG; a partir del *screening* sobre un banco de cepas se seleccionaron las cepas con actividad sobresaliente y se identificó aquella de máxima actividad enzimática. Se diseñó un proceso que optimizó las condiciones de operación de la fermentación y los nutrientes del medio de cultivo para maximizar la producción de PG. En la segunda parte se exponen los resultados de la identificación y purificación de la enzima, así como de las características de la actividad y estabilidad de la proteína. Posteriormente, se describen y analizan los resultados de la inmovilización mediante los diferentes métodos implementados. En último lugar, se presentan las aplicaciones potenciales para el área ambiental y de alimentos con los resultados del modelo de escalado en columna de lecho percolado.

1. FERMENTACIÓN

Screening de cepas bacterianas con potencial actividad poligalacturonasa

Se realizaron cultivos de 100 cepas bacterianas de diferentes géneros como *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas* en medio líquido con pectina cítrica y se midió actividad PG a los sobrenadantes de cultivo libres de células, los controles experimentales fueron uno abiótico (control negativo) y de *Bacillus sp.* (control positivo), ambos se consideraron unidades experimentales de referencia para cada bloque experimental realizado por tandas de 10 a 12 cultivos por duplicado.

Los resultados indicaron que 92 cepas tuvieron la capacidad metabólica para crecer en el medio empleado (Tabla 12), a éstas se les cuantificó su actividad enzimática empleando ácido poligalacturónico a pH 7 y se detectó que 31 cepas hidrolizaron parcialmente el polisacárido mientras que 61 de ellas fueron negativas para la actividad PG en las

condiciones implementadas. El control positivo *Bacillus sp.* resultó con una actividad media de 0.403 ± 0.082 U/mL y el control negativo fue de -0.018 ± 0.021 U/mL.

Tabla 12. Identificación de las cepas bacterianas con actividad PG positiva a partir del *screening* del banco de cepas. Los cultivos se realizaron en medio líquido a pH 7 con pectina cítrica a 10 g/L por duplicado.

Actividad PG positiva		Actividad PG negativa			
Género	Cepas	Género	Cepas	Género	Cepas
<i>Bacillus</i>	6	<i>Achronobacter</i>	1	<i>Flavobacterium</i>	2
		<i>Aeromonas</i>	6	<i>Geobacillus</i>	3
		<i>Agrobacterium</i>	1	<i>Klebsiella</i>	2
		<i>Arthrobacter</i>	2	<i>Lactobacillus</i>	5
		<i>Brevibacterium</i>	2	<i>Lactococcus</i>	1
		<i>Cellulomonas</i>	2	<i>Leuconostoc</i>	2
<i>Citrobacter</i>	3	<i>Chromobacterium</i>	1	<i>Micrococcus</i>	1
<i>Enterococcus</i>	3	<i>Corynebacterium</i>	1	<i>Pediococcus</i>	1
<i>Serratia</i>	3	<i>E. coli</i>	1	<i>Proteus</i>	3
		<i>Enterobacter</i>	3	<i>Pseudomonas</i>	3
<i>Streptomyces</i>	16	<i>Erwinia</i>	3	<i>Thermonospora</i>	2
		Psicrófilos	9	<i>Weibsellia</i>	1
				<i>Xanthomona</i>	3
Cantidad total de cepas evaluadas: 92					

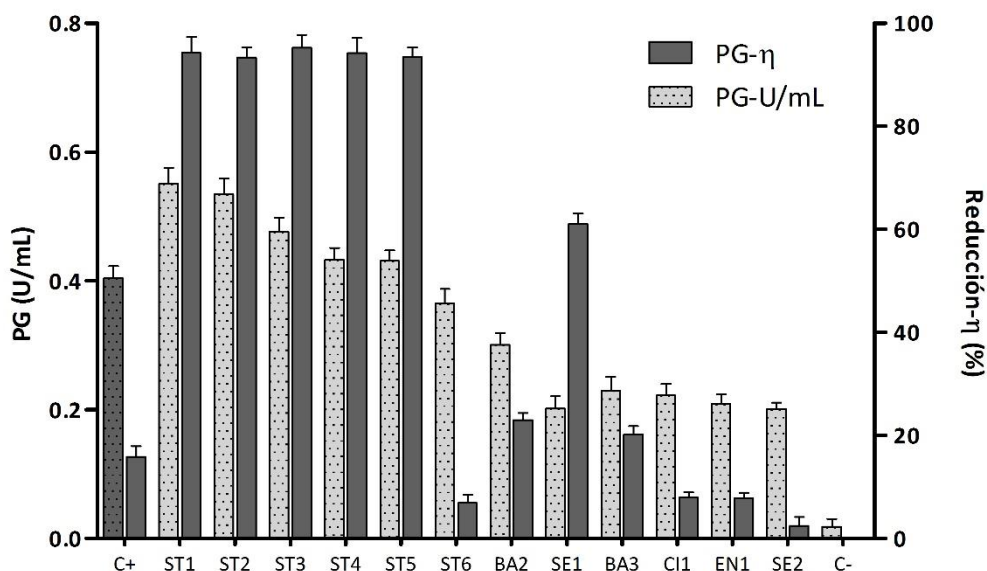


Figura 26. Cepas bacterianas con actividad PG superior a 0.2 U/mL, se presentan los valores de actividad medida en U/mL y en porcentaje de reducción de la viscosidad.

Entre las bacterias positivas para actividad PG, 12 cepas pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Enterococcus* resultaron con actividad enzimática superior a 0.2 U/mL y una reducción de viscosidad que varió entre valores de 6 y 94% de una solución de ácido poligalacturónico con viscosidad inicial de 8.001 ± 1.641 cP (Figura 26).

Cinco cepas pertenecientes al género *Streptomyces* (ST1, ST2, ST3, ST4 y ST5) mostraron la actividad PG más sobresaliente, cuyos valores fueron superiores al control positivo de *Bacillus sp.* Entonces, se realizaron nuevos cultivos con estas cepas y se monitoreó el crecimiento celular y actividad PG en el tiempo hasta 48 horas, estas pruebas constituyeron un *screening* secundario para elegir la cepa con máxima actividad enzimática. La figura 27 muestra el crecimiento celular medido en DO_{600} y actividad PG en U/mL y reducción- η (%).

Con base en lo observado, la cepa ST1 presentó la máxima actividad PG con un valor de 0.551 ± 0.026 U/mL a las 24 horas de cultivo celular y el máximo valor de reducción de viscosidad resultó en 94.8 ± 2.7 %, manteniendo la actividad enzimática invariable hasta las 48 horas del cultivo, lo cual sugiere que los productos del metabolismo no inactivan las enzimas producidas cuando se alcanza la máxima producción de biomasa (24 horas) y tampoco se evidencia una actividad proteolítica. Adicionalmente, se observó que las cinco cepas *Streptomyces* mostraron máxima actividad PG en estado estacionario del crecimiento celular. En el control positivo, la reducción de la viscosidad llega a un 22% y a mayor densidad celular, la actividad (U/mL) desciende marcadamente, hecho que se puede atribuir a enzimas que actúan rompiendo enlaces peptídicos propias de especies *Bacillus* (Zhai *et al.*, 2003).

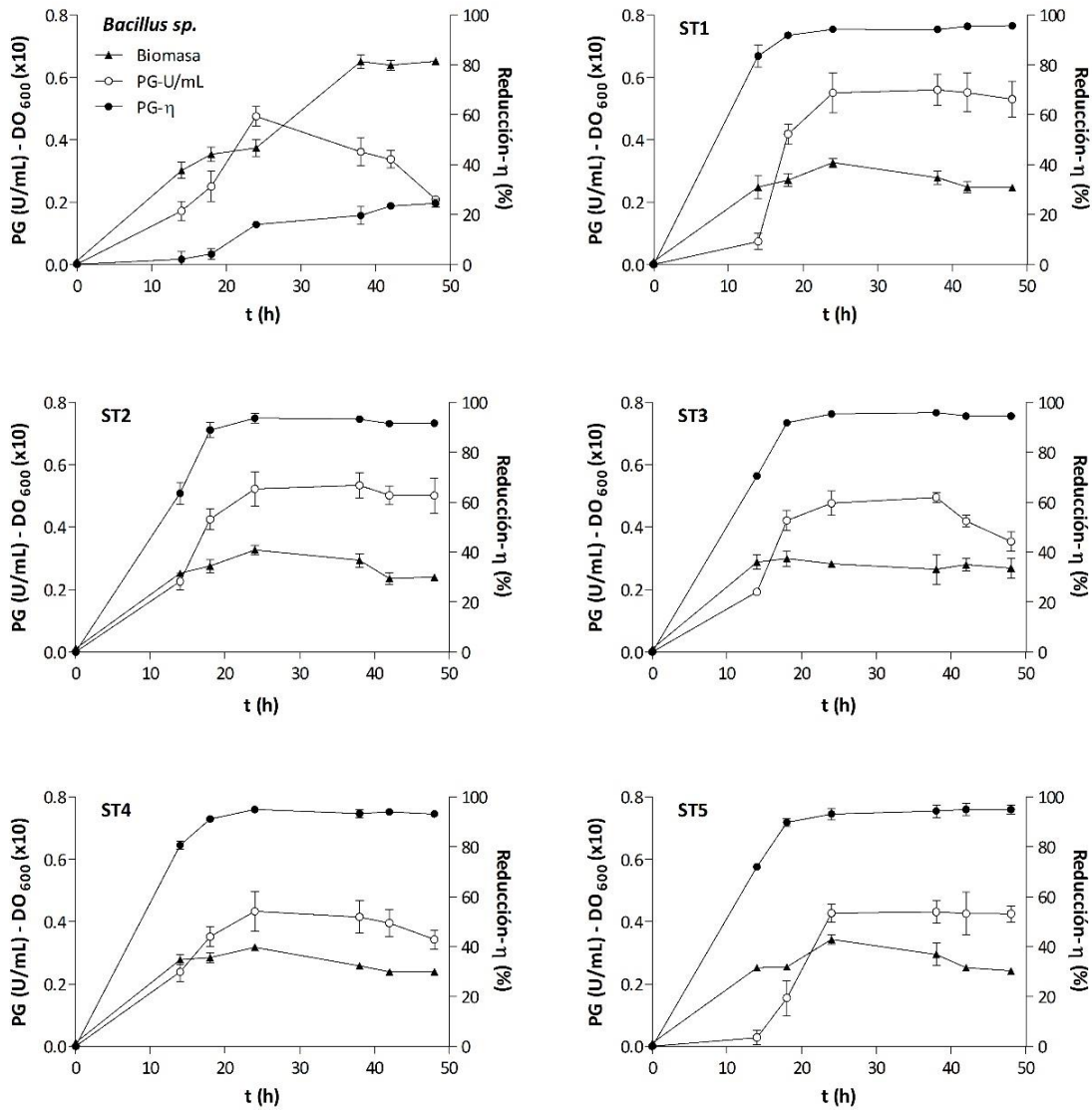


Figura 27. Crecimiento celular y actividad PG de 5 cepas del género *Streptomyces*. Como control positivo se utilizó una cepa *Bacillus sp.*

La cepa ST1 identificada como *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 exhibió la mejor actividad enzimática a las 24 horas de cultivo, demostrando también la máxima productividad bajo las condiciones evaluadas. La tabla 13 compara los tiempos de fermentación para obtener la máxima actividad enzimática de *S. halstedii* ATCC 10897 con otras bacterias reportadas para la producción de enzimas pectinolíticas. Es conveniente destacar que las bacterias más estudiadas para la producción de estas enzimas para aplicaciones industriales son especies del género *Bacillus* tales como *B. pumillus*, *B. subtilis*, *B. alcalophilus*, *B. halodurans*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*, todos microorganismos aislados de material vegetal y

muestras de suelo (Ahlawat *et al.*, 2008; Mei *et al.*, 2013; Rehman *et al.*, 2012; DC Sharma y Satyanarayana, 2006). De esta manera, resulta novedoso la identificación de *S. halstedii* ATCC 10897 como una capa con alto potencial para el desarrollo de un biocatalizador con actividad PG.

Tabla 13. Tiempo de cultivos bacterianos para alcanzar máxima actividad PG.

Microorganismo	Tiempo de cultivo (h)	Referencia
<i>Streptomyces halstedii</i>	24	(Ramírez-Tapias <i>et al.</i> , 2015)
<i>B. pumillus</i> dcsr1	34	(Sharma y Satyanarayana, 2006)
<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	36	(Beg <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. erumpens</i> MTCC 7317	36	(Kar y Ray, 2011)
<i>B. licheniformis</i> KIBGE IB-21	48	(Rehman <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. sphaericus</i> MTCC 7542	72	(Jayani <i>et al.</i> , 2010)
<i>S. lydicus</i>	96	(Jacob <i>et al.</i> , 2008b)

***Streptomyces halstedii* ATCC 10897, condiciones de fermentación y diseño de medio de cultivo**

Las condiciones de cultivo celular, formulación de nutrientes y factores de crecimiento son determinantes en el desarrollo de bioprocesos industriales para la producción de enzimas microbianas, estos factores se pueden optimizar para promover el metabolismo bacteriano y aumentar los rendimientos de fermentación. Con base en los nutrientes reportados para el medio de cultivo del *screening*, se desarrolló un nuevo medio específico para *S. halstedii* ATCC 10897 mediante diseños experimentales secuenciales considerando variables tales como el pH inicial del medio y el contenido de pectina cítrica, extracto de levadura y peptona de soja.

El pH del medio de cultivo es importante en el proceso de fermentación porque condiciona el desarrollo celular afectando la concentración de biomasa y la producción enzimática. Para estudiar el efecto de este parámetro se varió el pH del medio entre valores de 3 a 10 (Figura 28), hasta las 24 horas de cultivo se observó crecimiento y producción enzimática en un amplio rango de pH.

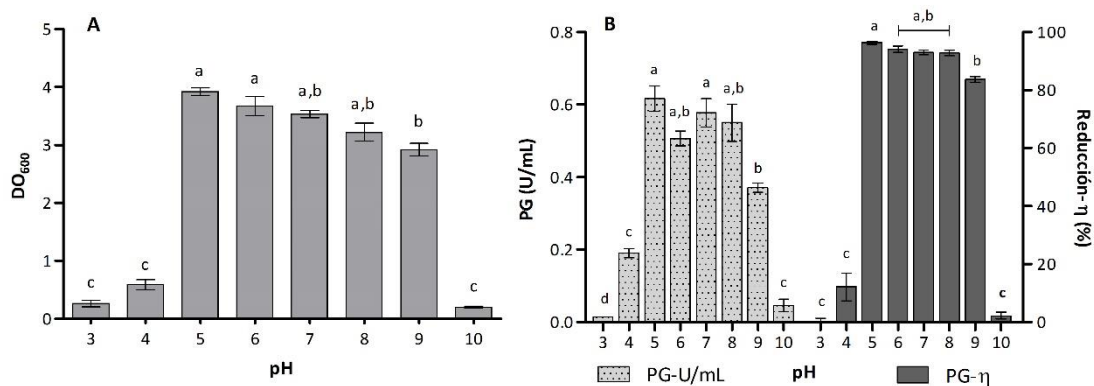


Figura 28. Efecto del pH inicial del medio de cultivo en (A) el crecimiento celular y (B) actividad enzimática de *S. halstedii* ATCC 10897 a las 24 horas de cultivo. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos nombrados con la misma letra (Prueba LSD, valor-P < 0.05).

Valores de pH entre 5 y 8 son los más favorables para el crecimiento celular (Figura 28A), el cual resultó en un valor medio de 3.51 ± 0.11 DO₆₀₀. Adicionalmente, en este mismo rango de pH se evidenció la máxima actividad PG que, medida por la liberación de grupos reductores, varió en valores entre 0.551 y 0.616 U/mL y en referencia a la reducción de la viscosidad alcanzó niveles desde 93.1% hasta 96.4%. Estos resultados sugieren una relación directa entre el crecimiento celular y la producción enzimática.

De otro lado, a pH 9 los valores de actividad enzimática decrecen en un 32% y 10%, para la medición en azúcares reductores y reducción de viscosidad, respectivamente (Figura 28B). Cualquier variación de pH en el extremo ácido (pH < 5) o en el extremo alcalino (pH > 9), resultó en una deficiencia del crecimiento bacteriano y consecuente disminución de la producción de PG. El pH seleccionado para la experimentación subsiguiente es pH 8, debido a las aplicaciones potenciales bajo condiciones alcalinas. En contraste con otros reportes para la producción de PG de origen bacteriano, *S. halstedii* ATCC 10897 resultó en una adaptabilidad alta a un rango de pH entre 5 y 8 del ambiente extracelular para su crecimiento (Jayani *et al.*, 2010; Kar y Ray, 2011)

Algunas fuentes de carbono complejas, residuos agroindustriales y diferentes tipos de pectina en los medios de cultivo han sido reportados como sustratos inductores de enzimas pectinolíticas en diferentes microorganismos (Beg *et al.*, 2000b; M Kapoor y Kuhad, 2002). El medio de cultivo del *screening*, con un contenido de 10 g/L de pectina cítrica, fue modificado variando la concentración entre 0 y 12.5 y el pH fue ajustado a 8 después de la esterilización. Los resultados mostraron elevada actividad PG en ausencia de pectina y los

valores de la actividad en el rango de 2.5 a 10 g/L fueron similares al obtenido en el medio formulado para el *screening* (Figura 29).

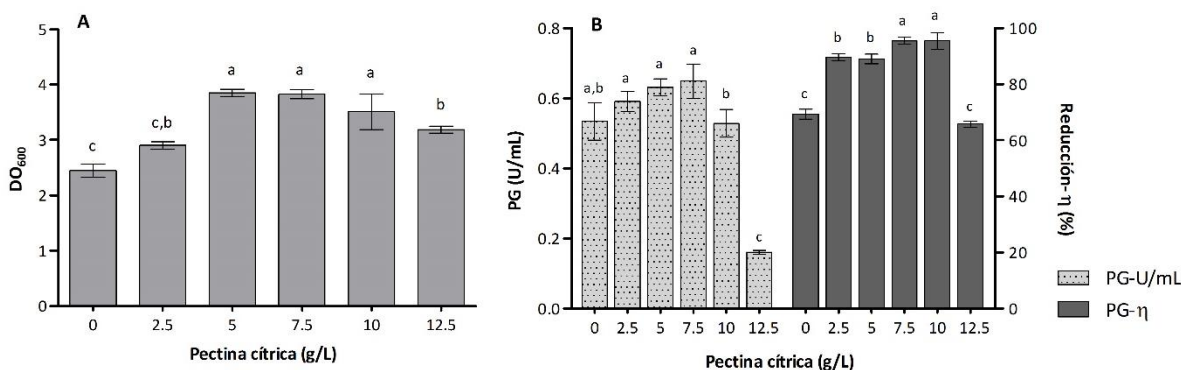


Figura 29. Efecto de la concentración de pectina cítrica en (A) el crecimiento celular y (B) la actividad PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 a las 24 horas de cultivo. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos nombrados con la misma letra (Prueba LSD, valor-P < 0.05).

A una concentración de 12.5 g/L de pectina cítrica, la actividad relativa a la máxima obtenida fue del 24% y 66% en unidades enzimáticas (U/mL) y reducción de la viscosidad, respectivamente. Estos resultados sugieren que un exceso de pectina cítrica podría tener un efecto adverso en la actividad PG, un resultado similar fue reportado por Jayani *et al.*, (2010). Adicionalmente, se observó que la pectina cítrica no fue el inductor enzimático principal ya que se halló un valor de actividad PG de $0.534 \pm 0,053$ U/mL y $69.3 \pm 1.7\%$ reducción- η sin adición de pectina cítrica.

Otros compuestos principales que componen el medio de cultivo fueron el extracto de levadura y la peptona de soja, los cuales aportaron carbono y nitrógeno orgánico y, posiblemente, contribuyeron en el metabolismo bacteriano relacionado a la síntesis enzimática. Con base en esta hipótesis, se llevó a cabo un diseño de experimentos factorial para determinar el efecto de los sustratos mencionados en la actividad PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 en ausencia de pectina cítrica. En la tabla 14 se muestran los tratamientos de las condiciones evaluadas del diseño factorial completo 3^2 y sus efectos en el crecimiento celular y la actividad PG.

Tabla 14. Matriz experimental del diseño factorial completo 3^2 para la actividad PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 cultivada durante 24 horas a 28 °C, 200 rpm y adición de (A) peptona de soja y (B) extracto de levadura como factores de estudio. El pH inicial de fermentación fue ajustado a 8.

Tratamiento	Factores (g/L)		Variable de respuesta		
	Peptona de soja (A)	Extracto de levadura (B)	Biomasa (OD600)	Actividad PG (U/mL)	Actividad PG (% reducción- η)
1	0	0	0.317 ± 0.006	0.017 ± 0.001	9.0 ± 1.1
2	0	3	0.534 ± 0.099	0.077 ± 0.013	39.3 ± 8.6
3	0	6	0.682 ± 0.139	0.118 ± 0.015	37.6 ± 8.5
4	3	0	0.662 ± 0.031	0.373 ± 0.017	76.6 ± 2.1
5	3	3	2.523 ± 0.011	0.370 ± 0.006	69.5 ± 0.7
6	3	6	1.805 ± 0.147	0.410 ± 0.031	65.3 ± 4.8
7	6	0	2.485 ± 0.007	0.544 ± 0.030	86.4 ± 1.3
8	6	3	2.960 ± 0.127	0.473 ± 0.021	83.4 ± 1.8
9	6	6	3.137 ± 0.179	0.414 ± 0.030	78.9 ± 2.6
Valor-P (OD ₆₀₀)	0.000	0.003	$R^2 = 91.681$	$R^2 = 99.386$	$R^2 = 95.645$
Valor-P (U/mL)	0.000	0.116			
Valor-P (η)	0.000	0.497			

Las condiciones de cultivo del tratamiento 7 permitieron obtener la máxima actividad PG de 0.544 ± 0.030 U/mL y 86.4 ± 1.3 % de reducción de la viscosidad aun cuando la densidad celular no fue la máxima. El diseño experimental demostró una variación considerable de la actividad enzimática debido a las diferentes concentraciones de peptona de soja (valor-p = 0.000), de otro lado, el extracto de levadura no afectó significativamente la síntesis enzimática (valor-p > 0.116). Sin embargo, ambos componentes tienen un efecto en el crecimiento celular (valor-p < 0.003). Los efectos de los factores estudiados se observan con mayor evidencia en el diagrama de Pareto (Figura 30), en el cual se grafican éstos, incluyendo los de interacción binaria. Los efectos simples de ambos componentes fueron positivos tanto para el crecimiento celular como para la actividad enzimática, teniendo un alto impacto concentraciones elevadas de peptona de soja. Sin embargo, el efecto de interacción entre los componentes evaluados (AB) fue significativo y afecta negativamente la actividad PG, lo cual sugiere que la actividad enzimática es mayor con el máximo contenido de peptona de soja y el mínimo de extracto de levadura (tratamiento 7).

El análisis estadístico y el modelo del diseño experimental permitieron identificar los efectos del contenido de peptona de soja y extracto de levadura en el crecimiento de *S. halstedii* ATCC 10897 y su actividad PG (Tabla 14 y figura 30). Los factores de correlación (R^2) obtenidos fueron todos superiores a 90% lo cual expresa que los modelos ajustados explican hasta en un 99% las variaciones observadas de las respuestas estudiadas.

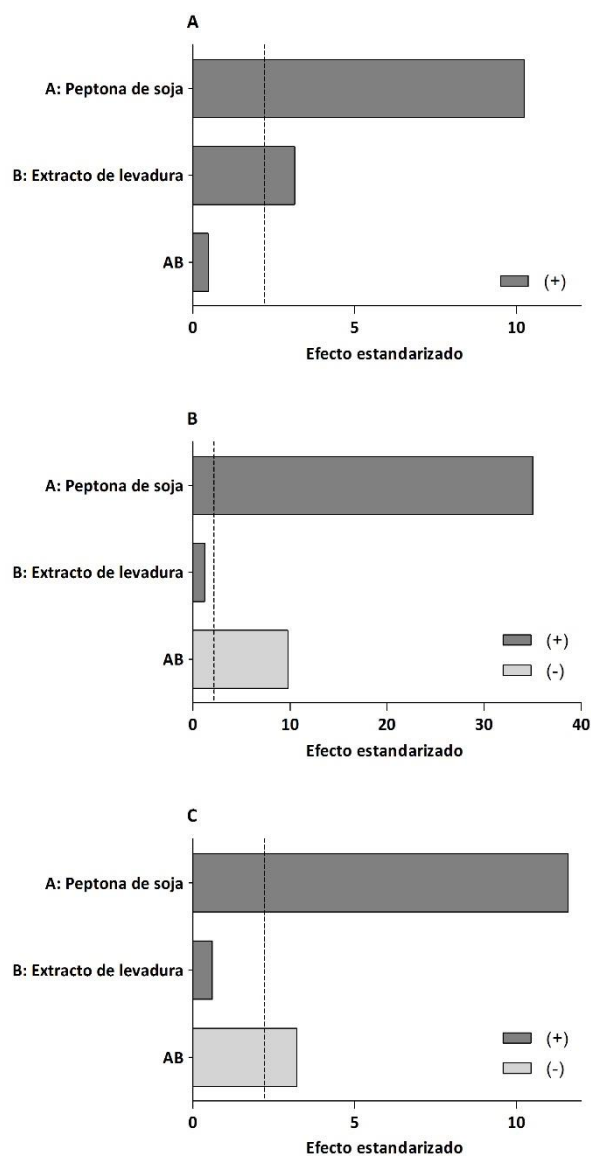


Figura 30. Diagrama de efectos de Pareto (valores absolutos) del diseño factorial completo 3^2 en las variables de respuesta. (A) Crecimiento celular y (B) actividad PG cuantificada en (B) U/mL y (C) reducción de la viscosidad. La línea punteada indica el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$).

Los experimentos subsiguientes para la optimización del medio de cultivo fueron realizados prescindiendo del extracto de levadura y aumentando los niveles de peptona de soja hasta 21 g/L. Aunque el mejor resultado del diseño factorial 3^2 mostró una actividad PG similar al valor obtenido en el medio del *screening*, la ventaja fundamental se basa en la minimización de componentes en el medio, ya que no se requiere la adición de pectina cítrica ni extracto de levadura. En la figura 31, se muestran los resultados del crecimiento celular y la producción enzimática de *S. halstedii* ATCC 10897 en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de peptona de soja. Los resultados evidenciaron que, a mayor contenido

del sustrato, la densidad celular a las 24 horas de cultivo también fue mayor en una proporción directa (Figura 31A). Siendo la peptona de soja la única fuente de nitrógeno y carbono, ésta actuó como sustrato limitante del crecimiento celular. Con respecto de la actividad enzimática, fue máxima empleando 15 g/L (1.052 U/mL y 95.0% de reducción de la viscosidad). Dado que un contenido de peptona de soja superior a este valor no representó un aumento de la actividad PG, se consideró que es la mínima cantidad del sustrato que provee las condiciones nutricionales necesarias para una máxima producción de la enzima de interés. Adicionalmente, es relevante destacar que a 15 g/L se duplicó la actividad medida en U/mL con respecto de las condiciones evaluadas en los experimentos previos.

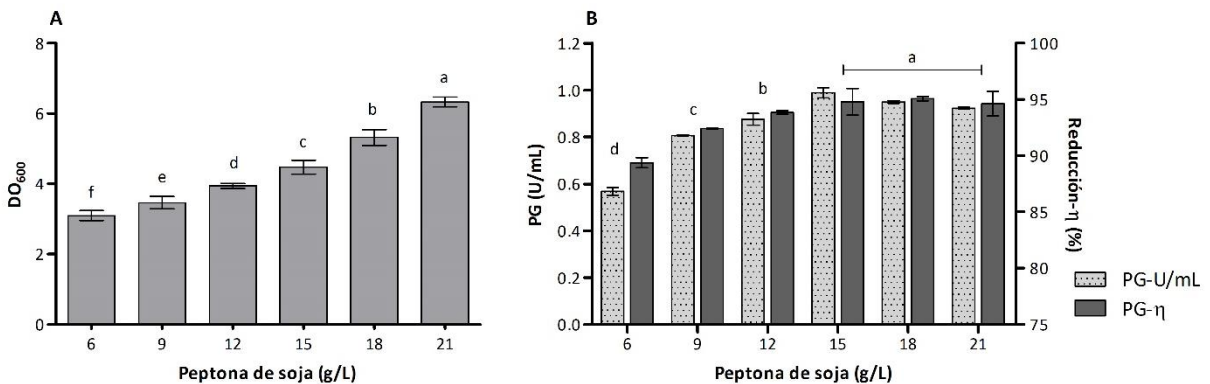


Figura 31. Efecto de la concentración de peptona de soja en (A) el crecimiento celular y (B) la actividad PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 a las 24 horas de cultivo. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos nombrados con la misma letra (Prueba LSD, valor-P < 0.05).

El uso de peptona de soja (15 g/L), como sustrato principal, resultó ser el más adecuado para la producción de PG a partir de *S. halstedii* ATCC 10897 posiblemente porque representa una fuente vegetal de aminoácidos y carbohidratos asociados a los azúcares que constituyen el polímero de pectina. La peptona de soja también contiene vitaminas, minerales y azúcares a una concentración máxima de 3 g/L. Estos compuestos son fundamentales para el metabolismo bacteriano relacionado a la síntesis de hidrolasas de carbohidratos y favorecieron el crecimiento celular y actividad PG de *S. halstedii* ATCC 10897. En este contexto, algunos componentes mayoritarios de la peptona de soja como la glicina y el ácido D-galacturónico fueron evaluados a una concentración de 3 g/L adicionados a un medio de cultivo basal (C-), con la misma formulación de sales y extracto de levadura del medio del *screening*. En este experimento se halló una actividad PG especialmente favorecida por el ácido D-galacturónico (Tabla 15), sin embargo, no alcanzó

los valores de 1.052 U/mL y de 95.0% de reducción de la viscosidad obtenidos con el medio optimizado en el diseño de experimentos.

Tabla 15. Comparación de la actividad enzimática de la PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 a las 24 horas de cultivo en un medio líquido basal (C-: Control negativo), adicionado con glicina (3 g/L) y con ácido D-galacturónico (3 g/L).

Actividad PG	Medio de cultivo		
	Control (C-)	Glicina	Acido D-galacturónico
(U/mL)	0.075 ± 0.011	0.196 ± 0.014	0.821 ± 0.039
(% reducción- η)	33.5 ± 5.3	32.0 ± 0.8	70.5 ± 1.6

En este contexto, se presentó la hipótesis si un mayor contenido de ácido D-galacturónico permitiría obtener un nivel de actividad enzimática similar al obtenido con 15 g/L de peptona de soja. Para dilucidar la respuesta se evaluaron niveles de ácido D-galacturónico de 1, 3 y 5 g/L y los resultados obtenidos se exponen en la figura 32.

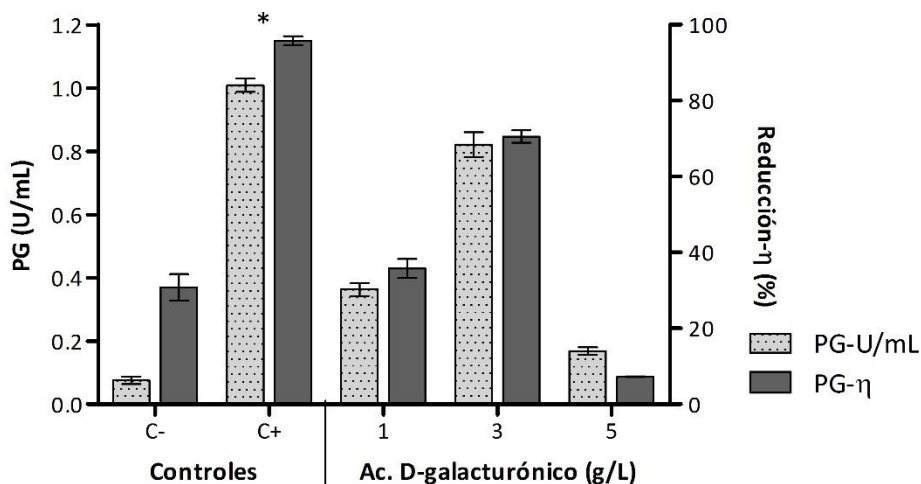


Figura 32. Actividad PG obtenida en cultivos de *S. halstedii* ATCC 10897 variando el contenido de ácido D-galacturónico. El control negativo (C-) corresponde al medio basal y el control positivo (C+) al medio de cultivo diseñado con peptona de soja. Las condiciones de cultivo fueron 24 horas, 28 °C, 200 rpm y pH inicial de 8.

Un contenido de ácido D-galacturónico de 5 g/L tuvo un efecto negativo en la producción de la enzima ya que se obtuvo una actividad PG reducida, similar a la del control negativo (Figura 32). Así, se sugiere que un contenido superior a 3 g/L del monosacárido tiene un efecto de represión catabólica por carbono; especialmente en bacterias Gram positivas, el consumo de glucosa y diferentes hexosas y la activación de los sistemas de fosforilación y transporte activan señales para promover la represión génica de enzimas catabólicas (Stülke y Hillen, 1999). Sin embargo, se ha identificado que un nivel mínimo del ácido D-

galacturónico promueve una inducción inicial para producir una cantidad basal de las enzimas hidrolíticas que permitirían degradar parcialmente el polisacárido y liberar productos de bajo peso molecular que podrían actuar como inductores posteriores (Sanchez y Demain, 2002). De esta manera, se concluyó que el ácido D-galacturónico a un nivel de 3 g/L estimula la síntesis de la enzima, sin embargo, el medio de cultivo que maximiza la actividad PG es con 15 g/L de peptona de soja prescindiendo de la adición del ácido D-galacturónico.

Beg *et al.*, (2000a) refirió que la producción de xilanas y pectinasas no sólo es estimulada por sus propios sustratos como xilano y oligogalacturonanos sino también por los nutrientes no definidos que contienen tanto la peptona como el extracto de levadura. Además, M. Kapoor y Kuhad, (2002) reportaron que los aminoácidos que mejoraron la actividad PG de *Bacillus sp.* MG-cp-2 fueron glicina, serina, alanina, arginina y ácido glutámico. Estos aminoácidos están presentes en un alto porcentaje en la peptona de soja utilizada en esta investigación y aportaron factores que estimularon la producción enzimática en *S. halstedii* ATCC 10897.

La tabla 16 muestra una comparación entre los medios de cultivo usados en el estudio de la cepa *S. halstedii* ATCC 10897 en la que se evidencia el incremento de la actividad enzimática usando el medio optimizado (peptona de soja 15 g/L). Este resultado resultó de interés porque es un sustrato de bajo costo y provee a la célula tanto del carbono como del nitrógeno necesario para la síntesis enzimática.

Tabla 16. Actividad PG obtenida en cultivos de *S. halstedii* ATCC 10897 en los diferentes medios de cultivo empleados.

Actividad PG	Medio de cultivo		
	Inóculo	Screening	Optimizado
PG (U/mL)	0.012 ± 0.008	0.551 ± 0.015	1.052 ± 0.028
PG (% reducción-η)	1.6 ± 0.7	94.3 ± 2.5	96.1 ± 1.6

Los resultados muestran que el medio optimizado duplica la actividad PG medida en U/mL con respecto del medio del *screening*. Por otro lado, la reducción de la viscosidad de una solución de pectina llegó a niveles hasta del 97% empleando el medio optimizado, superando la media de 95% obtenida en el medio del *screening*. Además, no se observó evidencia de actividad PG en el medio de crecimiento del inóculo lo cual puede explicarse por la alta concentración de monosacáridos (glucosa: 4 g/L y extracto de malta: 10 g/L) que actuarían como represores catabólicos (Kapoor *et al.*, 2000; Rehman *et al.*, 2012). Aunque la pectina es la fuente de carbono más empleada para la inducción de enzimas pectinolíticas

y la actividad PG, la misma se ve aumentada suplementando nitrógeno de fuentes orgánicas como extracto de levadura, diferentes peptonas, caseína, triptona, extracto de carne y de malta (Jacob *et al.*, 2008a; Kar y Ray, 2011; Rehman *et al.*, 2012). En el presente trabajo se encontró que, en la cepa de estudio, la peptona de soja es el sustrato que aporta el carbono y el nitrógeno (macronutrientes) y otros complementos nutricionales específicos para el crecimiento celular y producción de PG.

Hasta el momento, en todas las pruebas experimentales de diseño de medio de cultivo, las determinaciones de crecimiento celular y de actividad enzimática fueron realizadas a las 24 horas de cultivo. Ya definida la formulación del medio que maximizó la actividad PG, se realizó una cinética de crecimiento celular y se comparó con el medio de cultivo del *screening* (Figura 33).

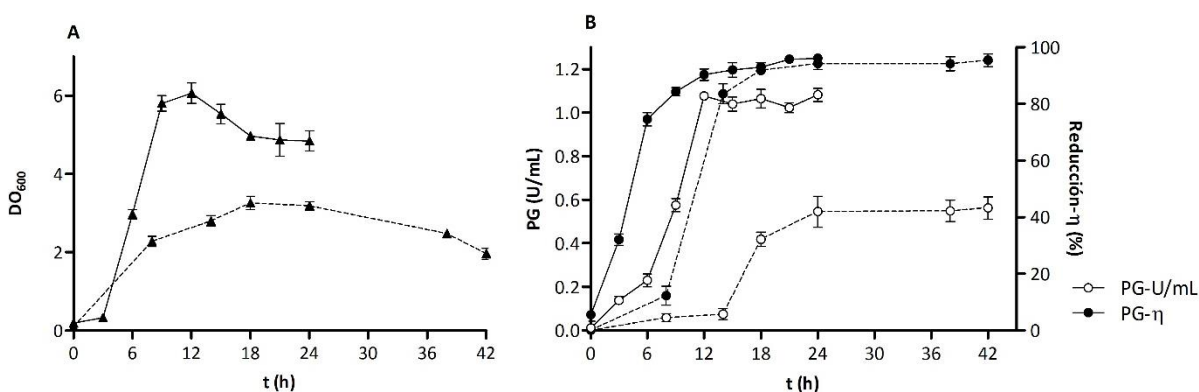


Figura 33. Cinética de crecimiento celular (A) y actividad PG (B) de *S. halstedii* ATCC 10897 en el medio de cultivo empleado para el *screening* (líneas punteadas) y en el medio de cultivo optimizado (líneas continuas).

En el medio optimizado se observó una fase de latencia del crecimiento celular durante las 3 horas iniciales del cultivo (figura 33A) y un rápido aumento en la actividad enzimática (U/mL), alcanzando a las 9 horas el mismo valor que se obtuvo a las 24 horas con el medio del *screening* (0.545 ± 0.046 U/mL). Este valor se duplica en las siguientes 3 horas y se mantiene constante a 1.076 ± 0.022 U/mL durante el tiempo evaluado (Figura 33B), obteniéndose la máxima actividad hidrolítica a las 12 horas, lo cual aumentó la productividad del proceso. Respecto de la medición en reducción de la viscosidad, el aumento fue más notorio desde el inicio de la fermentación y el tiempo de máxima actividad fue a las 18 horas en ambos medios con un valor promedio de 95% (Figura 33B).

En ambos medios evaluados, la actividad enzimática alcanzó su nivel máximo y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación. Este comportamiento resultó de especial interés porque sugiere que la interacción de los productos metabólicos de *S. halstedii* 10897 no

afectó la actividad PG y mostró indicios de una alta estabilidad enzimática. Diferentes comportamientos de las fermentaciones para la producción de enzimas pectinolíticas han sido reportados en otros estudios, en los cuales se ha observado una pérdida de la actividad hasta del 50% después de 36 horas con *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 (Kar y Ray, 2011).

Conclusión parcial

Las cepas del género *Streptomyces* sobresalieron entre más de 29 géneros evaluados de las 100 cepas seleccionadas del banco de bacterias de LIBioS. La cepa *S. halstedii* ATCC 10897 mostró la máxima actividad poligalacturonasa y el proceso de fermentación en matraz fue optimizado. Se halló que un pH de 8, el medio de cultivo con 15 g/L de peptona de soja, 28 °C, agitación a 200 rpm y 12 horas de cultivo celular son las condiciones que maximizan la actividad PG, llegando a valores de 1.076 ± 0.022 U/mL y 95% de reducción de viscosidad.

2. AISLAMIENTO DE LA ENZIMA

Proceso de purificación y tamaño molecular

Los cultivos celulares de *S. halstedii* ATCC 10897 desarrollados durante las diferentes etapas experimentales para la optimización de la producción enzimática, fueron analizados mediante geles de electroforesis nativo (PAGE-nativo) para identificar el perfil protéico extracelular. Los sobrenadantes de los cultivos se concentraron por evaporación al vacío en un factor volumétrico de 50X. Posteriormente, se sembraron 20 µL de las muestras en el gel de poliacrilamida al 12% (p/v) a las condiciones nativas y los resultados se muestran en la figura 34. Las imágenes de los geles revelados con solución de plata comparan la expresión de proteínas extracelulares en los diferentes medios de cultivo evaluados durante la secuencia de experimentos. Se observó que en el medio de cultivo con pectina cítrica no se evidencian diferencias significativas en la cantidad de bandas obtenidas, pero sí en la intensidad de las señales. En figura 34A, en las 4 calles de las muestras evaluadas, se observan dos bandas cercanas a 66 kDa, otra a 45 kDa aproximadamente y una última en 29 kDa, lo cual evidencia 4 señales de proteínas en el rango del tamaño molecular evaluado en el gel de electroforesis. En los medios de cultivo con peptona de soja (Figura 34B), se observaron entre 4 y 5 señales de proteínas cercanos a 66 y 45 kDa, en la calle 3 se probó un sobrenadante sin actividad enzimática proveniente de cultivo celular en el medio empleado para el preinóculo, en ésta se observaron bandas tenues a un nivel inferior de 20 kDa. Entonces, se sugiere que en el rango de 45 a 66 kDa se halla la proteína con la actividad

PG evaluada. De otro lado, se realizaron geles SDS-PAGE en los cuales las condiciones desnaturizantes indicarían características de la conformación estructural de las proteínas, sin embargo, el perfil de las bandas obtenido se conservó similar a los geles nativos.

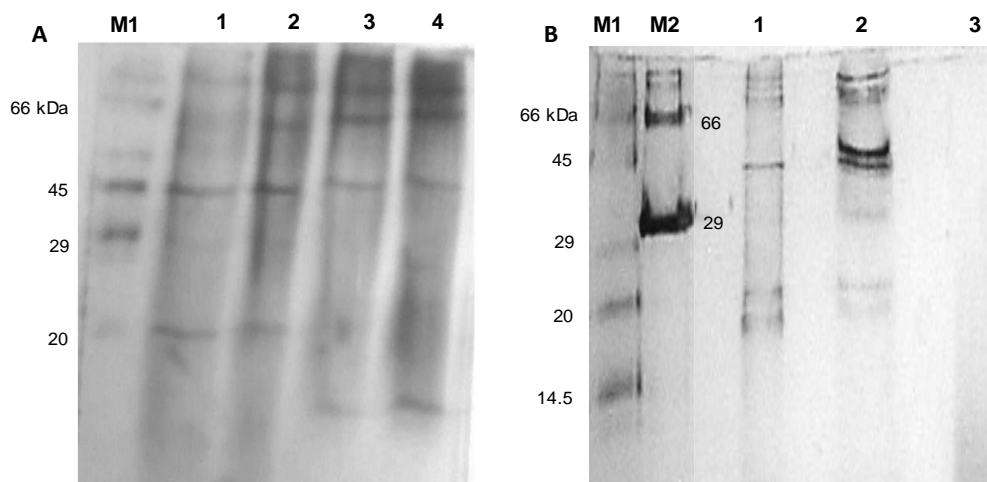


Figura 34. Geles de electroforesis PAGE-nativo de sobrenadantes de cultivo celular en medios de cultivo con pectina cítrica (A). Calles: M1-marcador de peso molecular, 1-medio sin pectina cítrica, 2-pectina cítrica: 2.5 g/L, 3-7.5 g/L y 4: 10 g/L y medios de cultivo con peptona de soja (B). Calles: M1 y M2-marcador de peso molecular, 1-peptona de soja: 6 g/L, 2-15 g/L y 3-medio de cultivo de preinóculo.

Posteriormente, se realizaron pruebas de purificación mediante precipitación por salado y ultrafiltración para aislar la proteína de interés y las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis a condiciones desnaturizantes (Figura 35). Después de precipitar el sobrenadante a las 12 horas de cultivo de *S. halstedii* ATCC 10897 en el medio optimizado, se cuantificó actividad PG a la fracción precipitada y desalada, obteniendo valores de 1.876 ± 0.033 U/mL y 92.6% de reducción de viscosidad. Se realizó la electroforesis y en el gel se observó una banda intensa entre 40 y 55 kDa y otra apenas perceptible entre 25 y 35 kDa (Figura 35A), lo cual evidenció una concentración y purificación de la proteína reflejado en una reducción de la cantidad de proteína total y un aumento de la actividad enzimática. Las señales en el SDS-PAGE de la fracción retenida de la ultrafiltración en el sistema de *cassette* con membrana de 10 kDa MWCO, fueron similares al producto precipitado, en el cual la banda más intensa es aproximadamente de 48 kDa y otra muy tenue a 29 kDa (Figura 35B). No obstante, la actividad fue 4.258 ± 0.051 U/mL y 93% de reducción de la viscosidad, lo cual demostró que la ultrafiltración permitió un mayor grado de purificación que la precipitación y que el peso molecular de la proteína en estudio es de 48 kDa (Ramírez-Tapias *et al.*, 2015).

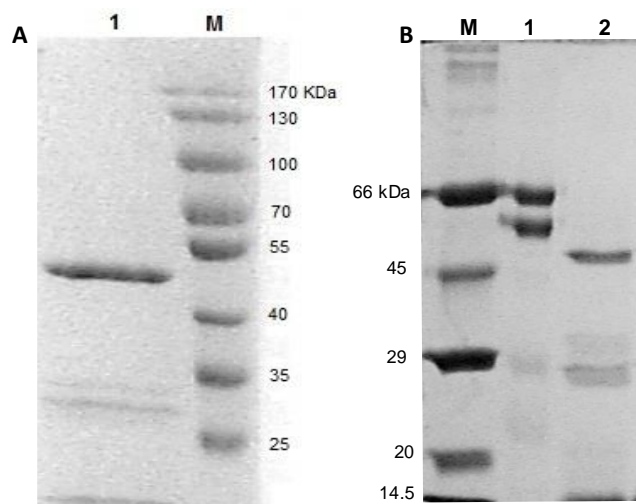


Figura 35. Geles de electroforesis SDS-PAGE. Precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación y desalado en membrana de 10 kDa (A). Calles: M-marcador de peso molecular, 1-muestra del purificado. Ultrafiltración en *cassete* de 10 kDa (MWCO) hasta concentración volumétrica 20x (B) Calles: M-marcador de peso molecular, 1-patrón de BSA, 2-muestra de fracción retenida en proceso de ultrafiltración.

La similitud obtenida en el patrón de bandas en los geles PAGE-nativo y SDS-PAGE, sumado a la señal a 48 kDa de las muestras purificadas, sugiere que la PG obtenida de *S. halstedii* ATCC 10897 es monomérica. Este resultado coincide con las investigaciones reportadas para este tipo de hidrolasa, las cuales indican que la estructura de la enzima está constituida por una secuencia monomérica que varía entre 363 y 717 aminoácidos (Jayani *et al.*, 2005).

Se ha reportado que las poligalacturonasas bacterianas son enzimas con un peso molecular en un rango de 30 a 80 kDa, algunas superan este margen superior como aquella producida por *B. licheniformis* KIBGE-IB21, la cual resultó en 153 kDa (Rehman *et al.*, 2015). Sin embargo, las enzimas pectinolíticas obtenidas a partir de diferentes especies del género *Bacillus* suelen tener un tamaño molecular típicamente entre 45 a 60 kDa (Kapoor *et al.*, 2000; Kobashi *et al.*, 2001) y los reportes de enzimas producidas por dos cepas *Streptomyces*, indicaron un peso molecular de 63 y 43 kDa, para *S. erumpens* MTCC 7317 y *S. lydicus*, respectivamente (Jacob *et al.*, 2008; Kar and Ray, 2011).

El proceso de purificación en un único paso de ultrafiltración permitió obtener la enzima purificada y activa. Debido a ello, los estudios de sus características de reacción y estabilidad fueron realizados con un extracto correspondiente a la fracción retenida del proceso de ultrafiltración.

Efectos de la temperatura y el pH en la actividad enzimática

La actividad enzimática del extracto purificado por ultrafiltración de la PG obtenida de *S. halstedii* ATCC 10897 fue evaluada a diferentes condiciones térmicas y de pH (Figura 36). La concentración de proteína se fijó a 0.5 mg/mL y los valores de PG fueron mayores a 1.0 U/mL y reducción de viscosidad promedio de 95.5% para un amplio rango de temperatura a un pH fijo de 7, desde 5 hasta 50 °C (Figura 36A). A 60 °C no se observaron variaciones en la medida de viscosidad, pero las referidas a la concentración de azúcares reductores producidos durante la hidrólisis (U/mL) se redujo en un 15%. A 80 °C las enzimas tuvieron una actividad del 60 y el 35%, respecto de la máxima liberación de azúcares y reducción de la viscosidad, respectivamente.

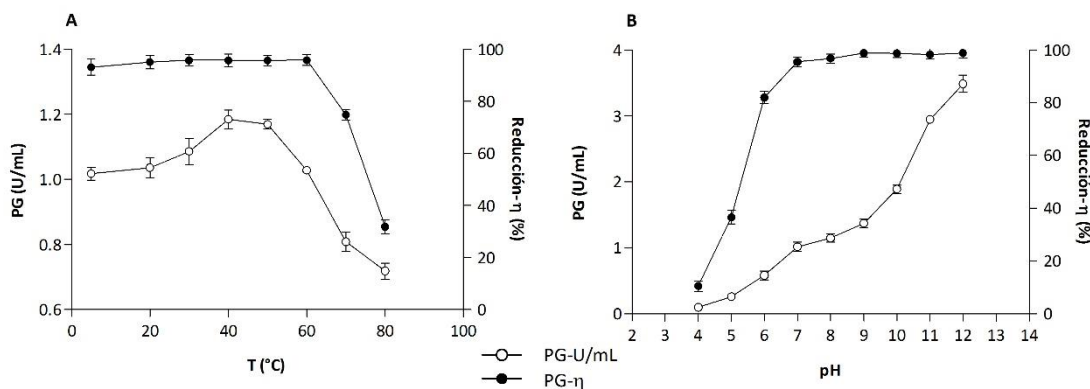


Figura 36. Efecto de la temperatura en la actividad PG a pH 7 (A) y efecto del pH sobre la PG a 50 °C (B). Se empleó ácido poligalacturónico 1% (p/v) como sustrato.

El efecto del pH en la actividad enzimática fue evaluado a una temperatura fija de 50 °C. Como se muestra en la figura 36B, el valor referido al método viscosimétrico fue elevado en un rango de 7 a 12 (98% de reducción-η). La medición en U/mL alcanzó su valor máximo a pH 12 (3.489 ± 0.127 U/mL) y el pH 13 no pudo evaluarse debido a que la mezcla de reacción no fue completamente soluble. Los resultados obtenidos demuestran una actividad PG altamente alcalofílica y resultó 3.4 veces aumentada respecto de las condiciones iniciales de la prueba (1.014 ± 0.075 U/mL).

La estabilidad térmica de las enzimas fue analizada en términos de la actividad residual después de su exposición a temperaturas entre 30 y 70 °C (Figura 37). A 30 y 40 °C las enzimas estuvieron completamente activas durante 144 horas. La PG conservó su actividad catalítica medida en U/mL durante 528 y 360 horas a 30 y 40 °C, respectivamente (Figura 37A). Del mismo modo, los valores de actividad referidos a las mediciones viscosimétricas,

fueron mayores al 60% durante todo el tiempo evaluado (Figura 37B). Después de 4 horas, ambos valores de actividad PG retuvieron más del 80% de la actividad a 50 °C mientras que la inactivación por efecto térmico se observó a 60 y 70 °C, éste comportamiento puede responder a un incremento en la energía cinética que promueve cambios estructurales en la enzima.

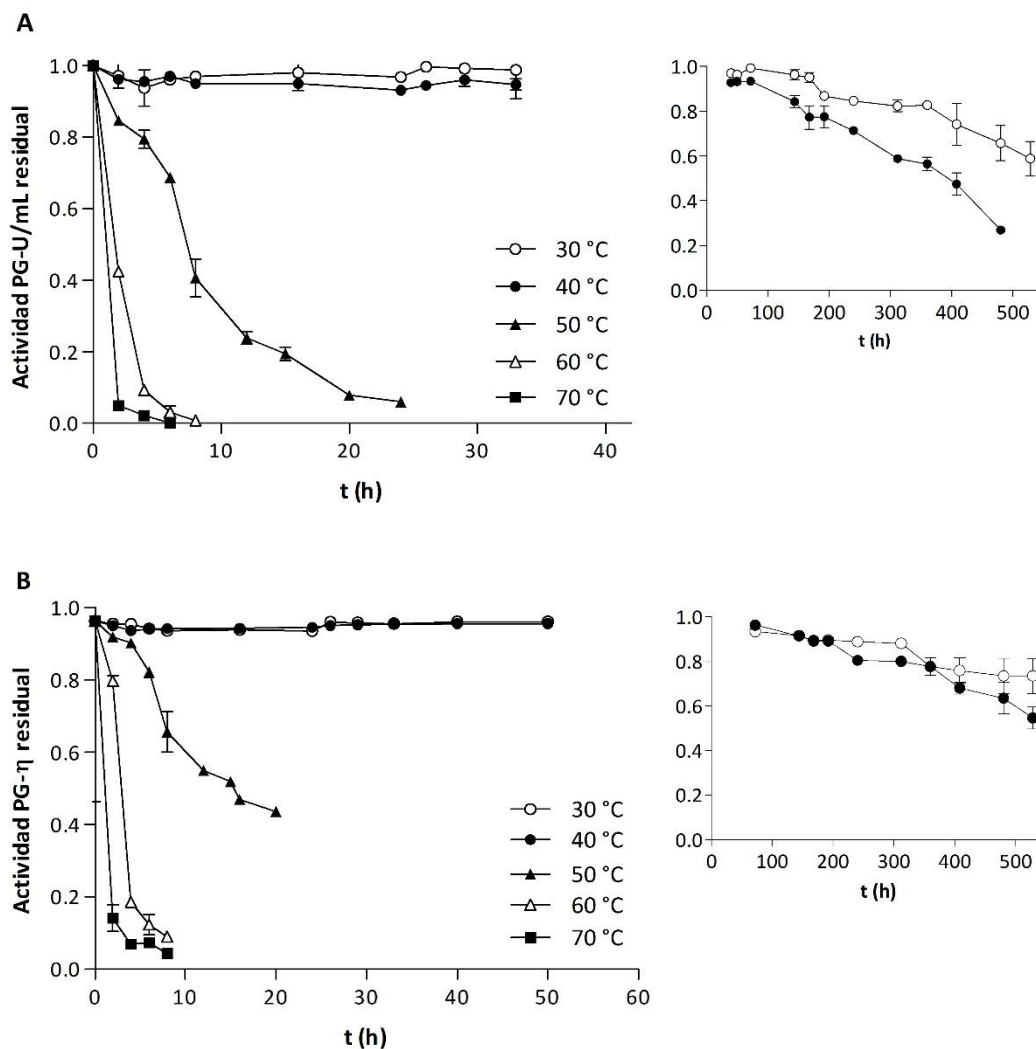


Figura 37. Estabilidad térmica de la PG obtenida por *S. halstedii* ATCC 10897.

La mayoría de estudios a cerca de las PG de origen microbiano reportados en la literatura son mesofílicas y actúan en pH ácido debido a que la principal fuente de obtención de este tipo de enzimas son las especies fúngicas (Jayani *et al.*, 2005). Las enzimas pectinolíticas reportadas con actividad enzimática a pH alcalino son producidas por *Bacillus licheniformis*, actúa a pH 10 y un aumento en este valor resultó en una disminución de la actividad. También, la temperatura óptima de acción fue 45 °C pero la estabilidad térmica reportada

es menor a la hallada para la PG del presente estudio, ya que retuvo el 50% de actividad inicial durante 72 horas a 30 y 40 °C (Rehman *et al.*, 2013). Los reportes de enzimas con acción en compuestos pécticos producidas por bacterias del género *Streptomyces* mostraron que el pH óptimo de actividad se da entre 6 y 7 y un aumento en estos valores causan una reducción importante en la actividad (Jacob *et al.*, 2008b; Kar y Ray, 2011). En definitiva, los resultados descritos, en comparación con otras investigaciones, exceden satisfactoriamente el rango de acción enzimática hasta pH 12 y se pueden implementar reacciones en un amplio rango de temperatura (5 – 50 °C) con la PG de *S. halstedii* ATCC 10897.

Estabilidad enzimática: Efecto de iones y solventes

Algunos compuestos orgánicos, así como cargas iónicas, pueden estar presentes en material vegetal o efluentes con compuestos pécticos. Asimismo, durante el proceso de inmovilización enzimática podría requerirse de este tipo de compuestos para lograr la unión de la enzima en el material de soporte o para que el biocatalizador heterógeno mantenga su estabilidad, tanto de las características mecánicas y estructurales como de la actividad biológica de la enzima. Es así como se evaluaron diferentes sales como cloruro de sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso y aluminio a concentraciones de 20 y 200 mM. En la figura 38A se muestra el efecto de las sales en la actividad hidrolítica, se observa que el manganeso afectó drásticamente y el catión trivalente de aluminio también generó un descenso hasta del 30%, ambos iones con una elevada densidad de carga, ambos átomos con una electronegatividad de 1.5 en la escala de Pauling. Este mismo comportamiento fue reportado para una PG producida por *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 que redujo su actividad hasta un 25% de la actividad inicial (Martins *et al.*, 2007). De otro lado, el calcio y magnesio, ambos metales alcalinotérreos, tuvieron efectos diferenciales en la reacción, mientras el calcio no afectó la hidrólisis del ácido poligalacturónico, el magnesio afectó reduciendo en un 20% la actividad hidrolítica, resultados que pueden asociarse a la electronegatividad y la energía de ionización, siendo el magnesio más electronegativo que el calcio, con valores de 1.2 y 1.0 en la escala de Pauling, respectivamente. Adicionalmente, los metales alcalinos de sodio y potasio, iones con la menor electronegatividad de las sales evaluadas, no afectaron la reacción enzimática manteniendo en valores máximos la actividad PG, similares al control positivo. La interferencia de los cationes con una mayor energía de ionización en la reacción enzimática puede explicarse por las interacciones que pueden ejercer en el sitio catalítico, impidiendo que se ejecuten de manera eficiente los mecanismos del donador de protón y ataque nucleofílico o que puedan ocurrir fenómenos de desnaturalización parcial por cambios conformacionales en la estructura terciaria de las proteínas.

También se destaca el hecho que la actividad pectinolítica en presencia de calcio se mantuvo al mismo nivel del control positivo, sin evidenciar un efecto que la favoreciera de manera significativa. Esto sugiere la naturaleza de tipo hidrolasa de la enzima, confirmando que la proteína en estudio se trata de una poligalacturonasa, ya que las pectinasas del tipo liasas, que actúan por β -eliminación, requieren del ion calcio para la escisión de los compuestos pécticos y la formación del doble enlace en el urónido, lo cual está reportado que aumenta la actividad hasta 4 veces (Highley, 1997; Li *et al.*, 2012).

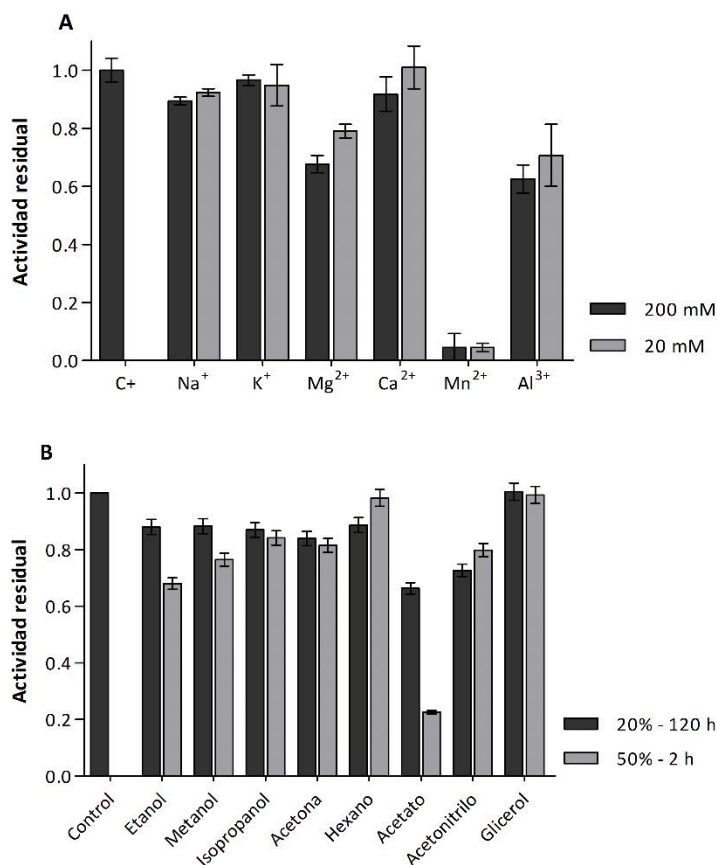


Figura 38. Estabilidad enzimática bajo la presencia de iones a diferentes concentraciones (A) y de solventes orgánicos (B).

Adicionalmente, en este estudio se encontró que la PG de *S. halstedii* ATCC 10897 es una enzima estructuralmente resistente a ambientes adversos en los que encuentran solventes orgánicos (Figura 38B). A una concentración de 20% (v/v) de etanol, metanol, isopropanol, acetona y hexano la actividad catalítica residual se mantuvo cercana al 90% respecto del control positivo durante 120 horas (5 días). El acetato de etilo y el acetonitrilo redujo la actividad al 65 y 70%, respectivamente en las mismas condiciones. Al aumentar la cantidad de cada solvente al 50% y después de 2 horas de evaluación en presencia de alcoholes, la actividad estuvo entre un 65 y 85% y en acetato de etilo ésta se redujo al 20%. La enzima

bajo la presencia de glicerol no perdió actividad bajo las condiciones experimentales evaluadas, de concentración volumétrica y tiempo de exposición, lo cual indica que existe un efecto protector de este compuesto, característica que ha sido reportada para algunos compuestos como polialcoholes y azúcares los cuales fortalecen las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos no polares, favoreciendo la protección de sitios catalíticos y la resistencia a la desactivación térmica (Gekko y Timasheff, 1981). En definitiva, el efecto de cada tipo de solvente en la estabilidad de las enzimas está relacionado con la disposición de los residuos de aminoácidos en la superficie de la proteína y la capa de solvatación formada.

Cinética enzimática

Los parámetros cinéticos de reacción basados en el modelo de Michaelis-Menten se calcularon a partir de las velocidades de reacción de hidrólisis de ácido poligalacturónico a diferentes concentraciones del sustrato y la linealización de Lineweaver-Burk (Figura 39). De esta manera, se halló un valor de K_m de 0.150 M y V_{max} de 2.296 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Al definir un intervalo de confianza del 95%, éstos parámetros pueden tener valores entre 0.075 y 0.150 M y 1.522 y 2.296 $\mu\text{mol}/\text{min}$, para K_m y V_{max} , respectivamente.

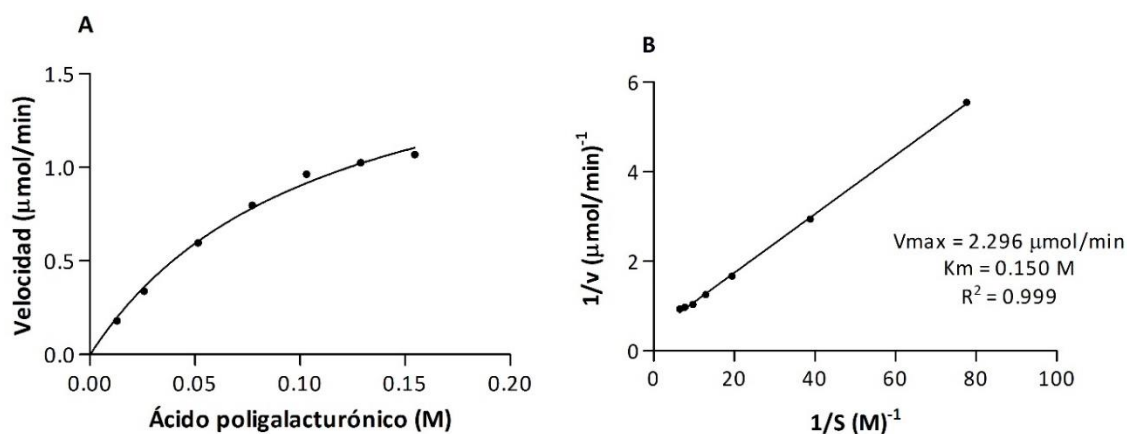


Figura 39. Parámetros cinéticos de la enzima según el modelo de Michaelis-Menten. (A) Velocidad enzimática y (B) linealización según Lineweaver-Burk.

Después de determinar los parámetros cinéticos de la enzima, se seleccionó una concentración de sustrato de 1% (p/v) o 0.052 M y se midió la generación de producto periódicamente. En la figura 40 se muestran los resultados y se observa que la máxima generación de producto, expresado en liberación de ácido D-galacturónico, se alcanzó a los 20 minutos de reacción. Sin embargo, la influencia del biocatalizador en la viscosidad del

sustrato es más rápida, obteniéndose la máxima reducción de viscosidad pasados 5 minutos de reacción.

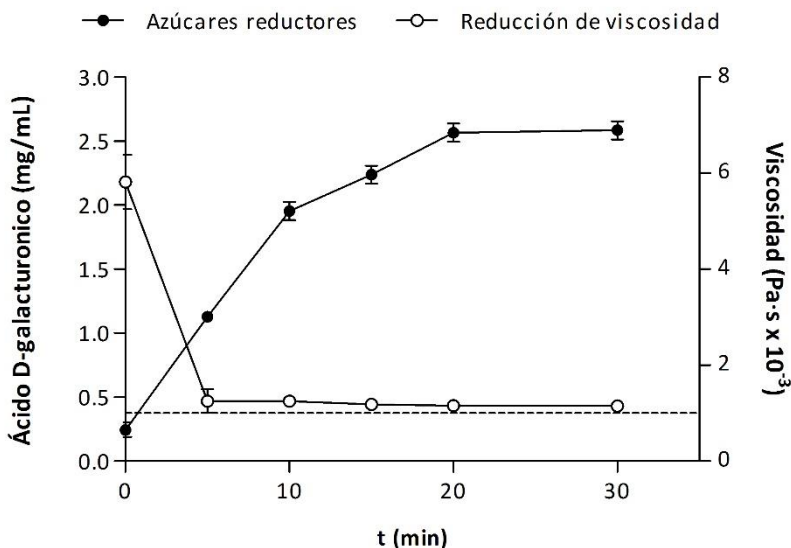


Figura 40. Cinética de la reacción catalizada por PG usando 1% (p/v) de ácido poligalacturónico como sustrato y 0.5 mg/mL de proteína.

Cromatografía de capa fina

Con el propósito de observar características de los productos formados durante la reacción enzimática catalizada por la PG obtenida de *S. halstedii* ATCC 10897 se realizó una cromatografía de capa fina con muestras de reacciones empleando como sustrato ácido poligalacturónico (Sigma) y pectina cítrica comercial (Figura 41). En las calles 1, 2, 4 y 6 se evaluaron patrones de ácido D-galacturónico, ácido poligalacturónico, pectina cítrica comercial y glucosa, respectivamente. Los factores de retención (Rf) correspondientes a los monosacáridos, fueron 0.42 para ácido el D-galacturónico y 0.91 para la glucosa, el ácido poligalacturónico sólo mostró señal en la línea de base, evidenciando el alto peso molecular y mínima afinidad con la fase móvil, y la pectina cítrica mostró dos señales, tanto en la línea de base y a un Rf de 0.86, indicando un contenido de monosacáridos similares a la glucosa. Las reacciones realizadas con la PG, empleando los dos sustratos, ácido poligalacturónico y pectina cítrica comercial, evidenciaron la producción de ácido D-galacturónico debido al Rf que presentaron las señales de las muestras en las calles 3 y 5 (0.39), similar al del ácido D-galacturónico.

Estos resultados indican que la enzima estudiada tiene más afinidad por el enlace glicosídico del extremo de la cadena del polímero, formando como producto el monómero. Sin embargo, la enzima probablemente puede actuar mediante múltiples y simultáneos

ataques en la cadena, debido a la rápida reducción de viscosidad que se evidenció a tiempos cortos de reacción (Figura 41).

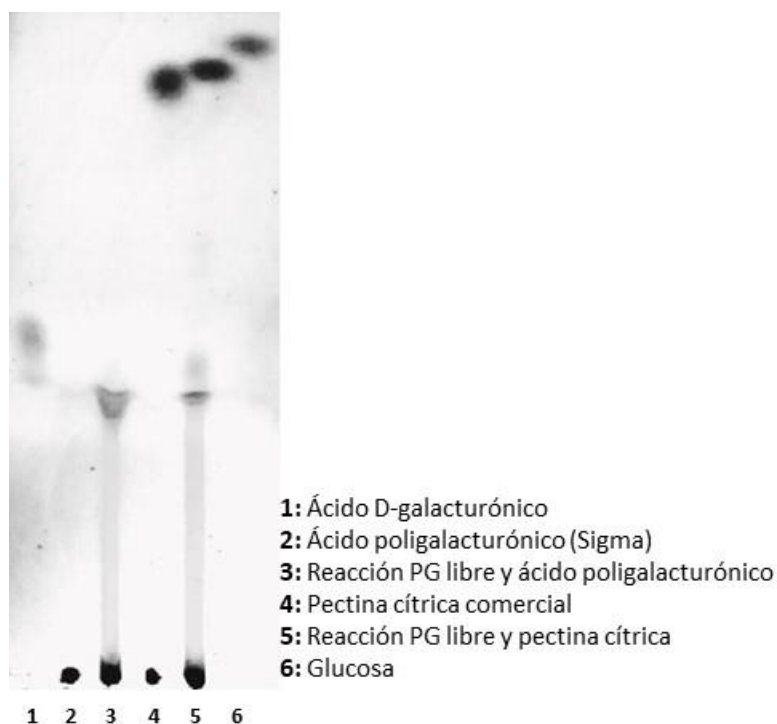
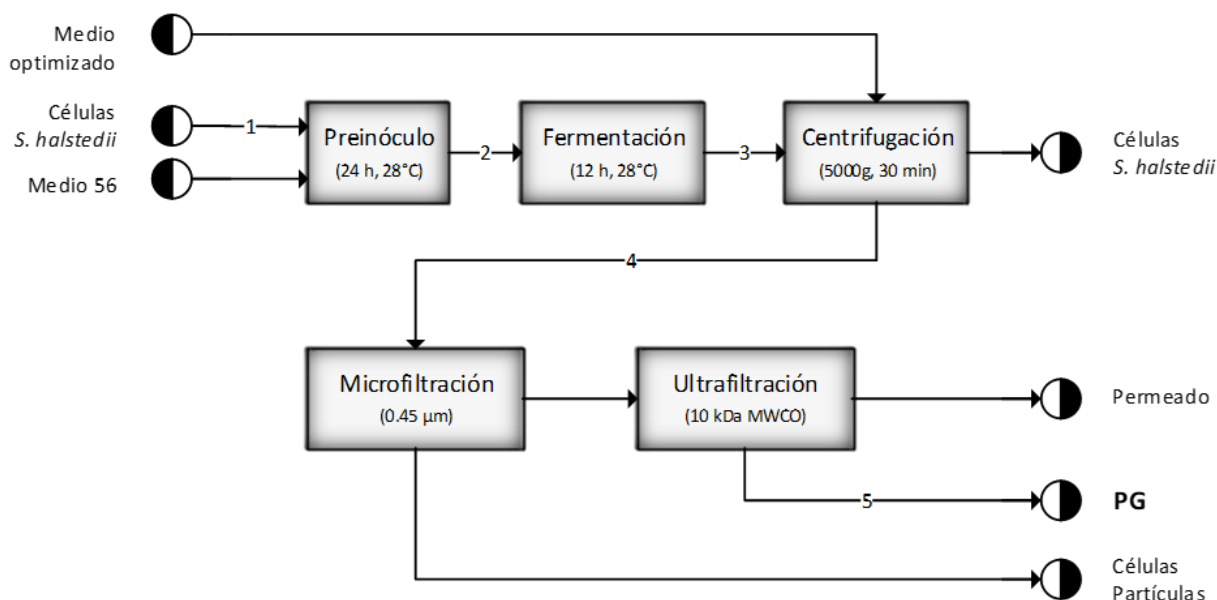


Figura 41. Cromatografía de capa fina de los productos de la reacción catalizada por PG usando ácido poligalacturónico y pectina cítrica como sustrato.

Diagrama de Proceso: obtención y recuperación de PG producida por *S. halstedii* 10897

Se describió el proceso para seleccionar el microorganismo productor de las enzimas de interés y el proceso de optimización del medio de cultivo para maximizar la actividad PG. Posteriormente, se describieron las etapas necesarias para la recuperación y purificación enzimática y algunas características bioquímicas del tipo de enzima obtenida. Finalmente, se obtuvo un extracto enzimático con una actividad a pH 12 de 4.25 U/mL, equivalente a producir 2.585 mg/mL de azúcares reductores y una reducción de viscosidad del 95.5% a los 20 minutos de reacción. Se determinó que el peso molecular aproximado de la proteína es de 48 kDa y las constantes cinéticas halladas resultaron en valores de K_m de 0.150 M y V_{max} de 2.296 $\mu\text{mol}/\text{min}$. La figura 42 muestra el proceso en un diagrama de bloques en el cual se describen las etapas de proceso y los flujos, con los detalles de la operación.



Detalles de las corrientes				
1	2	3	4	5
Alícuota de criotubo (- 80 °C)	DO ₆₀₀ : 2.66 ± 0.61 10% (v/v) Sin actividad PG	DO ₆₀₀ : 4.98 ± 0.32	Sobrenadante (Proteína indeterminada) 1.076 ± 0.022 U/mL	PG concentrada Proteína: 2.125 ± 0.028 mg/mL 4.258 ± 0.033 U/mL

Figura 42. Diagrama de bloques del proceso de fermentación y recuperación de PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897.

Conclusión parcial

Las enzimas con actividad poligalacturonasa producidas por *S. halstedii* ATCC 10897 son de carácter alcalofílico y presentan actividad óptima a pH 12 y 50 °C. Son proteínas monoméricas con un peso molecular aproximado de 48 kDa. El proceso de recuperación y purificación de la proteína se propone en un paso principal de ultrafiltración en membrana tipo *cassete* de 10 kDa de peso molecular de corte, lo cual favorece los rendimientos del proceso. El extracto enzimático purificado obtenido presentó una concentración de proteína de 2.125 mg/mL con elevada estabilidad en presencia de iones potasio y sodio y solventes orgánicos. A través del proceso de purificación y optimización de las condiciones de reacción, la actividad enzimática fue aumentada 4 veces con respecto del sobrenadante de cultivo evaluado a pH 7 y 50 °C.

3. INMOVILIZACIÓN Y BIOCATÁLISIS

UNIÓN A SOPORTES

Selección del soporte

El proceso de inmovilización de la enzima en agarosa funcionalizada se realizó usando tres tipos de grupos reactivos en la superficie del soporte, éstos fueron glioxil, PEI y MANAE. Las enzimas interactúan a través de diferentes mecanismos según el grupo funcional, con el glioxil-agarosa se producen enlaces covalentes entre aldehídos lineales en el soporte y grupos amino de la proteína, especialmente lisinas superficiales. El PEI-agarosa y MANAE-agarosa, son soportes con grupos amino que producen interacciones por adsorción con la enzima. Con el propósito de identificar un soporte que permita una inmovilización eficiente y preserve la actividad enzimática, se usaron los tres en mención y se evaluó el curso de la inmovilización durante 180 minutos (Figura 43).

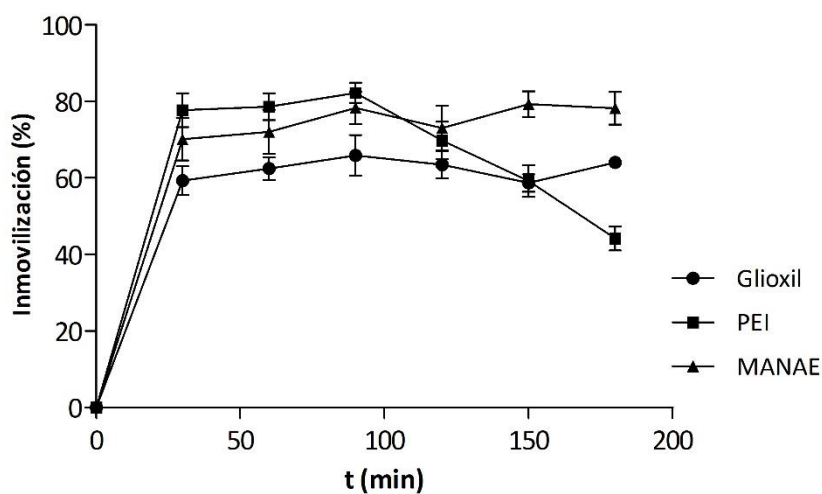


Figura 43. Inmovilización enzimática en soportes de agarosa funcionalizada a 28 °C y agitación orbital, la concentración inicial de proteína fue 1 mg/mL y se midió la fracción soluble a intervalos de 30 minutos.

Se analizó la fracción de proteína soluble remanente a intervalos de 30 minutos y por diferencia con respecto de la cantidad inicial de proteína, se calculó la fracción unida. La PG fue satisfactoriamente inmovilizada en los soportes ensayados, obteniendo más del 60% de inmovilización en tan solo 30 minutos con los 3 tipos de agarosa funcionalizada, sugiriendo una interacción rápida entre las proteínas y los diferentes grupos reactivos disponibles en la superficie de las partículas. Durante la inmovilización en glioxil-agarosa y MANAE-agarosa se conservó constante la fracción de proteína unida al soporte pasados los 180 minutos de

proceso; usando PEI-agarosa disminuyó la cantidad de proteína inmovilizada mostrando una reversibilidad en las interacciones.

Dado que los tipos de unión entre las enzimas y los grupos amino del soporte PEI-agarosa se dan por interacción iónica, se puede indicar que la fuerza de adsorción es inestable y de carácter reversible debido a la composición y estructura específica de la proteína y al tipo interacciones electrostáticas que se establecen con los diferentes grupos amino disponibles (Wu *et al.*, 2014). Por el contrario, los soportes MANAE- y glioxil-agarosa evidenciaron uniones estables con las proteínas durante todo el tiempo evaluado, resultando un promedio del porcentaje de inmovilización de 75% y 65%, respectivamente.

Las condiciones de inmovilización, tales como estrés mecánico y variaciones de las magnitudes fisicoquímicas puede generar efectos adversos en la actividad enzimática, por lo cual lograr altos porcentajes de inmovilización no necesariamente implica elevados niveles de actividad enzimática. Es por ello que fue necesario realizar reacciones de hidrólisis de ácido poligalacturónico para comprobar que los biocatalizadores heterogéneos obtenidos retuvieron su actividad enzimática (Figura 44A). Este estudio para el análisis del avance de cada reacción enzimática en función del tiempo, sugirió que se produce hidrólisis del polímero desde el inicio de la reacción y la máxima concentración del producto se logró a las 4 horas con los tres biocatalizadores evaluados. Posterior a las 4 horas de la reacción hidrolítica no hubo variaciones significativas, obteniéndose una concentración de producto en mg/mL de 1.556 ± 0.107 , 1.266 ± 0.019 y 0.0748 ± 0.012 usando glioxil, PEI y MANAE, respectivamente. Bajo las condiciones experimentales evaluadas, el mejor resultado fue el obtenido empleando el biocatalizador de glioxil-agarosa, logrando una mayor formación de producto que con los inmovilizados por adsorción, además de un rendimiento máximo de 3.069 ± 0.156 g/g (Figura 44B).

Cada sistema de inmovilización evaluado puede tener un comportamiento singular debido a las diferentes condiciones del proceso, tales como las distribuciones de los grupos reactivos del soporte, el grado de activación y la conformación, estructura y orientación molecular de la proteína (Talbert y Goddard, 2012), por lo que el mecanismo de unión puede cambiar la conformación del sitio activo de la enzima afectando los rendimientos de conversión. Por lo tanto, la comparación del desempeño en la reacción entre los diferentes biocatalizadores fue clave para el desarrollo del biocatalizador inmovilizado con máxima actividad PG y así favorecer el desarrollo de las aplicaciones en alimentos y ambiente. En este sentido, el biocatalizador heterogéneo con actividad PG inmovilizado en glioxil-agarosa mostró el mejor desempeño en ambas cuestiones, el porcentaje de inmovilización de la

proteína y su actividad catalítica, siendo éste soporte el seleccionado para los ensayos experimentales subsiguientes.

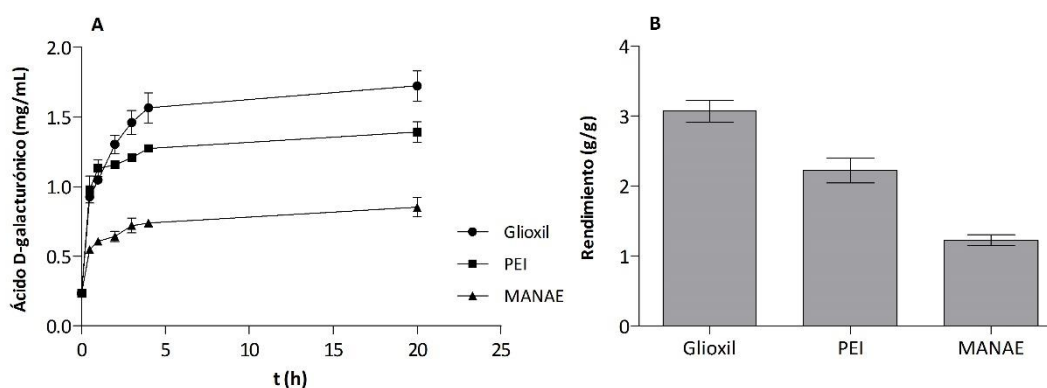


Figura 44. Reacción enzimática con biocatalizador inmovilizado con actividad PG. (A) Cinética de la reacción y (B) Rendimiento del producto a 4 horas de reacción. El rendimiento (g/g) es expresado en g de ácido D-galacturónico producido por g de proteína. Las reacciones se realizaron por triplicado empleando ácido poligalacturónico (1% (p/v)) como sustrato.

Diseño y optimización del biocatalizador en glioxil-agarosa

Posterior a la selección del soporte glioxil-agarosa como el mejor para la inmovilización de la enzima, se realizó un diseño experimental de dos factores 5x3: concentración de proteína (A) a cinco niveles entre 0.25 y 2.00 mg/mL y cantidad de soporte (B) a tres niveles entre 0.05 y 0.2 g/mL, con el propósito de mejorar las condiciones de inmovilización para maximizar la hidrólisis del ácido poligalacturónico. Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente para identificar los efectos simples (A y B) y de interacción (AB) de los factores en las variables de respuesta basados en los coeficientes de determinación (R^2), los cuales indicaron que los modelos matemáticos del diseño factorial se ajustan y explican más del 83% de las variaciones observadas en las mediciones (Tabla 17).

Si bien la concentración de proteína y la cantidad de soporte afectaron positivamente el porcentaje de inmovilización (valor-p = 0.000), esta respuesta sólo varió entre 40 y 58% siendo cercano al 60% de inmovilización hallado en el experimento previo (Figura 43) cuyas condiciones experimentales fueron iguales a las del tratamiento 8. De otro lado, los valores de la concentración de ácido D-galacturónico generado y el rendimiento de la reacción aumentaron en algunos tratamientos, superando los valores obtenidos previamente de 1.556 ± 0.107 mg/mL y 3.069 ± 0.156 g/g, respectivamente. En este sentido, las condiciones del tratamiento 4 promovieron un incremento de 1.5 veces la concentración de producto y el análisis de varianza indicó que la concentración de proteína tiene un efecto significativo

positivo, contrario al efecto de la cantidad de soporte, el cual fue negativo para la respuesta de concentración de producto. Entonces, el diseño experimental indicó que los mayores valores de producto fueron obtenidos con la mayor cantidad de proteína y menor cantidad de soporte. Respecto del rendimiento, éste fue mayor cuando ambos factores de estudio estuvieron en los niveles mínimos debido al efecto negativo y significativo de la concentración de proteína y cantidad de soporte, adicionalmente, el efecto de la interacción (AB) favoreció esta respuesta. Así que, ambos factores tuvieron que estar en niveles bajos para alcanzar los máximos rendimientos de conversión.

Tabla 17. Matriz experimental del diseño 5x3 de dos factores para la inmovilización de la PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 variando (A) concentración de proteína y (B) cantidad de soporte como factores de estudio.

Tratamiento	Factores		Variables respuesta		
	Proteína (A) (mg/mL)	Soporte (B) (g/mL)	Inmovilización (%)	Producto (mg/mL)	Rendimiento (g/g)
1	0.25	0.05	40.2 ± 2.6	0.537 ± 0.019	8.777 ± 0.142
2	0.50	0.05	42.2 ± 3.5	1.796 ± 0.087	10.296 ± 0.765
3	1.00	0.05	46.0 ± 1.1	2.282 ± 0.053	9.714 ± 0.678
4	1.50	0.05	47.7 ± 3.4	2.493 ± 0.130	3.993 ± 0.194
5	2.00	0.05	50.8 ± 2.5	2.170 ± 0.061	2.186 ± 0.010
6	0.25	0.10	52.5 ± 3.5	0.650 ± 0.024	5.530 ± 0.791
7	0.50	0.10	57.2 ± 0.6	0.959 ± 0.023	3.356 ± 0.120
8	1.00	0.10	57.1 ± 0.5	1.332 ± 0.088	2.962 ± 0.283
9	1.50	0.10	57.0 ± 1.0	1.343 ± 0.053	1.501 ± 0.036
10	2.00	0.10	57.2 ± 1.2	1.846 ± 0.025	1.261 ± 0.129
11	0.25	0.20	47.3 ± 3.0	0.700 ± 0.155	5.355 ± 0.218
12	0.50	0.20	47.5 ± 1.7	1.033 ± 0.073	4.135 ± 0.212
13	1.00	0.20	51.0 ± 1.0	1.738 ± 0.224	4.003 ± 0.135
14	1.50	0.20	52.2 ± 0.9	1.969 ± 0.024	2.765 ± 0.094
15	2.00	0.20	53.3 ± 1.9	1.938 ± 0.018	1.584 ± 0.097
Inmovilización	0.000 (+)	0.000 (+)	AB = 0.209	AB = 0.718	AB = 0.016(+)
Valor-p Producto	0.000 (+)	0.009 (-)	R ² = 85.1	R ² = 83.7	R ² = 87.6
Rendimiento	0.000 (-)	0.000 (-)	Nivel de significancia (α) = 0.05		

El efecto de la interacción (AB) en el rendimiento de la reacción se ilustra en la figura 45, observándose que los máximos rendimientos obtenidos varían entre 8.777 y 10.296 g/g empleando 0.25, 0.50 y 1.00 mg/mL de proteína y 0.05 g/mL del soporte glioxil-agarosa (tratamientos 1, 2 y 3 en la tabla 17) excediendo en 3.3 veces el rendimiento obtenido en el tratamiento 8. Estos resultados sugieren que la carga de proteína en el soporte podría aumentar la resistencia a la transferencia de masa del sustrato debido a restricciones

espaciales y obstaculizar la difusión molecular, efectos indeseables que se pueden disminuir empleando baja concentración de proteína en el proceso de inmovilización (Talbert y Goddard, 2012).

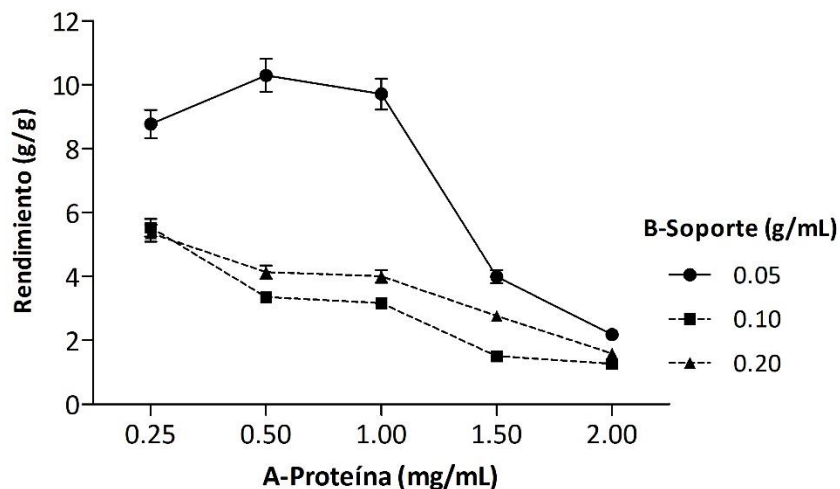


Figura 45. Gráfico de interacción de los factores evaluados (AB) en el diseño experimental 5x3 y sus efectos en la variable de respuesta Rendimiento (g/g). Los resultados de los tratamientos indicados con la línea continua favorecieron el rendimiento de producto.

Sin embargo, las condiciones que proporcionaron el máximo rendimiento presentaron menores porcentajes de inmovilización, siendo de 40.2, 42.2 y 46.0 para 0.25, 0.50 y 1.00 mg/mL de proteína, respectivamente. En consecuencia, se debió definir una estrategia para aumentar la cantidad de enzima unida al soporte y así identificar una carga de proteína eficiente (miligramos de proteína unida a cada gramo de soporte). En este sentido, se propuso realizar inmovilizaciones en etapas sucesivas que fueron llevadas a cabo fijando la cantidad de soporte (0.05 g/mL) y renovando la solución de proteína. La figura 46 muestra la proteína unida al soporte al término de cada etapa de inmovilización y se observó que dos procesos independientes y consecutivos son suficientes para alcanzar la máxima carga de proteína y un tercer procedimiento no aumentó significativamente esta variable. Aplicando esta metodología en dos etapas (I1 y I2), se alcanzó una carga de proteína de 4.5, 10.0 y 16.8 mg/g empleando una concentración de proteína de 0.25, 0.50 y 1.00 mg/mL, respectivamente.

La capacidad de carga de proteína del soporte depende principalmente del diámetro y área superficial de las partículas, lo cual produce una carga de proteína máxima constante si su disposición se da en una monocapa (Jia *et al.*, 2003), sin embargo, se pueden producir interacciones proteína-proteína y adherirse dentro de los poros del soporte mediante difusión molecular, produciendo una disposición en cúmulos o multicapa aumentándose la

capacidad de carga, lo cual podría explicar el resultado máximo de 16.8 mg/g aplicando 2.0 mg/mL de proteína. Sin embargo, el rendimiento de la reacción enzimática se mantuvo en un valor promedio de 10 g/g sin efectos significativos atribuidas a las variaciones de la cantidad de proteína, debido a que aquellas proteínas unidas hacia el interior de las partículas del soporte tienen mínima actividad enzimática. Por lo tanto, es conveniente una carga final de 4.389 mg/g de la enzima de interés en el glioxil-agarosa (Figura 46).

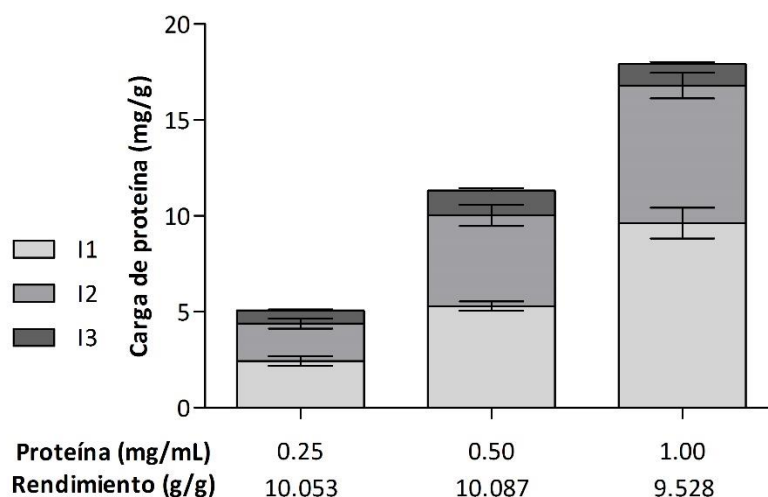


Figura 46. Efecto de las inmovilizaciones sucesivas y la carga de proteína en el biocatalizador de glioxil-agarosa en la reacción enzimática variando la concentración inicial de proteína y el rendimiento obtenido en la reacción enzimática. Cinética de la reacción de hidrólisis empleando enzima libre e inmovilizada (0.25 mg de proteína por mL de mezcla de reacción).

Investigaciones referidas a la inmovilización enzimática en micropartículas porosas, sugieren que el comportamiento catalítico depende de la movilidad de las partículas y que se ajusta a la teoría de las colisiones, en donde la velocidad de reacción es función del tamaño de partícula, la viscosidad del medio y de la frecuencia de las colisiones, las cuales se favorecen por bajas moles del reactivo (Jia *et al.*, 2003). En este proceso de optimización el mínimo valor de carga de proteína aumentó el rendimiento del producto y podría ser favorable para la movilidad de las partículas y el desempeño catalítico de la enzima inmovilizada en glioxil-agarosa. Por esto, el mejor biocatalizador heterogéneo para la degradación de compuestos pépticos fue aquel preparado con 0.05 g/mL de glioxil-agarosa mediante dos procesos de inmovilización independientes y sucesivos, de 90 minutos cada uno y con una concentración inicial de proteína de 0.25 mg/mL para lograr una carga de proteína final de 4.389 mg/g. La reacción enzimática con dicho biocatalizador permitió obtener una concentración de ácido D-galacturónico de 2.847 ± 0.090 mg/mL y un rendimiento en la reacción de 10.087 ± 0.146 g/g pasadas 5 horas de reacción.

Algunos estudios han reportado experiencias con diferentes proteínas inmovilizadas en soportes de agarosa activada (Fernandez-Lorente *et al.*, 2015), pero la diversidad de las moléculas de proteínas y de las micropartículas funcionalizadas hacen difícil explicar o desarrollar un modelo matemático o fundamento teórico universal para que sea aplicado a todos los sistemas proteína-soporte. Por ello, cada estudio describe sistemas específicos de inmovilización, y en el presente trabajo doctoral se reportan resultados positivos de unión covalente de PG en glioxil-agarosa.

Cinética enzimática: biocatalizador glioxil-agarosa con actividad PG

Las cinéticas de formación de producto en las reacciones enzimáticas utilizando el biocatalizador desarrollado en el soporte glioxil-agarosa y la enzima libre, se realizaron para identificar diferencias atribuidas al proceso de inmovilización (Figura 47). En ambas reacciones, se observó que la máxima conversión a producto no difiere significativamente de los 3 mg/mL de ácido D-galacturónico. No obstante, las diferencias se basan en la cinética; mientras que la reacción con la PG libre tardó 30 minutos para alcanzar la máxima formación de producto, la enzima inmovilizada en glioxil-agarosa evidenció menor velocidad de reacción requiriendo de 5 horas. Este comportamiento se debe principalmente a las limitaciones difusionales por la resistencia a la transferencia de masa que se da en un sistema reactivo en el cual se han limitado los grados de libertad del catalizador (Wu *et al.*, 2014). Otros factores determinantes que condicionan el comportamiento cinético son la densidad de carga iónica en el microambiente del soporte y los cambios conformacionales de la enzima por efecto de las uniones covalentes (Datta *et al.*, 2013).

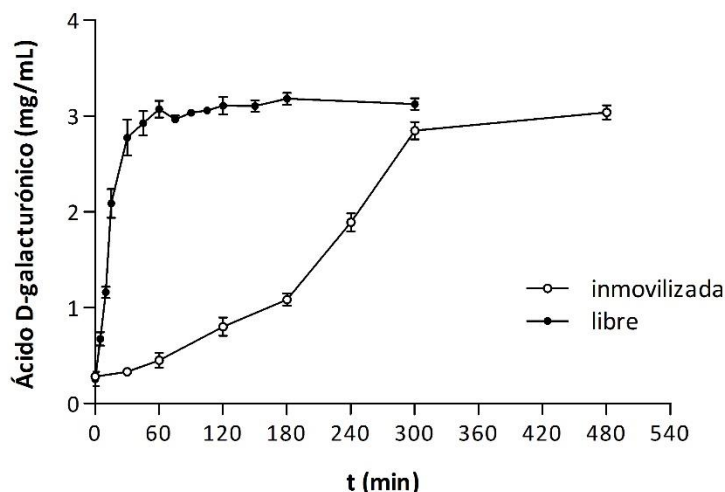


Figura 47. Cinética de la reacción de hidrólisis de ácido poligalacturónico 1% (p/v) empleando la enzima libre y el biocatalizador inmovilizado en glioxil-agarosa bajo las condiciones optimizadas. Las reacciones se realizaron empleando 0.25 mg de proteína por mL de mezcla de reacción.

Los parámetros cinéticos según el modelo de Michaelis-Menten calculados mediante la linealización de Lineweaver–Burk indicaron valores de 0.395 M y 0.242 $\mu\text{mol}/\text{min}$, para K_m y V_{max} , respectivamente (Figura 48). Tomando un intervalo de confianza del 95%, la constante K_m puede tomar valores entre 0.284 y 0.663 M y la velocidad máxima de reacción puede variar entre 0.195 y 0.375 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

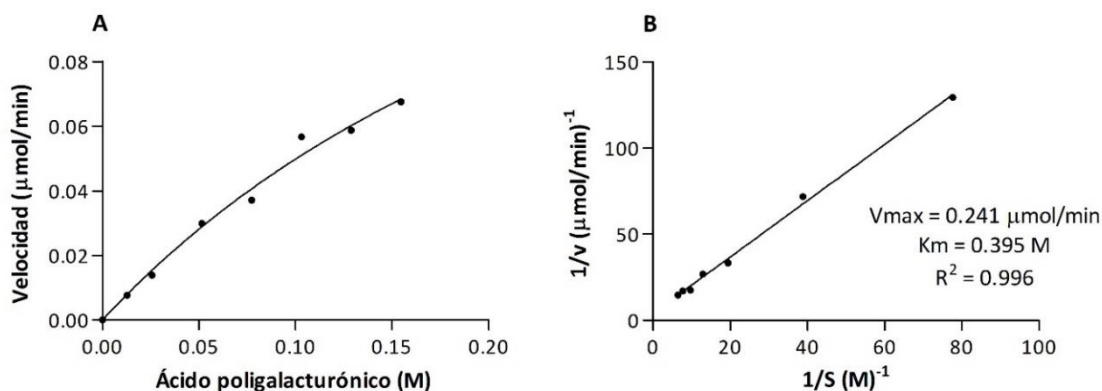


Figura 48. Parámetros cinéticos del biocatalizador inmovilizado en glioxil-agarosa según el modelo de Michaelis-Menten. (A) Velocidad enzimática y (B) Linealización de Lineweaver-Burk.

Estabilidad y reusabilidad del biocatalizador glioxil-agarosa

La estabilidad del biocatalizador heterogéneo es definida como el tiempo durante el cual se retiene su actividad hasta un valor relativo del 50% de la inicial y puede ser afectada por diferentes condiciones ambientales como la temperatura y el pH. Respecto de las condiciones térmicas, se observaron mejoras en la estabilidad con respecto de la enzima libre, la enzima inmovilizada conservó completamente su actividad después de ser expuesta durante 8 horas a 30 °C y 40 °C, a una temperatura de 50 °C el biocatalizador preservó el 60% de su actividad y a 60 °C y 70 °C se desactivó en el tiempo evaluado (Figura 49A). Los efectos del pH en el sistema glioxil-agarosa fue evaluado durante 8 horas a temperatura ambiente y los resultados sugieren que en condiciones ácidas (pH 3 - 6) se reduce levemente su actividad a un rango entre 80% y 90% y condiciones neutrales a alcalinas preservaron completamente la actividad catalítica (Figura 49B).

Al realizar un análisis comparativo de la enzima libre y el sistema inmovilizado, se destaca que con el soporte glioxil-agarosa, la enzima es estable en un mayor rango de pH dado que las condiciones ácidas no afectaron significativamente.

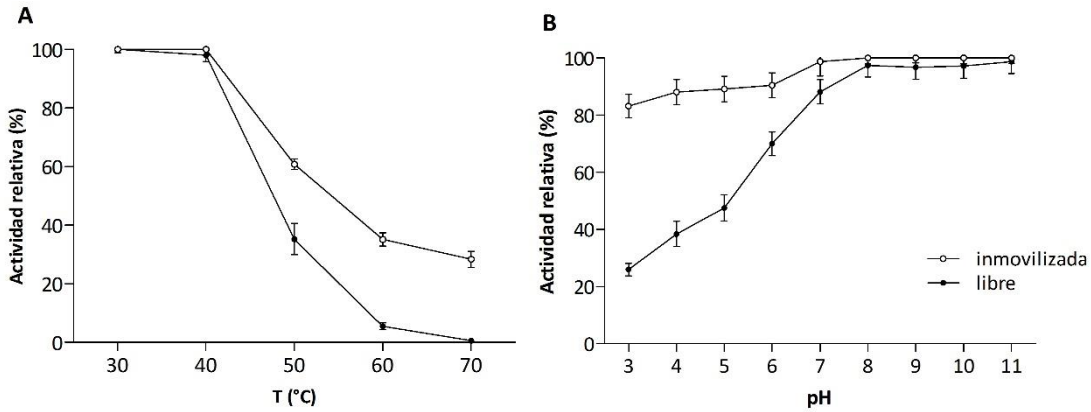


Figura 49. Estabilidad de la enzima libre e inmovilizada en glioxil-agarosa reportada como actividad relativa a las 8 horas. (A) Efecto de la exposición a diferentes temperaturas y (B) Condiciones de pH.

A una temperatura de 4 °C, ambiente térmico sugerido para el almacenamiento del biocatalizador heterogéneo, no se afectó significativamente la actividad enzimática y después de 145 días la actividad relativa se halló en un valor de 85%.

Los ensayos de reusabilidad indicaron que el biocatalizador fue estable durante 90 horas (Figura 50), es decir que la enzima inmovilizada permitió realizar 18 reacciones sucesivas. Se pudieron realizar 9 ciclos de reacción con una actividad relativa superior al 80% y los 9 posteriores con actividad del 50%.

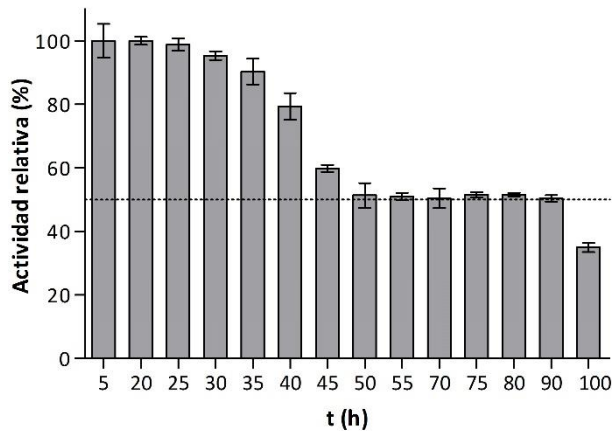


Figura 50. Reusabilidad del biocatalizador inmovilizado en glioxil-agarosa con actividad PG empleando una cantidad de proteína de 0.5 mg/mL en la mezcla de reacción. La línea punteada indica el límite de estabilidad referida al 50% de actividad relativa.

Finalmente, se destaca que el biocatalizador inmovilizado en glioxil-agarosa resultó en la optimización de parámetros como la capacidad de carga de proteína, generación de producto, rendimiento de reacción y estabilidad a condiciones térmicas, de pH y reusabilidad. El proceso de inmovilización optimizado y desarrollado en dos etapas secuenciales permitió minimizar la capacidad de carga de proteína a un valor de 4.389 ± 0.256 mg/g y mejorar el desempeño catalítico, resultando en una conversión de 2.847 ± 0.090 mg/mL de ácido D-galacturónico, un rendimiento de 10.087 ± 0.146 g/g a las 5 horas de reacción y una reusabilidad de 90 horas.

ATRAPAMIENTO

Matrices de alginato

La gelificación del alginato de sodio es regida principalmente por las interacciones entre los grupos carboxilo de los bloques de ácido gulurónico y la presencia de cationes divalentes formando redes mecánicamente estables que constituyen una matriz insoluble, propicia para la inmovilización de células y proteínas (Pawar y Edgar, 2012). Es por ello que el desarrollo de biocatalizadores enzimáticos inmovilizados en estas matrices está dado por la optimización de las condiciones de la polimerización ionotrópica para el atrapamiento de las proteínas y que favorezca el intercambio de materia durante la reacción enzimática. De esta manera, se desarrollaron experimentos secuenciales que permitieron determinar las condiciones de inmovilización para obtener el biocatalizador con máxima actividad PG y alta estabilidad mecánica.

Los principales factores que definen las características del hidrogel formado son la concentración del alginato de sodio, su composición molecular referida a las fracciones de ácido gulurónico y manurónico, el tipo de catión divalente para la gelificación, la concentración del mismo y el tiempo de contacto para la difusión de los cationes. Algunos de estos factores fueron considerados en el desarrollo de un biocatalizador inmovilizado con actividad PG.

a. Selección del biocatalizador: PG de *Streptomyces sp.* en alginato de sodio

Las cepas del género *Streptomyces* previamente identificadas en el *screening* como productoras de PG, fueron consideradas para la inmovilización enzimática en matrices de alginato de sodio para definir la de mejor desempeño catalítico. Se emplearon los extractos enzimáticos de PG parcialmente purificada de las cepas y se utilizó alginato de sodio al 2.5%

(p/v) usando CaCl_2 a una concentración de 0.2 M durante 10 minutos. El diámetro medio de las partículas formadas fue de 2.73 mm, el porcentaje de proteína atrapada fue del 87% y esta variable resultó independiente de la cepa productora (valor-p = 0,281). El biocatalizador obtenido de las diferentes fuentes bacterianas evidenció diferentes niveles de actividad enzimática y la hidrólisis del sustrato varió entre 14.5 y 23.5% (Tabla 18). Estas diferencias se deben probablemente a la variabilidad en la locación de los aminoácidos en la proteína, variaciones en el mecanismo de recepción del sustrato y ataque a los enlaces glicosídicos o la disposición estérica de la proteína dentro de la red del hidrogel afectando la transferencia de masa (Hiteshi *et al.*, 2013). Se prescindió atribuir efectos negativos a la presencia del calcio debido a que este catión no afectó la actividad de las enzimas libres (valor-p = 0.202). Estos resultados indicaron que la enzima proveniente de *S. halstedii* ATCC 10897 sigue siendo la más activa, promoviendo la formación de 1.172 ± 0.018 mg/mL de ácido D-galacturónico.

Tabla 18. Atrapamiento de PG producidas por diferentes cepas del género *Streptomyces* en matrices de alginato de sodio al 2.5% (p/v) usando CaCl_2 0.2 M durante 10 minutos. Se registra la actividad de hidrólisis de ácido poligalacturónico 0.5% (p/v) con la enzima libre e inmovilizada.

Cepa	PG libre ^a	Atrapamiento (%)	PG-inmovilizada ^b	
	Producto (mg/mL)		Producto (mg/mL)	Hidrólisis (%)
ST2	1.122 ± 0.025	87.2 ± 1.3	0.870 ± 0.054	17.4
<i>S. halstedii</i>	1.278 ± 0.011	87.7 ± 1.1	$1.172 \pm 0.018^*$	23.4*
ST3	$1.105 \pm 0,022$	88.1 ± 1.8	0.911 ± 0.035	18.2
ST5	0.977 ± 0.015	86.7 ± 1.3	0.727 ± 0.019	14.5

Diámetro de partícula promedio: 2.65 ± 0.18 mm. Los valores corresponden a 3 réplicas.

El contenido de proteína total por mL de mezcla de reacción fue ^a0.35 mg de enzima libre y ^b0.5 mg de enzima atrapada.

*Los valores de generación de ácido D-galacturónico como producto de reacción difirieron significativamente en la actividad enzimática (prueba LSD p < 0.05).

b. Tiempo de gelificación ionotrópica

El tiempo de gelificación ionotrópica es un factor crítico en el proceso de inmovilización, motivo por el cual se realizaron estudios variando el periodo de exposición del gel a la solución de CaCl_2 , para identificar los efectos en la capacidad de retención de las proteínas y en la actividad catalítica del biocatalizador y, en definitiva, determinar el mejor tiempo de gelificación para los experimentos posteriores (Figura 51).

A mayor tiempo de exposición del gel a la solución con calcio se atrapó una mayor fracción de la proteína total disponible, lográndose un atrapamiento completo después de 1 hora

de proceso. Sin embargo, el efecto en la actividad hidrolítica fue negativa y el biocatalizador obtenido en esta condición mostró una escasa actividad hidrolítica. Los tratamientos realizados durante 10 y 30 minutos no difirieron significativamente entre ellos y permitieron una formación promedio de 1.364 ± 0.021 mg/mL de ácido D-galacturónico. Estos resultados sugieren que un mayor tiempo de contacto permitió la difusión de los cationes dentro de las perlas de alginato y produjeron una red más fina y con menor porosidad, evitando la liberación de las proteínas fuera de la matriz. Sin embargo, esta condición de mínima porosidad después de 1 hora de contacto evitó probablemente que el sustrato pudiera difundir dentro de las partículas y alcanzar el sitio catalítico de las enzimas para completar la hidrólisis, debido al tamaño molecular del ácido poligalacturónico, el cual puede superar los 100 kDa (Yapo, 2011). Un periodo de 30 minutos de contacto del alginato y la solución de calcio resultó en un 90% de atrapamiento de la proteína total, sin embargo, durante la reacción enzimática no hubo diferencias con el tratamiento realizado durante 10 minutos, así que se propuso continuar la experimentación en esta condición.

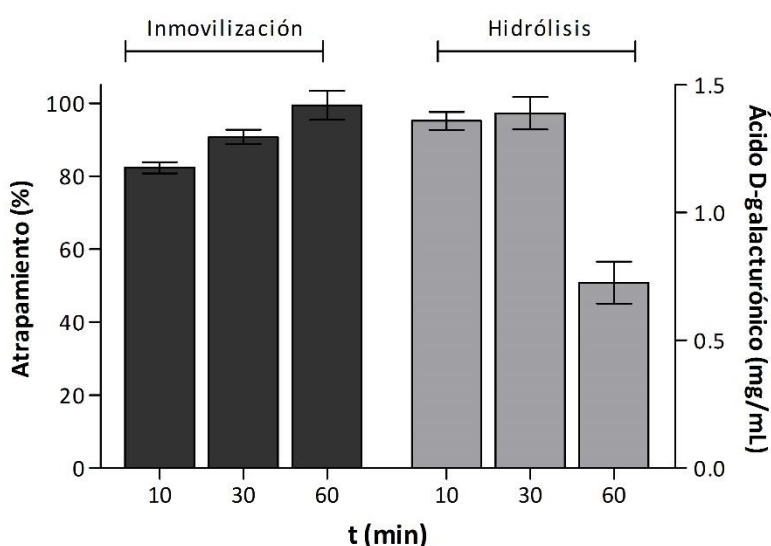


Figura 51. Efecto del tiempo de gelificación ionotrópica en el atrapamiento de la enzima PG en alginato de sodio al 2.5% (p/v) y en la reacción enzimática del biocatalizador resultante. La reacción de hidrólisis fue realizada a 200 rpm, pH 7, 50 °C y 4 horas.

Otras experiencias realizadas en el laboratorio mostraron diferencias contundentes respecto del tiempo de exposición a los cationes, mientras que la inmovilización de células de *Lactobacillus animalis* ATCC 35046 en alginato de sodio requirió de 2 horas para lograr alta resistencia mecánica con máxima eficiencia biocatalítica, otro sistema reforzado con nanoarcillas sólo demandó de 5 minutos (Cappa *et al.*, 2016, 2014). Por ésta razón, fue imprescindible identificar y dejar fija ésta variable, la cual condiciona el tiempo de proceso.

c. Diseño y optimización del biocatalizador en alginato

Utilizando la PG de *S. halstedii* ATCC 10897 y realizando la polimerización ionotrópica durante 10 minutos, se realizó un diseño experimental cuyo objetivo fue determinar las mejores condiciones de concentración de alginato (2% y 3% (p/v)), tipo de catión (Ca^{+2} y Sr^{+2}) y cantidad de proteína (0.25 y 0.50 mg/mL) para maximizar la actividad enzimática y la estabilidad del biocatalizador heterogéneo. La solución de proteína concentrada empleada para el proceso de inmovilización fue obtenida por ultrafiltración y se obtuvo una concentración media de 2.559 mg/mL. Como alternativa al Ca^{+2} , el catión más usado para la gelificación de alginato en aplicaciones biomédicas, se experimentó con Sr^{+2} , ambas sales de cloro se utilizaron a 0.2 M. Los resultados indicaron que las enzimas inmovilizadas usando calcio y estroncio produjeron perlas de hidrogel con un diámetro medio de 2.75 ± 0.21 mm y 2.60 ± 0.22 mm (n=25), respectivamente. Respecto de la concentración de alginato de sodio, ésta variable no afectó el diámetro medio de partícula. La difusión de los cationes a través del polímero favorece la interacción entre los iones y los residuos aniónicos de los ácidos gulurónico y manurónico del alginato, produciendo las conjunciones del tipo *egg-box* de diferentes características; así, una mayor afinidad del hidrogel hacia los cationes genera redes más finas disminuyendo el tamaño final de las partículas (Pawar y Edgar, 2012).

Los resultados de la inmovilización y la reacción enzimática según el diseño experimental planteado (Tabla 19), indicaron que usando 3% (p/v) de alginato de sodio, el porcentaje de proteína atrapada fue significativamente mayor, reteniendo 1.139 ± 0.007 mg de proteína por mL del biocatalizador heterogéneo (valor-p = 0.0051). Además, el porcentaje de atrapamiento no se vio afectado por el tipo de catión empleado (valor-p = 0.1085). La rigidez y porosidad de las matrices de alginato al 3% (p/v) fueron las más adecuadas para atrapar la PG, obteniéndose perlas más estables y homogéneas.

Respecto de las reacciones de hidrólisis, se utilizó ácido poligalacturónico 0.5% (p/v) variando la cantidad de proteína en la mezcla de reacción. La conversión de la reacción fue significativamente mayor con 0.5 mg/mL de proteína (Tabla 19), proporcionando un intercambio de sustratos y productos adecuado a través de la matriz. La máxima conversión (29.6% de hidrólisis) fue obtenida con el biocatalizador preparado con 3% (p/v) de alginato de sodio y Ca^{+2} (Tratamiento 6).

Tabla 19. Matriz experimental del diseño factorial para la inmovilización de la PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 variando la concentración de alginato de sodio y el tipo de catión divalente. Efecto de la carga de proteína en la reacción de hidrólisis de ácido poligalacturónico 0.5% (p/v).

Inmovilización				Reacción enzimática		
Tratamiento	Alginato (% (p/v))	Catión (-)	Atrapamiento (%)	Carga de proteína (mg/mL)	Producto (mg/mL)	Hidrólisis (%)
1	2	Ca ⁺²	81.5 ± 1.1	0.25	1.229 ± 0.075	24.6 ± 2.1
2	2	Ca ⁺²		0.50	1.305 ± 0.034	26.1 ± 1.6
3	2	Sr ⁺²	78.5 ± 0.9	0.25	0.886 ± 0.041	17.7 ± 1.1
4	2	Sr ⁺²		0.50	1.074 ± 0.018	21.5 ± 1.2
5	3	Ca ⁺²	89.5 ± 1.3	0.25	1.274 ± 0.062	25.5 ± 1.8
6	3	Ca ⁺²		0.50	1.478 ± 0.011	29.6 ± 0.6
7	3	Sr ⁺²	88.6 ± 1.4	0.25	1.173 ± 0.019	23.5 ± 0.8
8	3	Sr ⁺²		0.50	1.205 ± 0.028	24.1 ± 0.9
Valor-p	0.0051	0.1085	R ² = 95.96 %	0.0020		R ² = 90.23 %

Adicionalmente, se realizaron pruebas de reusabilidad y medición del hinchamiento osmótico y se observó que el calcio presentó la desventaja de mayor inestabilidad mecánica del hidrogel comparado con el estroncio, aunque fue el calcio el catión que resultó en una mejor eficiencia en la biotransformación. En la tabla 20 se muestra que las perlas de alginato gelificadas con Ca⁺² tuvieron el mayor hinchamiento osmótico de 63.5%, conduciendo a un incremento en la porosidad, retención de agua y ruptura de la matriz debido al estrés mecánico durante la reusabilidad de los biocatalizadores, conduciendo a una reducción significativa del tiempo durante el cual permaneció activo el biocatalizador (44 horas)

Tabla 20. Efecto de la concentración de alginato y el tipo de catión divalente en las propiedades de estabilidad catalítica y mecánica de los biocatalizadores inmovilizados en matrices de alginato empleando una carga fija de proteína de 0.5 mg/mL.

Estabilidad			
Alginato (% (p/v))	Catión (-)	Reusabilidad (h)	Hinchamiento (%)
2	Ca ⁺²	36	59.5 ± 2.8
	Sr ⁺²	40	43.4 ± 1.2
3	Ca ⁺²	44	63.5 ± 2.5
	Sr ⁺²	60	37.3 ± 0.9

Estos efectos de cationes divalentes en geles de alginato han sido reportados (Davidovich-Pinhas y Bianco-Peled, 2010; Mørch *et al.*, 2006) y sugieren que las características de hinchamiento y la afinidad del alginato hacia los cationes depende de la estructura y composición del copolímero (ácido manurónico y gulurónico). También, se ha sugerido el siguiente orden en la afinidad del polímero hacia los cationes: $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$ (Pawar y Edgar, 2012). Sin embargo, pruebas preliminares mostraron que algunos cationes como el plomo, cobre y cadmio promueven la desnaturalización de la proteína, y otros cationes (manganeso, níquel y cobalto) inactivaron parcialmente la proteína. De otro lado, el estroncio probablemente contribuyó a uniones más estrechas en la configuración del tipo *egg-box* resultando en un biocatalizador más estable y de menor diámetro, pero con una acción hidrolítica menos eficiente. Adicionalmente, se observó en términos cualitativos, abrasión en la superficie de las partículas obtenidas al 2% (p/v) de alginato, lo cual repercutió en la estabilidad, obteniendo la menor reusabilidad (36 horas). En suma, la mejor concentración de alginato es 3% (p/v), los mejores resultados de actividad enzimática se lograron empleando calcio y las mejores características de estabilidad mecánica se obtuvieron con estroncio, pero la hidrólisis máxima con Sr^{+2} fue 23.91%. En este sentido, se propuso una nueva estrategia metodológica empleando una mezcla de ambas sales con el propósito de optimizar las propiedades mecánicas y catalíticas del sistema.

El alginato de sodio al 3% (p/v) fue polimerizado empleando mezclas de las soluciones de $CaCl_2$ y $SrCl_2$ 0.2 M en relación volumétrica $Ca^{+2}:Sr^{+2}$ de 4:1, 1:1 y 1:4 para evaluar el efecto en la actividad catalítica y la estabilidad del biocatalizador obtenido (Tabla 21). Se observa que, usando una solución con calcio y estroncio en las tres proporciones evaluadas, se mejoró la estabilidad del biocatalizador aumentando el tiempo de reusabilidad y reduciendo el hinchamiento en comparación con las perlas obtenidas a partir de $CaCl_2$. Los resultados de la actividad enzimática de los tratamientos con una mezcla de los cationes en relación volumétrica de 4:1 y 1:1 revelaron que no difieren significativamente entre ellos, obteniéndose una media de 1.515 mg/mL de ácido D-galacturónico, 30.3% de hidrólisis y 98.34% de reducción de la viscosidad. Por el contrario, el tratamiento en relación 1:4 ($Ca^{+2}:Sr^{+2}$) resultó en el menor desempeño catalítico, con resultados similares al biocatalizador obtenido a partir de $SrCl_2$. Entonces, mediante el uso de una solución con mezcla 4:1 (v/v) de las sales de cloruro de calcio y estroncio, la conversión en la reacción alcanzó el mismo nivel que usando sólo calcio y la estabilidad mecánica del biocatalizador se aumentó significativamente llegando a valores de 58 horas de reusabilidad y 42.6% de hinchamiento osmótico. Se comprobó que la mezcla de los cationes permite obtener un material para biocatálisis que provee un equilibrio entre el desempeño de la biotransformación y las características de estabilidad del biocatalizador heterogéneo.

Tabla 21. Efecto de la mezcla de cationes de calcio y estroncio en el atrapamiento de PG en matrices de alginato al 3% (p/v), en la estabilidad mecánica y en la hidrólisis de ácido poligalacturónico. La carga de proteína para la reacción fue fijada a 0.5 mg/mL.

Mezcla de cationes					
Relación Ca ²⁺ :Sr ²⁺ (v/v)	Producto (mg/mL)	Hidrólisis (%)	Reducción de viscosidad (%)	Reusabilidad (h)	Hinchamiento (%)
4:1	1.534 ± 0.041	30.7 ± 1.2	98.9 ± 0.8	58	42.6 ± 1.3
1:1	1.497 ± 0.033	29.9 ± 0.9	97.8 ± 0.7	50	47.1 ± 1.2
1:4	1.285 ± 0.022	25.7 ± 0.8	96.5 ± 0.5	54	41.5 ± 1.2

Como indicador de las características de rigidez y estabilidad mecánica de las perlas de alginato se determinó el módulo de almacenamiento (G') en función de presiones aplicadas en forma de estrés oscilatorio (1 Hz de frecuencia). En la figura 52 se indica la respuesta reológica de los geles de alginato al 3% (p/v) y se identificó una zona de *plateau* entre 0.01 y 0.2 Pa, en esta región del estrés oscilatorio el módulo G' fue constante y se obtuvieron valores de 5.37 Pa para el biocatalizador preparado con CaCl_2 , 5.68 Pa con SrCl_2 y CaCl_2 en una mezcla 4:1 (v/v) y 6.19 Pa con SrCl_2 . Estos resultados indican que la polimerización del alginato utilizando estroncio provee mayor rigidez que el calcio y que la mezcla de cationes (4:1) permitió obtener un valor G' intermedio a ambos cationes.

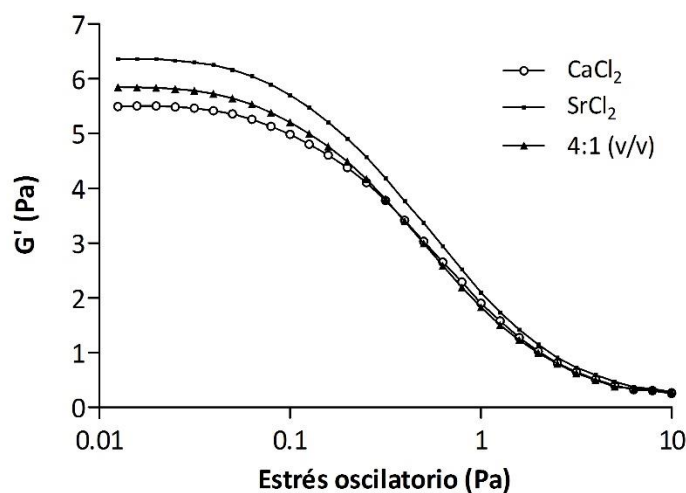


Figura 52. Comparación del módulo de almacenamiento (G') bajo diferentes condiciones de estrés oscilatorio de las matrices formadas por gelificación del alginato de sodio 3% (p/v) con diferentes condiciones catiónicas. La mezcla evaluada fue en una relación 4:1 (v/v) de CaCl_2 y SrCl_2 a concentraciones 0.2 M.

d. Cinética enzimática: biocatalizador en alginato con actividad PG

La cinética de la reacción de hidrólisis del ácido poligalacturónico con el mejor biocatalizador obtenido mediante atrapamiento en alginato de sodio, obtenido por gelificación del alginato al 3% (p/v) con una mezcla 4:1 (v/v) de CaCl_2 y SrCl_2 0.2 M y una carga de proteína de 0.5 mg/mL, resultó en una generación de 1.542 mg/mL de ácido D-galacturónico (30.8% de hidrólisis) y una reducción de viscosidad del sustrato de 98.9% a un tiempo de 2 horas (Figura 53). Con la enzima libre y empleando como sustrato una solución de ácido poligalactúronico al 0.5% (p/v), se alcanzó el mismo valor máximo de hidrólisis después de 30 minutos de reacción, éstas diferencias cinéticas entre el biocatalizador libre y el heterogéneo son debido a la barrera difusional que el sustrato tiene que ir superando a través de la matriz, lo cual requiere mayor tiempo para alcanzar el sitio de unión al sustrato de la enzima atrapada (Andriani *et al.*, 2012). Adicionalmente, este resultado mostró un mejor comportamiento cinético que el biocatalizador obtenido por unión covalente al soporte glioxil-agarosa (5 horas), reduciéndose 3 horas el tiempo de reacción (Ramírez-Tapias *et al.*, 2016). Sin embargo, el rendimiento de la conversión con el biocatalizador desarrollado en glioxil-agarosa fue 3.25 veces mayor al obtenido en la matriz de alginato.

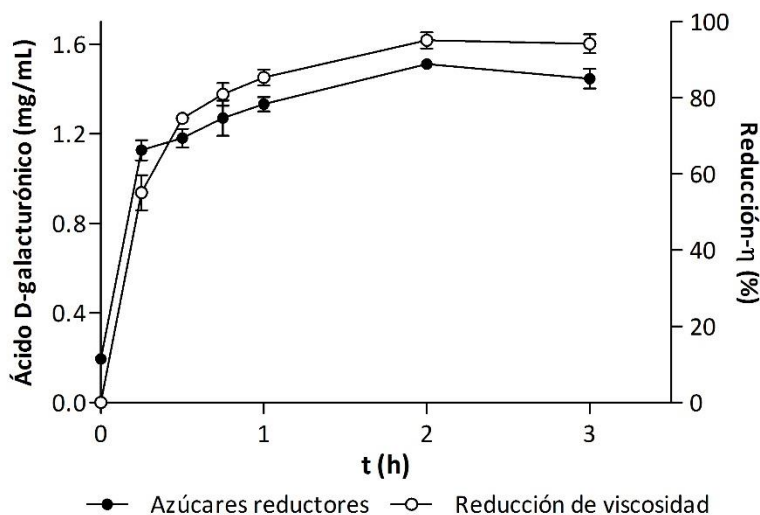


Figura 53. Cinética de hidrólisis del ácido poligalacturónico con el biocatalizador inmovilizado con actividad PG en alginato de sodio 3% (p/v) gelificado con una mezcla 4:1 (v/v) de CaCl_2 y SrCl_2 0.2 M y una carga de proteína de 0.5 mg/mL.

Finalmente, se determinaron los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) específicos para el biocatalizador inmovilizado en hidrogel de alginato, los cuales fueron calculados según la linealización de Lineaweaver-Burk, los valores obtenidos fueron $0.539 \mu\text{mol}/\text{min}$ y 0.062 M , para la velocidad máxima y la constante de afinidad, respectivamente. Al definir un intervalo de confianza del 95%, K_m puede tomar valores entre 0.027 y 0.076 M V_{max} puede variar entre 0.335 y $0.562 \mu\text{mol}/\text{min}$.

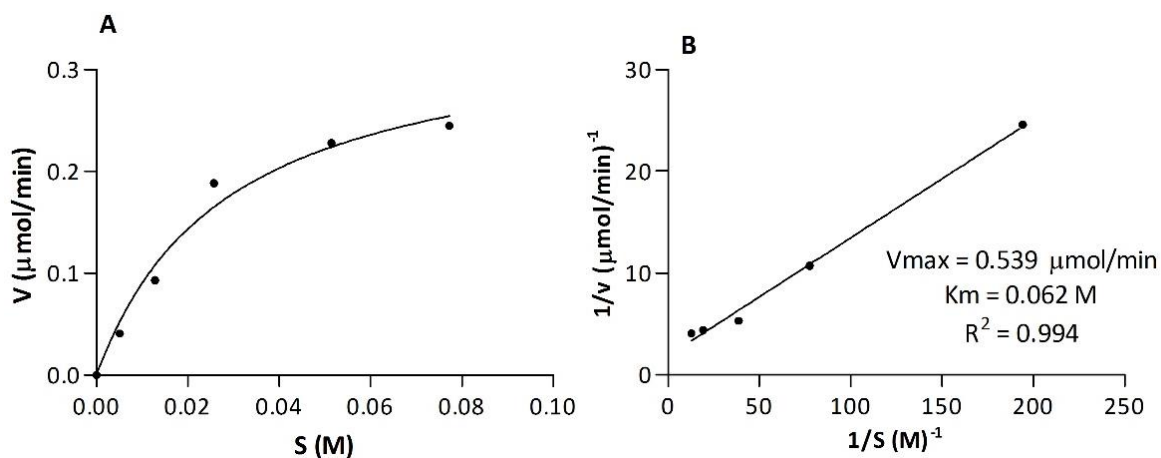


Figura 54. Parámetros cinéticos del biocatalizador inmovilizado por atrapamiento en matriz de alginato. (A) Velocidad de reacción enzimática y (B) Linealización del modelo de Michaelis-Menten según Lineaweaver-Burk.

e. Estabilidad y reusabilidad del biocatalizador en alginato

A pesar de que el alginato de sodio ha sido utilizado ampliamente como vehículo para la liberación de drogas farmacéuticas y para atrapar células enteras, su uso para la inmovilización de proteínas sigue siendo objeto de estudio porque cada sistema de biocatálisis con enzimas ha mostrado comportamientos específicos que dependen de múltiples factores, especialmente de las estructuras moleculares tanto de la enzima como de su sustrato. Sin embargo, un parámetro importante para indicar que un biocatalizador es económicamente apto para ser aplicado en procesos de biotransformación a mayores escalas, es el tiempo de reusabilidad y número de ciclos de reacción, los cuales son factores claves porque indican la frecuencia de recambio de los biocatalizadores heterogéneos (Bolívar *et al.*, 2015).

Las pruebas de reusabilidad con el biocatalizador inmovilizado en alginato de sodio, mostraron que no hubo una pérdida significativa de la actividad enzimática durante 28

horas y el biocatalizador se mantuvo estable hasta 58 horas de operación, lo cual permitió realizar 29 ciclos de reacción (Figura 55A).

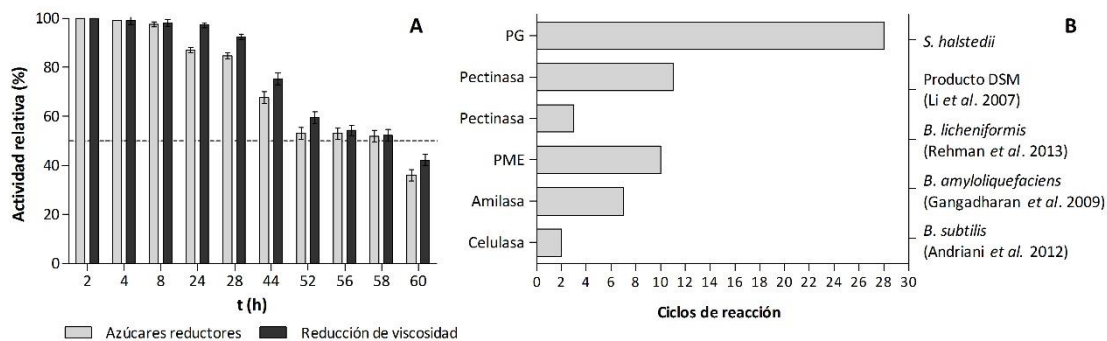


Figura 55. Reusabilidad de la PG inmovilizada. (A) Tiempo de reusos del biocatalizador estabilizado obtenido por atrapamiento en alginato de sodio 3% (p/v) gelificado con una mezcla 4:1 (v/v) de CaCl_2 y SrCl_2 0.2 M y una carga de proteína de 0.5 mg/mL. La línea punteada indica el límite de estabilidad referida al 50% de actividad relativa. (B) Número de ciclos de reusabilidad de diferentes enzimas hidrolíticas inmovilizadas por atrapamiento en matrices de alginato de sodio.

En este sentido, los resultados hallados son relevantes dado que son destacadamente superiores a otros referidos a enzimas glicolíticas inmovilizadas en matrices de alginato (Figura 55B), en los que el máximo número de ciclos de reusos posible son 11 (Li et al., 2007). Finalmente, la actividad relativa en condiciones de almacenamiento a 4°C resultó en un 65% después de 21 días.

Para concluir, la inmovilización de la PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 en alginato de sodio con calcio y estroncio en relación 4:1 (v/v) resultó ser una alternativa viable y eco-compatible. Se considera que éste es el primer reporte científico que usa la combinación de los cationes para la gelificación ionotrópica y atrapamiento enzimático, resultando en un biocatalizador que a las 2 horas de reacción produjo 1.542 ± 0.016 mg/mL de ácido D-galacturónico, un rendimiento de 3.084 ± 0.042 g/g y una reducción de viscosidad del sustrato de $98.9 \pm 1.2\%$, con destacada estabilidad mecánica y catalítica, manteniendo actividad durante 58 horas de uso continuo.

Matrices de agar

a. Selección del termogel

El proceso de inmovilización por atrapamiento en termogeles se realizó usando cuatro tipos de agar denominados: *Gracilaria*, *Pterocladia*, *Gelidium* y bacteriológico, los cuales fueron

evaluados en cuanto al desempeño en la reacción enzimática y la estabilidad mecánica de cada matriz (Tabla 22). Los biocatalizadores heterogéneos se obtuvieron empleando una solución de cada agar a una concentración de 4% (p/v), se mezcló en relación 1:1 (v/v) con la solución de proteína y se realizó la gelificación por descenso de la temperatura. Los ensayos de estabilidad mecánica fueron realizados evaluando la reusabilidad de cada biocatalizador hasta su desactivación y en la tabla 22 se reporta la actividad relativa después de 42 horas de reusos sucesivos. Adicionalmente, se midió el hinchamiento osmótico y, mediante barridos de estrés oscilatorio, se calculó el ángulo de fase ($\tan \delta = G''/G'$) como indicador de la microestructura y rigidez de las partículas obtenidas.

Tabla 22. Propiedades catalíticas y de estabilidad mecánica de la PG inmovilizada por atrapamiento en diferentes tipos de agar al 2% (p/v).

Tipo de agar	Reacción enzimática		Estabilidad		
	Producto ^a (mg/mL)	Rendimiento ^a (g/g)	Reusos (42 h) ^b Actividad relativa (%)	Hinchamiento (%)	δ^c (°)
<i>Gracilaria</i>	1.657 ± 0.042	1.071 ± 0.018	29.5 ^{NA}	3.12 ± 0.8	13.39
<i>Pterocladia</i>	1.724 ± 0.035	1.034 ± 0.021	36.11 ^{NA}	2.95 ± 1.1	14.06
<i>Gelidium</i>	1.674 ± 0.053	1.046 ± 0.009	28.4 ^{NA}	3.15 ± 1.2	14.42
Bacteriológica	1.749 ± 0.022	1.265 ± 0.008	51.13	2.35 ± 0.7	11.63

^aReacción de hidrólisis de ácido poligalacturónico 0.5% (p/v). El rendimiento de reacción refiere a la formación de ácido D-galacturónico (g) relativo a la carga de proteína en la matriz (g).

^bSe consideró el biocatalizador no activo (NA) cuando la actividad relativa fue inferior al 50%

^cÁngulo de fase (δ) calculado mediante pruebas de viscoelasticidad.

El atrapamiento de la proteína varió entre 67% y 80% usando cada termogel a una concentración final de 2.0% (p/v), la formación de producto se dio en un rango de 1.657 mg/mL y 1.749 mg/mL, respecto del rendimiento en la reacción, el agar bacteriológico resultó en un valor de 1.265 g/g a diferencia de los agares *Gracilaria*, *Pterocladia* y *Gelidium*, los cuales fueron similares con un rendimiento medio de 1.050 g/g. El biocatalizador con actividad PG inmovilizado en agar bacteriológico superó el tiempo de reusabilidad con respecto de los otros tipos de agar, resultando activo durante 42 horas. A partir de los valores calculados de ángulo de fase, se infiere que en los agares evaluados prevalecen las propiedades elásticas sobre las viscosas, permitiendo una retención adecuada de las proteínas al interior de la matriz.

En la figura 56 se ilustra el módulo de almacenamiento (G') en función de la presión oscilatoria aplicada y se estimó que el agar bacteriológico posee características elásticas con mayor resistencia y le siguen en orden descendente el agar *Pterocladia*, *Gracilaria* y *Gelidium*. En general, se observó que los cuatro tipos de agar tuvieron un comportamiento del tipo sólido elástico destacándose el agar bacteriológico ($\delta = 11.63^\circ$) y aunque el ángulo

de fase de un sólido ideal es 0° , siempre se disipa una fracción de la energía mecánica suministrada al material (Mohammed *et al.*, 1998; Osswald y Rudolph, 2014). El agar bacteriológico resultó en un mayor módulo G' y menor ángulo de fase debido, probablemente, a un mayor contenido de agarobiosa (fracción neutral y estable) que de agarpectina (fracción con aniones sulfato) en su composición comparado con los demás agares evaluados. Adicionalmente, el porcentaje de hinchamiento se midió mediante la relación de los cambios en diámetro de partícula durante las reacciones sucesivas con todos los biocatalizadores y se encontró que fue menor a 3.15%, sugiriendo una mínima desestabilización de las matrices por presión e hinchamiento osmótico, lo cual significó que se preservó el diámetro de poro de las partículas y la retención de las proteínas dentro de las mismas. Con base en las propiedades descritas, el agar bacteriológico evidenció el mejor desempeño para desarrollar el biocatalizador inmovilizado en agar con elevada actividad PG.

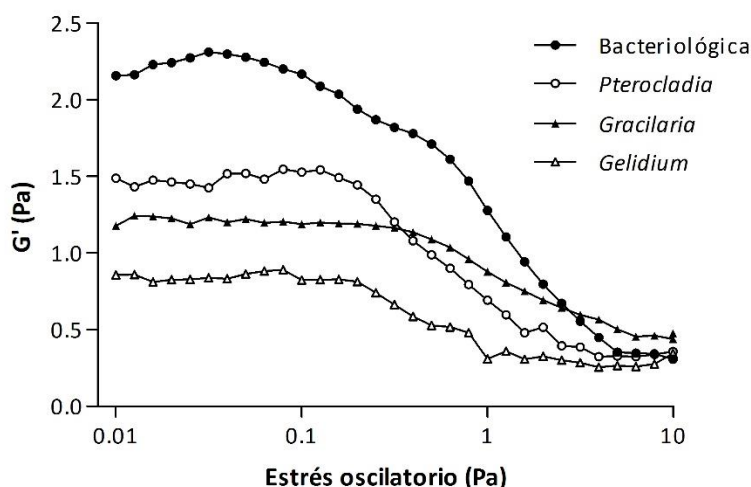


Figura 56. Comparación del módulo de almacenamiento (G') bajo diferentes condiciones de estrés oscilatorio de las matrices formadas por los diferentes tipos de agar a concentración final de 2% (p/v).

b. Estabilización de la matriz por adición de cationes

El polímero de agar está compuesto por agarosa y agarpectina, la agarosa es la fracción del polisacárido que tiene el mayor potencial de gelificación. En el proceso de inmovilización enzimática, los aniones sulfato de la agarpectina podrían promover la interacción con las proteínas, además, una adición de cationes con diferentes características de tamaño atómico y densidad de carga, podría estabilizar la matriz (Gulrez *et al.*, 2003). Por ello, se evaluaron diversas sales de cloro durante la inmovilización para identificar los efectos en la actividad enzimática y firmeza del gel. Con este propósito, se seleccionaron cationes

metálicos con diferencias en su energía de ionización, evaluándose el sodio y el potasio del grupo alcalino, el calcio y el magnesio de los alcalinotérreos, el manganeso como metal de transición y el aluminio de otros metales.

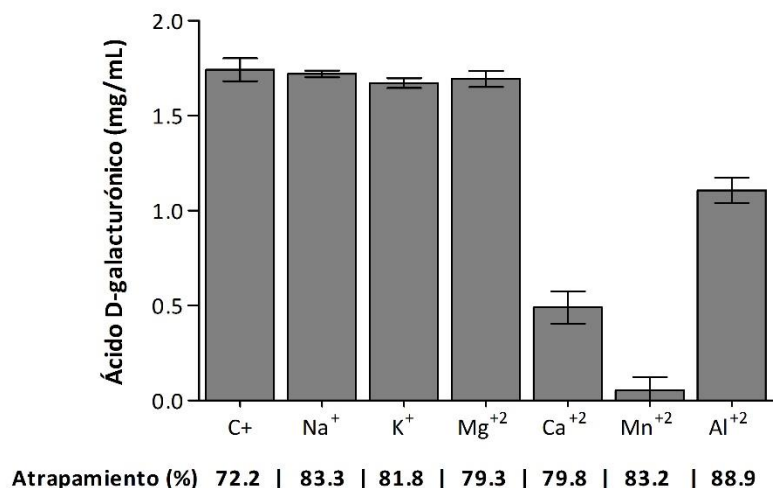


Figura 57. Efecto de diferentes sales de cloro 200 mM en el atrapamiento de PG en agar bacteriológico 2% (p/v) y la reacción de hidrólisis de ácido poligalacturónico 0.5% (p/v). El tratamiento denominado C+ se refiere al control en agua desionizada.

Los resultados mostraron que el atrapamiento de la proteína fue promovido entre un 6 y 16% por la adición de los cationes (Figura 57); el cloruro de aluminio permitió el atrapamiento de una mayor fracción de proteína disponible (89.9%) pero su actividad enzimática fue afectada desfavorablemente por una desnaturalización parcial observada por formación de agregados a causa de la precipitación de la enzima soluble. Los iones de Ca⁺² y Mn⁺² produjeron una disminución en la actividad enzimática, probablemente por interacciones desfavorables entre el agar y el sustrato, evidenciadas por el debilitamiento de las perlas en la mezcla de reacción. Sin embargo, Na⁺, K⁺ y Mg⁺² evidenciaron el mismo desempeño catalítico en comparación con el biocatalizador de control sin presencia de cationes (C+). Entonces, estos tres diferentes biocatalizadores fueron sometidos al procedimiento oscilatorio de viscoelasticidad y pruebas de reusabilidad para medir la influencia de los iones en la resistencia mecánica de los termogeles (Tabla 23).

Los resultados de la prueba dinámica de viscoelasticidad mostraron cambios en la temperatura de solidificación atribuidos a la presencia de los cationes y se incrementó en 3 °C con Mg⁺² comparado con el tratamiento de control. La desestabilización de las matrices por aumento de la temperatura inició a 65 °C y a 83 °C ocurrió la fusión del polímero volviendo al estado sol, de esta manera, se observó la histéresis característica de los agaros

solidificándose a valores entre 32 y 35 °C y fundiendo a una temperatura superior a 80 °C (Mohammed *et al.*, 1998).

Dado que el ángulo de fase es más alto a la temperatura de reacción (40 °C), éste fue disminuido notablemente por adición de los cationes, tanto a 30 °C como a 40 °C. El biocatalizador con Mg^{+2} fue más resistente debido a un valor mayor del módulo de almacenamiento (G') respecto del módulo de pérdida (G''), predominando sus características elásticas sobre las viscosas. La naturaleza del $MgCl_2$ permite mayor densidad de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua por efectos cosmotrópicos (Illanes *et al.*, 2012)

Las pruebas de reusabilidad también indicaron resultados relevantes, la actividad relativa después de 48 horas de reacciones continuas fue del 63% usando $MgCl_2$, siendo 1.4 veces más activa que el tratamiento de control debido a la estabilidad molecular de las interacciones entre el agar, los cationes adicionados y la proteína.

Tabla 23. Efecto de la adición de cationes al agar bacteriológico (2% (p/v)) en la estabilidad mecánica de las matrices. La respuesta viscoelástica de los geles se determinó por un procedimiento dinámico oscilatorio (1Hz) y una rampa de temperatura (5 °C/min).

Cationes (200 mM)	Temperatura de solidificación (°C)	δ (°)		Reusos (48 h) ^a
		30 °C	40 °C	Actividad relativa (%)
C +	32.0	10.41	36.99	44.1 ^{NA}
NaCl	33.0	2.22	22.83	47.2 ^{NA}
KCl	34.0	2.26	20.56	60.5
$MgCl_2$	35.0	2.49	18.85	63.0

^aLos biocatalizadores fueron reusados sucesivamente durante 48 horas. Se consideró el biocatalizador no activo (NA) cuando la actividad relativa fue inferior al 50%

Finalmente, aunque Mg^{+2} a 200 mM mostró resultados superadores, se observó que menores concentraciones del catión mantuvieron la actividad catalítica y preservaron las propiedades mecánicas. De esta manera se minimizó la concentración de $MgCl_2$ a 20 mM que maximizó la resistencia mecánica del termogel (valor-p = 0.102).

c. Diseño y optimización del biocatalizador en agar bacteriológico

El agar bacteriológico al 4% (p/v) con $MgCl_2$ 20 mM y la solución enzimática con un contenido de proteína de 2.062 mg/mL fue mezclado a diferentes fracciones volumétricas de acuerdo con un diseño experimental de mezcla binaria *simplex-lattice* y modelo cuadrático (Tabla 24 y figura 58). Con base en el factor de correlación (R^2), los modelos

cuadráticos de ajuste explican más del 93% de las variaciones observadas en las variables de respuesta. Ambos componentes de la mezcla son fundamentales para la preparación del biocatalizador y, dado que la porosidad del gel está gobernada por la concentración del polímero, se obtuvieron efectos significativos en la retención de la proteína (valor-p = 0.0045), la formación de producto (valor-p = 0.0011) y el rendimiento de reacción (valor-p = 0.0003).

El porcentaje de atrapamiento varió en un rango de 75.6% (tratamiento 3) y 91.1% (valor promedio entre los tratamientos 1 y 7). Además, la generación de ácido D-galacturónico fue promovida empleando una fracción de proteína entre 35% y 60% (v/v), lográndose una formación de producto en promedio de 2.311 ± 0.084 mg/mL (tratamiento 2, 3, 4 y 6). El rendimiento de la reacción se aumentó minimizando la fracción de proteína en la mezcla, siendo 3.48 veces mayor en los tratamientos 1 y 7 respecto del tratamiento 3.

Tabla 24. Matriz del diseño experimental de mezcla binaria para la optimización del biocatalizador con actividad PG variando la fracción volumétrica de la solución enzimática y el agar bacteriológico 4% (p/v) en MgCl₂ 20 Mm (Agar-Mg⁺²) como componentes de estudio.

Tratamiento	Componentes		Inmovilización		Hidrólisis		Estabilidad
	Proteína (% (v/v))	Agar-Mg ⁺²	Atrapamiento (%)	Carga de proteína (mg/g)	Producto (mg/mL)	Rendimiento (g/g)	Reusos (48 h) Actividad relativa (%)
1	10.0	90.0	92.1 ± 2.6	0.198 ± 0.017	1.837 ± 0.054	9.796 ± 0.288	57.5 ± 2.1
2	35.0	65.0	77.2 ± 2.4	0.582 ± 0.011	2.288 ± 0.015	4.348 ± 0.028	64.2 ± 3.2
3	60.0	40.0	75.6 ± 2.1	0.976 ± 0.025	2.343 ± 0.066	2.664 ± 0.074	65.5 ± 2.8
4	35.0	65.0	79.8 ± 1.9	0.602 ± 0.018	2.311 ± 0.121	4.862 ± 0.238	66.6 ± 3.5
5	22.5	77.5	81.6 ± 2.5	0.395 ± 0.012	2.153 ± 0.127	6.357 ± 0.225	61.9 ± 3.6
6	47.5	52.5	77.6 ± 1.2	0.794 ± 0.022	2.303 ± 0.136	3.686 ± 0.191	68.6 ± 3.1
7	10.0	90.0	90.1 ± 1.3	0.194 ± 0.011	1.926 ± 0.093	8.761 ± 0.355	59.6 ± 2.2
	Valor-p		0.0045		0.0011	0.0003	
	R ²		93.46%		96.71%	98.36%	

Un análisis más integrador de las variables de respuesta muestra que incrementar en 5 veces la cantidad de proteína, la generación de producto aumenta sólo en 1.25 veces. De esta manera, los tratamientos 1 y 7 fueron los biocatalizadores más eficientes dado que usando una mínima carga de proteína fue posible hidrolizar el ácido poligalacturónico hasta generar 1.881 ± 0.015 mg/mL del monómero, lo cual representó un porcentaje de hidrólisis del 37.6% (la producción de 5 mg/mL de ácido D-galacturónico corresponde al 100% de hidrólisis).

Finalmente, la concentración óptima de agar bacteriológico fue 3.6% (p/v) y una carga de proteína de 0.196 ± 0.014 mg/g (tratamientos 1 y 7), lo cual sugirió que a mayor concentración de agar es menor la porosidad de las partículas situación que favorece la retención de la enzima dentro de la red (Bibi *et al.*, 2015).

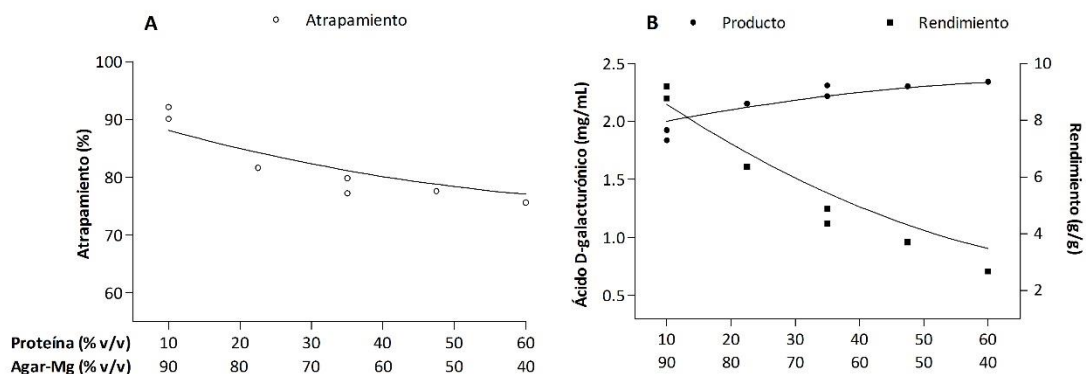


Figura 58. Modelos cuadráticos de las respuestas del porcentaje de atrapamiento de proteína (A) y reacción enzimática de los biocatalizadores (B) preparados en Agar-Mg²⁺ según el diseño de mezclas. Los puntos corresponden al resultado experimental y las líneas al modelo cuadrático del diseño*.

*Modelos cuadráticos del diseño de mezclas:

$$I(\%) = 91.61 \cdot A + 76.41 \cdot E - 22.57 \cdot A \cdot E$$

$$P(\text{mg/mL}) = 1.89 \cdot A + 2.32 \cdot E + 0.79 \cdot A \cdot E$$

$$R(\text{g/g}) = 10.15 \cdot A + 2.78 \cdot E - 9.40 \cdot A \cdot E$$

Donde **A** = fracción volumétrica de agar – Mg (4%v/v) $90\% \leq A \leq 60\%$

E = fracción volumétrica de proteína (2.062 mg/mL) $10\% \leq E \leq 40\%$

I = porcentaje de atrapamiento

P = concentración de producto

R = rendimiento de reacción

d. Cinética enzimática: biocatalizador en agar bacteriológico con actividad PG

Las técnicas de inmovilización enzimática mejoran la estabilidad de las proteínas bajo las condiciones de operación, pero afectan su comportamiento cinético y pueden disminuir el rendimiento de reacción. Este biocatalizador con actividad PG inmovilizado en agar bacteriológico permitió obtener 1.881 mg/mL de producto; usando la enzima libre a una concentración de 0.2 mg/mL, se alcanzó un valor de 2.238 mg/mL (Figura 59), siendo un hallazgo importante porque el rendimiento final de la reacción sólo varió de 9.279 g/g a 11.190 g/g, entre la PG estabilizada y libre, respectivamente. También hubo pequeñas diferencias en el curso de la reacción, ya que empleando el biocatalizador inmovilizado se

obtuvo la máxima concentración de producto a los 30 minutos de reacción, difiriendo en 10 minutos con respecto de la enzima libre.

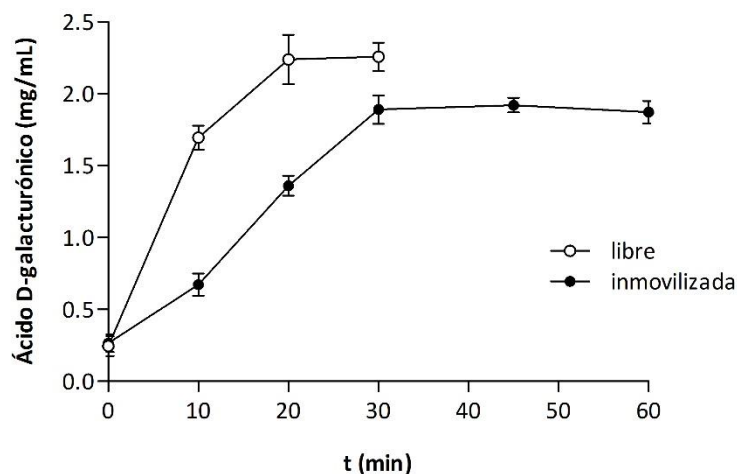


Figura 59. Cinética de hidrólisis de ácido poligalacturónico 0.5% (p/v) con enzima libre y el biocatalizador inmovilizado con actividad PG en agar bacteriológico 3.6% (p/v) preparado en solución con $MgCl_2$ 20 mM y una carga de proteína de 0.196 mg/mg.

Las características de la velocidad enzimática del biocatalizador inmovilizado con respecto de la concentración del sustrato se muestran en la figura 60A. Los parámetros cinéticos según el modelo propuesto por Michaelis-Menten resultaron en valores de 0.421 $\mu\text{mol}/\text{min}$ y 0.031 M, para la velocidad máxima y la constante de afinidad, respectivamente (Figura 60B). Si se toma un intervalo de confianza del 95%, la constante K_m se halla en un rango de 0.023 a 0.038 M y la velocidad máxima de reacción puede tomar valores entre 0.398 y 0.565 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

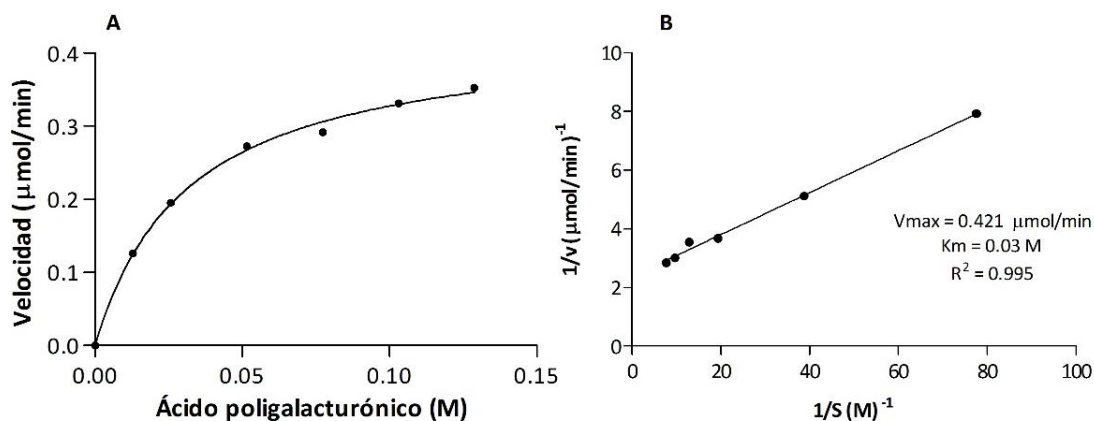


Figura 60. Parámetros cinéticos según el modelo de Michaelis-Menten del biocatalizador inmovilizado por atrapamiento en matriz de agar bacteriológico. (A) Velocidad de reacción enzimática y (B) linealización de Lineweaver-Burk (B).

e. Estabilidad y reusabilidad del biocatalizador en matrices de agar bacteriológico

La optimización de las condiciones de inmovilización en agar bacteriológico a través de los experimentos secuenciales, permitió el desarrollo de un biocatalizador que aumentó el rendimiento desde un valor de 1.265 g/g (Tabla 22) hasta 9.279 g/g (Tabla 24), implicando un incremento de 7.33 veces, minimizando la carga de proteína en la matriz de agar y mejorando las propiedades de estabilidad mecánica del termogel. La reusabilidad del biocatalizador indicó una estabilidad sobresaliente bajo las condiciones de reacción manteniendo más del 80% de la actividad relativa a las 42 horas con una reusabilidad final hasta de 48 horas (Figura 61).

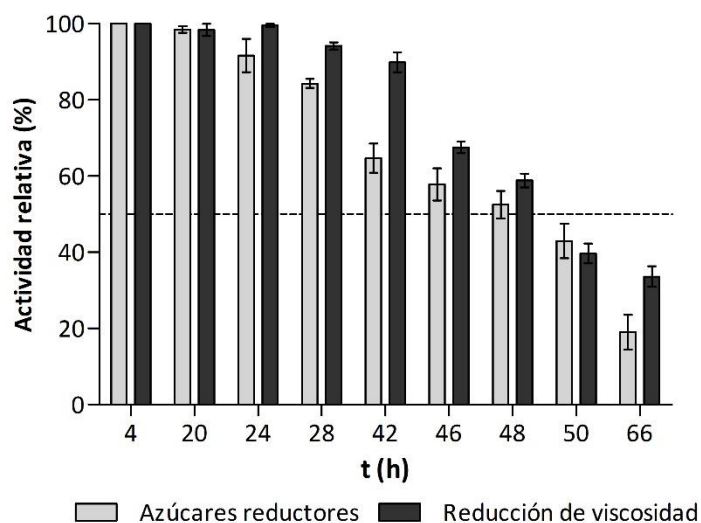


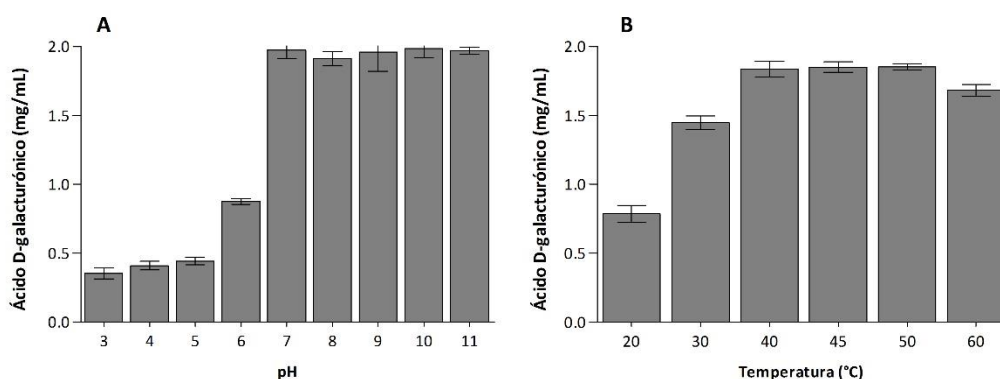
Figura 61. Reusabilidad del biocatalizador inmovilizado mediante atrapamiento en matriz de agar bacteriológico 3.6% (p/v) con adición de $MgCl_2$ 20 mM y una carga de proteína de 0.196 mg/mg.

La disminución de la actividad enzimática posiblemente se presentó por variaciones en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, el biocatalizador desarrollado fue excepcionalmente más estable que otras enzimas inmovilizadas en termogeles similares, porque se obtuvo una reusabilidad de 96 ciclos y los reportes bibliográficos demostraron como máximo 6 ciclos de reusos (Tabla 25).

Tabla 25. Ciclos de reusabilidad de diferentes enzimas de la familia glicosil hidrolasas inmovilizadas por atrapamiento en matrices de agar.

Enzima	Fuente	Ciclos	Referencia
β -1,4-xylanasa	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	3	(Bibi <i>et al.</i> , 2015)
α -glucosidasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	6	(Nawaz <i>et al.</i> , 2014)
Pectinasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	4	(Rehman <i>et al.</i> , 2014a)
Poligalacturonasa	<i>Streptomyces halstedii</i> ATCC 10897	96	Tesis

El efecto del pH y la temperatura en la estabilidad del biocatalizador fue evaluado en un rango de 3 a 11 y de 20 °C a 60°C, respectivamente (Figura 62). La enzima atrapada en la matriz de agar bacteriológico estabilizada con cationes Mg^{+2} mostró alta actividad en un amplio rango de pH, de 7 a 11 con una media de concentración de producto de 1.987 mg/mL (Figura 62A) y 39.7% de hidrólisis del ácido poligalacturónico. Este resultado demostró una estabilidad y actividad mejorada en el rango de neutro a alcalino extremo, diferenciándose de la enzima soluble que descendió su actividad en un 65% a pH 7 (Ramírez-Tapias *et al.*, 2015). La figura 62B muestra que a 20 y 30°C el biocatalizador redujo la conversión a producto al 80 y 43% de la actividad máxima, respectivamente; y el rango óptimo de actividad fue entre 40 y 50°C. La reducción de la actividad enzimática en la temperatura baja se presentó por una reducción en la difusividad molecular de los sustratos y productos a través de las partículas, la cual es una variable dependiente de la temperatura. A 60°C se observó un leve descenso y las partículas estuvieron más blandas debido a que las zonas de unión más débiles de las moléculas del polímero inician su proceso de desestabilización para fundir a mayores temperaturas (Norziah *et al.*, 2006).

**Figura 62.** Características de estabilidad del biocatalizador desarrollado en matriz de Agar-Mg² con actividad PG. (A) Efecto del pH a 40 °C y (B) Efecto de la temperatura a pH 11.

Adicionalmente, se analizó la estabilidad de almacenamiento a 4°C para asegurar la conservación de la actividad del biocatalizador y los resultados demostraron que el biocatalizador retuvo el 93% de la actividad después de 225 días.

En resumen, se desarrolló un biocatalizador heterogéneo en matriz de agar bacteriológico, usando MgCl₂ 20 Mm como aditivo cosmotrópico, lográndose la retención de una carga de proteína de 0.196 mg/mg. A los 30 minutos de reacción enzimática se generó 1.987 ± 0.139 mg/mL de ácido D-galacturónico, lo cual resultó en un rendimiento de 9.279 ± 0.316 g/g, además se redujo en un 98.3 ± 1.5% la viscosidad del sustrato. La estabilidad catalítica y mecánica del biocatalizador se preservó durante 48 horas, permitiendo una reusabilidad de 96 ciclos. El mejoramiento de las propiedades viscoelásticas es un resultado relevante y dio ventajas biocatalíticas en comparación con otros sistemas desarrollados en agar con enzimas del tipo glicosil hidrolasas.

Matrices Mixtas

El atrapamiento de PG en los polímeros naturales de alginato y agar bacteriológico resultó en biocatalizadores eficientes por su actividad enzimática y características de resistencia mecánica. El biocatalizador basado en agar bacteriológico estabilizado con Mg⁺² fue mejor que el de alginato de sodio gelificado con calcio y estroncio, presentando mayor actividad catalítica, logrando niveles de hidrólisis del 39%, rendimiento de 9.279 g/g y 48 horas de reusabilidad sin evidenciar un hinchamiento significativo. Por ello, se decidió explorar si la conformación de matrices mixtas a partir de agar bacteriológico puede superar el tiempo de vida útil del biocatalizador heterogéneo sin afectar sus características biocatalíticas. Con este propósito se probó reforzar la matriz con poliacrilamida y nanoarcillas naturales.

a. Agar-poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida han sido de interés científico por su capacidad para retener agua, lo cual ha sido una característica que se estudia para maximizar la masa de agua retenida por unidad de xerogel (gel deshidratado) sin alterar la forma inicial ni producir fracturas del material, especialmente para aplicaciones biomédicas y de electroforesis; al respecto, se ha reportado una relación volumétrica de hinchamiento hasta de 18X (Patel *et al.*, 1989). Para aplicaciones de biocatalizadores inmovilizados, los reportes se enfocan a la inmovilización de células enteras, el caso de *Aeromonas salmonicida* ATCC 27013 y *Geobacillus stearothermophilus* con una carga hasta de 3.3 x 10⁹ UFC/mL en geles del 25% (p/v) sin efectos negativos en las biotransformaciones por causa del hinchamiento del gel (De Benedetti *et al.*, 2012; Rivero *et al.*, 2012).

La mezcla del agar bacteriológico en estado sol con acrilamida-bisacrilamida y solución enzimática, se preparó en una relación volumétrica de 1:1:1 y se polimerizó con PSA y TEMED, lo cual resultó en un biocatalizador con concentraciones finales de 1% (p/v), 10% (p/v) y 0.7 mg/mL, respectivamente. El porcentaje de atrapamiento de la matriz compuesta de polímero natural y sintético fue de $76.6 \pm 2.9\%$ y al evaluar su actividad enzimática presentó una formación de producto de 2.295 ± 0.082 mg/mL, $45.9 \pm 0.2\%$ de hidrólisis del sustrato y un rendimiento de 8.627 ± 0.975 g/g, superando en 5 puntos porcentuales la hidrólisis obtenida con el biocatalizador Agar-Mg²⁺. Adicionalmente, al evaluar la reusabilidad de la matriz mixta, se obtuvo que se mantiene activo durante 62 horas, sin embargo, no resultó viable debido a su elevado hinchamiento osmótico, llegando al $78.6 \pm 3.5\%$ (Figura 63). Comparativamente, el hinchamiento presentado fue mayor al de la matriz desarrollada en alginato de sodio, el cual resultó en un 42.6% y, respecto del biocatalizador Agar-Mg²⁺, la diferencia es aún más relevante porque esta matriz presentó un hinchamiento mínimo que no superó un valor del 3%.

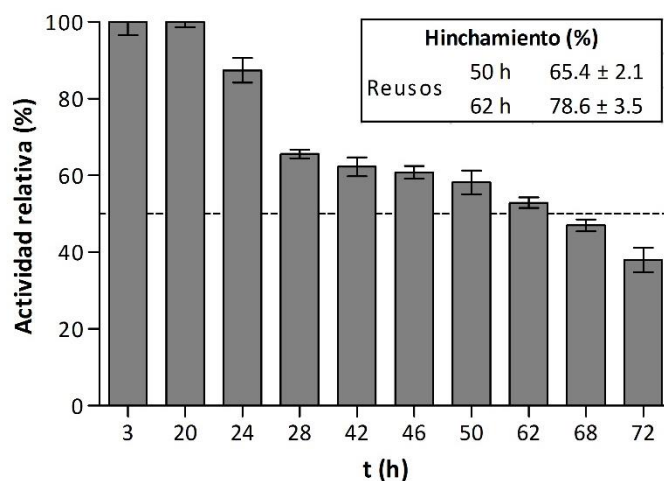


Figura 63. Tiempo de reusos del biocatalizador inmovilizado en matrices mixtas con agar y poli(acrilamida) en relación 1:10 y una carga de proteína de 0.7 mg/mL. Relación de hinchamiento osmótico a las 50 y 62 horas de reacciones sucesivas.

La mayor dificultad que representa un hinchamiento tan elevado es que al aumentar el tamaño de las partículas alrededor del 80%, el volumen ocupado por las mismas aumenta en un orden de 5 veces, lo cual disminuye los grados de libertad en el sistema agitado y, al momento de diseñar un biorreactor de tanque agitado o de columna con lecho empacado o fluidizado, se presentan problemas ya sea de movilidad o de compresión de las partículas, haciendo inviable un escalado del proceso, impactando negativamente la transferencia de masa y la distribución uniforme de los sustratos y productos de la reacción en el biorreactor.

b. Agar-nanoarcillas

Las nanoarcillas están conformadas por capas individuales de aluminosilicatos, la montmorillonita tiene una disposición 2 a 1 de hojas tetrahédricas y octahédricas (T:O:T), es un mineral abundante en la naturaleza y ha sido ampliamente usado para reforzar la estructura de diferentes materiales poliméricos. Otra nanoarcilla con estructura similar es la bentonita, la diferencia con la montmorillonita son los iones sodio presente entre las capas, lo cual le provee características diferenciales en la capacidad de hidratación (Essabir *et al.*, 2016). Con base en esta diferencia, se evaluaron dos estrategias metodológicas para hidratar las nanoarcillas previo al mezclado con el agar bacteriológico y la enzima. Para ello, se realizó una hidratación con agua (2 horas), se centrifugó y después se mezcló con la enzima y el agar. Alternativamente, se hidrató con la misma solución enzimática, se centrifugó y se mezcló con el agar en estado sol para posteriormente formar las esferas.

Los resultados revelaron que durante la hidratación con la solución enzimática ocurre adsorción de las proteínas en las nanoarcillas, llegando a valores de inmovilización del 90%. Los biocatalizadores obtenidos a partir de matrices reforzadas con montmorillonita y bentonita produjeron ácido D-galacturónico a una concentración de 2.046 y 1.629 mg/mL, respectivamente, siendo estos resultados independientes del método de hidratación de las nanoarcillas. Sin embargo, la hidratación con adsorción simultánea, permitió formar una red polimérica reforzada más resistente debido a que se evita una etapa de dilución, lo que se evidenció por un menor ángulo de fase que tomó un valor medio de 2.15°.

A partir de los resultados expuestos se realizaron ensayos adicionales implementando el proceso simultáneo de hidratación y adsorción, variando la carga de nanoarcillas en la matriz en valores entre 10 y 50 mg/mL, lo cual implicó variar la carga proteica por ser factores correlacionados debido a la adsorción de la enzima en la nanoestructura del mineral. La tabla 26 muestra los resultados de rendimiento de la reacción y porcentaje de hidrólisis, se determinó que la carga de nanoarcillas afectó significativamente el rendimiento de la reacción, una carga mínima de 10 mg/mL resultó en el máximo rendimiento medio de 11.223 g/g y con 50 mg/mL el resultado fue de 2.298 g/g. Además, los niveles de hidrólisis se conservaron en un estrecho rango entre 32.6 y 40.9%. Así que la mínima carga de nanoarcilla permitió maximizar el rendimiento de reacción obteniendo niveles de hidrólisis del 35%, siendo operativamente más sencilla la preparación de la matriz. Las diferencias entre usar bentonita o montmorillonita en la conformación de la matriz mixta no resultaron significativas (valor-p = 0.271).

Tabla 26. Actividad biocatalítica de los biocatalizadores con actividad PG inmovilizados en matrices mixtas agar-nanoarcillas.

Carga		Bentonita		Montmorillonita	
Nanoarcilla (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	Rendimiento (g/g)	Hidrólisis (%)	Rendimiento (g/g)	Hidrólisis (%)
10	0.182	11.469*	34.8	10.977*	36.3
15	0.273	7.169	32.6	8.608	40.9
20	0.364	5.632	34.1	6.305	38.2
25	0.455	4.454	33.7	4.792	36.3
50	0.910	2.291	36.4	2.305	37.9

*Tratamiento con carga de nanoarcilla a un nivel de 10 mg/mL resultó con diferencias significativas (prueba LSD valor-p = 0.0137)

Los resultados de rendimiento (g/g) e hidrólisis (%) son el promedio de 2 réplicas experimentales con un error estándar máximo de 12%.

Los biocatalizadores obtenidos con 10 mg/mL de bentonita y montmorillonita fueron evaluados en cuanto a la reusabilidad y se halló que no se superan las 21 horas de reacciones sucesivas (Figura 64). Si bien los biocatalizadores que poseen montmorillonita en su composición presentaron mejor desempeño que los biocatalizadores con contenido de bentonita, el resultado no representó una mejora comparativa con respecto del biocatalizador Agar-Mg⁺² desarrollado previamente en este trabajo doctoral. Adicionalmente, se realizaron controles experimentales de las reacciones enzimáticas empleando la PG unida a las nanoarcillas por adsorción obteniendo resultados similares al biocatalizador inmovilizado en la matriz mixta de agar-nanoarcillas, lo cual sugiere que la pérdida de la actividad no se atribuye a las características de resistencia mecánica del agar compuesto sino a la naturaleza y el mecanismo de las interacciones por adsorción.

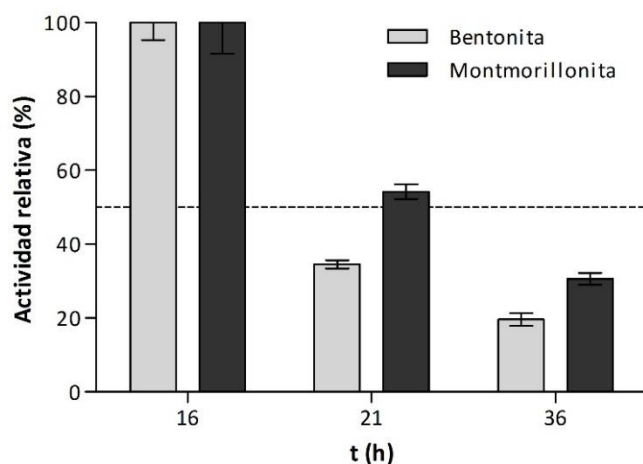


Figura 64. Tiempo de reusos del biocatalizador inmovilizado en matrices mixtas de agar-nanoarcillas a una carga de 10 mg/mL y contenido de proteína de 0.182 mg/mL y su efecto en la relación de hinchamiento osmótico a las 50 y 62 horas de reacciones sucesivas (pH 10).

Posiblemente, los iones metálicos ubicados en los espacios entre capas de las arcillas interactúan con los aminoácidos de las proteínas produciendo atracciones iónicas, sin embargo, la estabilidad de las proteínas y de las capas de aluminosilicatos hidratadas se ven afectadas negativamente durante las reacciones sucesivas en presencia de la mezcla de reacción, tanto a pH neutro como a pH alcalino. Aunque está reportado que un microambiente a pH entre 6.6 y 7.8 favorece la estabilidad de las nanoarcillas, permitiendo un equilibrio en la densidad de las cargas iónicas en el espaciado inter-capas (Abd Rahim *et al.*, 2013; Essabir *et al.*, 2016), la estabilidad catalítica durante los reusos resultó en un nivel bajo a pH 7. De otro lado, un pH básico promueve la actividad PG libre, pero es probable que se generen distorsiones en la geometría de las capas apiladas realizando las reacciones sucesivas a pH 10, dificultando la difusión de productos y sustratos.

Selección del sistema biocatalítico

Los biocatalizadores con actividad PG desarrollados con alto potencial para aplicaciones en procesamiento de alimentos y remediación ambiental fueron los inmovilizados en glioxil-agarosa, alginato de sodio por polimerización ionotrópica con calcio y estroncio y el sistema de termogeles de agar bacteriológico en presencia de magnesio. Cada sistema diseñado presentó diferencias en su cinética, condiciones fisicoquímicas, estabilidad y resistencia mecánica del material de inmovilización. En la tabla 27 se presenta una comparación de las principales características biocatalíticas para la selección del sistema enzimático y su posterior escalado.

Tabla 27. Comparación de los parámetros catalíticos de los biocatalizadores inmovilizados desarrollados por unión a soportes y atrapamiento con actividad PG.

Parámetro	Unidades	Glioxil-agarosa	Alginato	Agar-Mg ⁺²
Tiempo de reacción	(h)	5	2	0.5
Producto	(mg/mL)	3.132	1.542	1.881
Hidrólisis	(%)	31.3	30.6	37.6
Productividad	(mg/mL·h)	0.626	0.771	3.762
Rendimiento	(g/g)	10.087	3.084	9.279
Tiempo de reusos	(h)	90	56	48
Producción total	(mg)	39.895	32.524	134.981
Productividad global	(mg/h)	0.443	0.581	2.812
Km	(M)	0.395	0.062	0.030
Vmax	(μmol/min)	0.241	0.539	0.421

El tiempo de reacción en el cual se observó la máxima generación de producto fue menor al emplear el biocatalizador Agar-Mg⁺², produciendo 1.881 mg/mL de ácido D-galacturónico

en 30 minutos de reacción, beneficiando la productividad de la reacción, siendo ésta 6.01 y 4.87 veces mayor que cuando se usaron los biocatalizadores inmovilizados en glioxil-agarosa y en alginato, respectivamente. En cuanto al porcentaje de hidrólisis, también fue mejor cuando se usó la enzima en atrapada en Agar-Mg⁺² alcanzando valores de 37%. El rendimiento de la reacción es otro parámetro de relevancia catalítica porque indica la cantidad de producto formado con relación a la carga de proteína en el biocatalizador, éste fue optimizado durante el desarrollo de cada biocatalizador y resultó similar para la PG inmovilizada en glioxil-agarosa y agar bacteriológico, con un valor medio de 9.683 g/g con, siendo 3.14 veces superior al rendimiento obtenido con el biocatalizador en alginato. Con respecto del tiempo de reusabilidad, fue más elevado con las enzimas inmovilizadas en soportes por unión covalente, lo cual mostró la alta estabilidad que proveen las uniones multipuntuales, sin embargo, la producción total de azúcares reductores teniendo en cuenta la cantidad de ciclos de reacción posibles, fue de 134.981 mg con Agar-Mg⁺² superando ampliamente los otros dos sistemas biocatalíticos, e incluso, los reportados en estudios con enzimas relacionadas (Gangadharan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Nawaz *et al.*, 2014). La cinética enzimática analizada según el modelo de Michaelis-Menten mostró que no existen diferencias significativas entre los sistemas desarrollados por atrapamiento en los hidrogeles de alginato y agar bacteriológico, siendo los biocatalizadores con mayor velocidad máxima de reacción y mejor afinidad hacia el ácido poligalacturónico.

Conclusión parcial

La inmovilización de la PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 evidenció resultados diferenciales en los sistemas propuestos tanto de unión a soportes por adsorción y enlaces covalentes como de atrapamiento en matrices de polímeros y matrices mixtas. La propuesta metodológica para la optimización del proceso de inmovilización, de reacción y estabilidad mecánica permitieron maximizar el desempeño de los biocatalizadores, demostrando que las estrategias que integraron tanto el análisis estadístico como los estudios bioquímicos y catalíticos fueron novedosas y aportaron un mayor entendimiento del proceso de biocatálisis de la PG en estudio. En cuanto a la unión a soportes, el biocatalizador desarrollado en glioxil-agarosa presentó las mejores características en términos de reacción hidrolítica y de estabilidad. Sin embargo, sus características cinéticas mostraron ser inferiores respecto a los biocatalizadores desarrollados por atrapamiento. Entre los biocatalizadores basados en alginato de sodio y Agar-Mg⁺², ambos presentaron características cinéticas muy similares, aunque se destacó el rendimiento de reacción obtenido con el biocatalizador inmovilizado en agar bacteriológico. Los ensayos con matrices mixtas, tanto polímero-polímero como polímero-nanoarcillas, no superaron el desempeño catalítico del biocatalizador desarrollado con agar. Respecto de la estabilidad a

condiciones de pH y temperatura, el biocatalizador inmovilizado en alginato de sodio fue más sensible al pH formando quelatos a pH alcalino, a 50°C preservó la estabilidad mecánica. De otro lado, el biocatalizador Agar-Mg²⁺ tuvo alta actividad y resistió mayores rangos de pH, sin embargo, a mayores temperaturas se inició la desestabilización de las zonas de unión, lo cual causó un debilitamiento de la matriz. Aunque la selección del biocatalizador para una aplicación específica dependerá de las condiciones de operación a las que se someta, con base en el análisis comparativo de los parámetros catalíticos y dando prioridad a la productividad global de las reacciones, se seleccionó el sistema desarrollado en agar bacteriológico como modelo de estudio para el diseño de un biorreactor heterogéneo.

4. APLICACIONES Y ESCALADO

Tratamiento de aguas

Los efluentes de los molinos de extracción de celulosa y producción de papel se disponen a temperaturas no superiores a 50 °C, son aguas residuales de alta viscosidad, demanda catiónica, alto pH y con contenido de pectinas y xilosa. El uso de tratamientos enzimáticos son una alternativa para disponer de estas aguas de manera segura y con bajo impacto ambiental. La figura 65 muestra el efecto de la enzima PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 en estado soluble sobre una muestra de una empresa local productora de papel corrugado, los resultados indicaron una acción efectiva medida por la reducción de la viscosidad como producto de la degradación del material coloidal proveniente del tejido vegetal. La reducción de la viscosidad que se logró después de 15 minutos de tratamiento enzimático fue de 85.2%, 90.1% y 97.6% a 30, 40 y 50 °C, respectivamente. La reacción a temperatura ambiente (24 °C) también mostró una acción eficiente produciendo un 82% de reducción de la viscosidad.

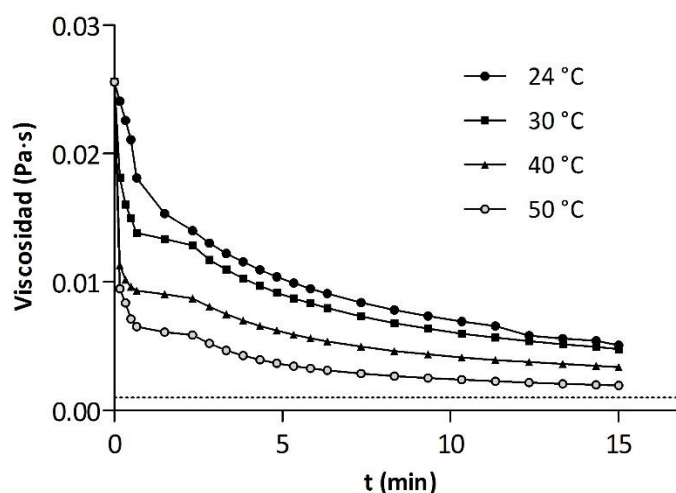


Figura 65. Efecto de la enzima PG libre a diferentes temperaturas en el tratamiento de agua residual proveniente de del procesamiento de pulpa para papel. La línea punteada indica el valor de viscosidad (Pa·s) del agua desionizada.

Una alta proporción de las enzimas pectinolíticas microbianas reportadas en la literatura son de carácter mesofílico y actúan a pH ácidos debido a que provienen de especies fúngicas (Jayani *et al.*, 2005). Otras PG reportadas con actividad alcalina son producidas por *Bacillus licheniformis* y variaciones de pH cercano a 10 causan una pérdida de la actividad del 90%. Adicionalmente, su temperatura óptima es a 45 °C pero la estabilidad térmica es muy reducida, observándose una pérdida de actividad a las 72 horas en temperaturas de 30 °C y 40 °C (Rehman *et al.*, 2015). Los reportes de enzimas pectinolíticas producidas por bacterias del género *Streptomyces* mostraron que el pH óptimo de actividad se presenta entre 6 y 7 y mayores valores de alcalinidad (pH 8 – 10) causan una disminución evidente de la actividad, de más del 50% (Jacob *et al.*, 2008b; Kar y Ray, 2011).

En definitiva, los resultados descritos de la aplicación de la enzima libre exceden su rango de acción hasta pH 12 y actúan en un rango térmico de 5 a 50 °C, útiles para la degradación de sustancias pécticas en aguas residuales o para el desgomado de fibras de celulosa.

Clarificación de jugos

El proceso de preparación de jugos clarificados tiene dos etapas principales, primero se realiza la maceración mecánica, procedimiento que incluye picar, triturar y generar la pulpa de fruta. La segunda etapa se basa en la hidrólisis o remoción de la pectina, la cual consiste en filtración y clarificación. En este sentido, el desempeño catalítico de la PG inmovilizada

por unión covalente en soporte de glioxil-agarosa fue evaluado para la clarificación de jugo de uva y de ciruela (Figura 66). Las condiciones iniciales del jugo fueron caracterizadas en términos de viscosidad, turbidez, contenido de azúcares y sólidos solubles, los cuales se hallaron dentro de los valores recomendados por AIJN (Asociación europea de jugos de fruta) para la Unión Europea. Se observó que después del tratamiento enzimático, la absorbancia en el espectro visible descendió en los jugos clarificados como consecuencia de la acción del biocatalizador, degradando los compuestos pécticos causantes de la turbidez y logrando una reducción del 55 y 51% en los jugos de uva y ciruela, respectivamente (Figura 67). Simultáneamente, la concentración de azúcares reductores se aumentó debido a la conversión de la pectina a oligogalacturonatos solubles, representando un incremento del 16% para el jugo de uva y 28% para el jugo de ciruela, alcanzando valores de 810 mg/L y 350 mg/L, respectivamente. Adicionalmente, la viscosidad descendió hasta un 95%, promoviendo la fluidez, estabilidad y calidad de los productos.

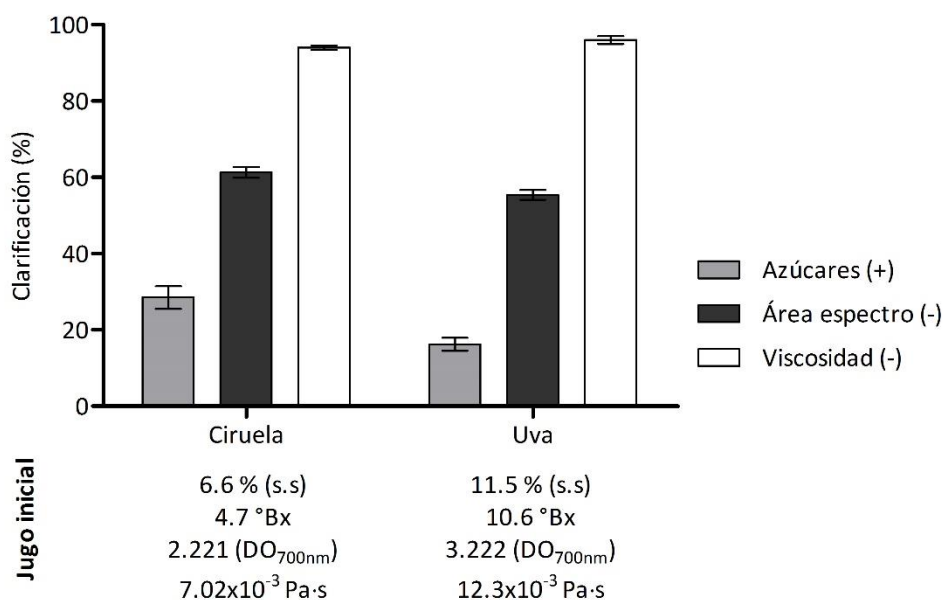


Figura 66. Características de los jugos de fruta iniciales y efectos del tratamiento enzimático con la PG inmovilizada por unión covalente en soportes de glioxil-agarosa para la clarificación de los jugos de ciruela y uva. Los ensayos de clarificación se realizaron a 40 °C durante 4 horas a 40 °C con 10 mg de biocatalizador heterogéneo por mL de jugo.

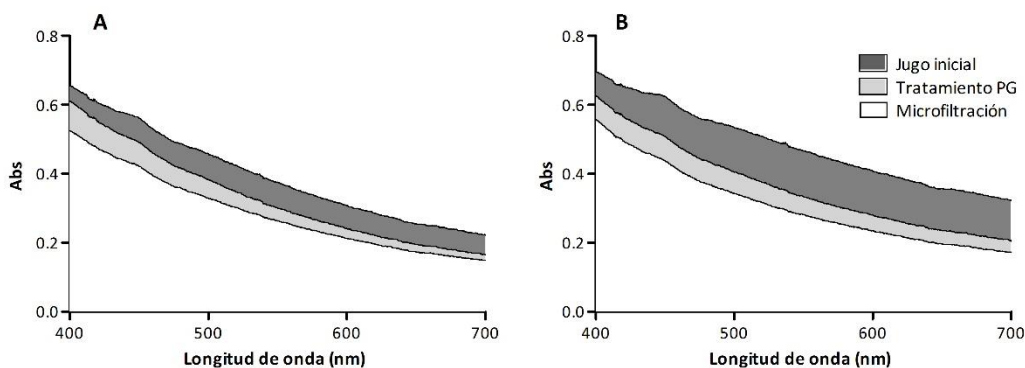


Figura 67. Curvas de barrido de absorbancia en el espectro visible de los jugos. (A) Jugo de ciruela y (B) jugo de uva. El jugo clarificado por microfiltración se consideró como el control positivo del experimento.

Algunos estudios han demostrado la factibilidad de usar enzimas de origen fúngico en estado soluble para la reducción de la turbidez y viscosidad de jugos de fruta como de grosella negra, ciruela, manzana, piña y tomate (Dey *et al.*, 2014; Mieszczakowska-Frac *et al.*, 2012; Sandri *et al.*, 2011). Diferentes factores como la variedad de los frutos, la fuente de las enzimas, las condiciones del proceso de extracción y maceración afectan las características de clarificación. El presente trabajo reporta un efecto significativo con la ventaja diferencial de que se trata de un biocatalizador inmovilizado, el cual puede ser usado en varios lotes productivos.

Sacarificación de albedo de naranja

Los subproductos frutihortícolas poseen un alto potencial para ser aprovechados por su contenido de fibras, antioxidantes y diferentes tipos de carbohidratos presentes, tanto azúcares de bajo peso molecular como fructosa y sacarosa y de polisacáridos como pectinas, celulosa y almidones. En 2016 se estimó que en Argentina se produjeron 1.2 millones de toneladas de frutos como naranjas, limones, pomelos, manzanas, uvas, peras y duraznos, destinados a la producción de jugos y concentrados. En esta cadena de procesamiento, los subproductos que se generaron derivados del material vegetal fueron del 60% del peso total, que pueden ser usados para la extracción de azúcares y fructooligosacáridos, los cuales agregan valor a otros productos alimenticios o pueden utilizarse como insumo a las biorefinerías para la producción de biocombustibles.

El cultivo de frutos cítricos es el más abundante a nivel mundial y más del 80% de las cosechas son destinadas a la producción de jugos y conservas; otro segmento de la producción se destina a la industria química para la extracción de flavonoides y aceites

esenciales. La disposición de los desechos del procesamiento de los frutos constituye un desafío ambiental debido a que el 50% de la masa total se considera un residuo y está compuesto principalmente por la cáscara, el flavedo y albedo, y en menor proporción las semillas y pulpa remanente (Marín *et al.*, 2007). Es así como se decidió recolectar cáscaras de naranja para su degradación enzimática empleando biocatalizadores inmovilizados. Para ello, se separó manualmente el albedo y una vez seco, se sometió a la acción de la PG atrapada en la matriz diseñada con alginato de sodio. La figura 68 muestra el curso de la sacarificación enzimática de las pectinas presentes en el albedo y la reducción de la viscosidad de la suspensión formada, obteniendo 2.236 mg/mL de azúcares reductores y 91.29% de reducción de la viscosidad en tan solo 2 horas de reacción. El tratamiento enzimático de los residuos permitió obtener un 9% (p/p) en base seca de azúcares reductores, los cuales pueden ser usados como insumo para la elaboración de alimentos nutracéuticos o como azúcares fermentables para la producción de bioetanol o ácidos orgánicos en las biorefinerías.

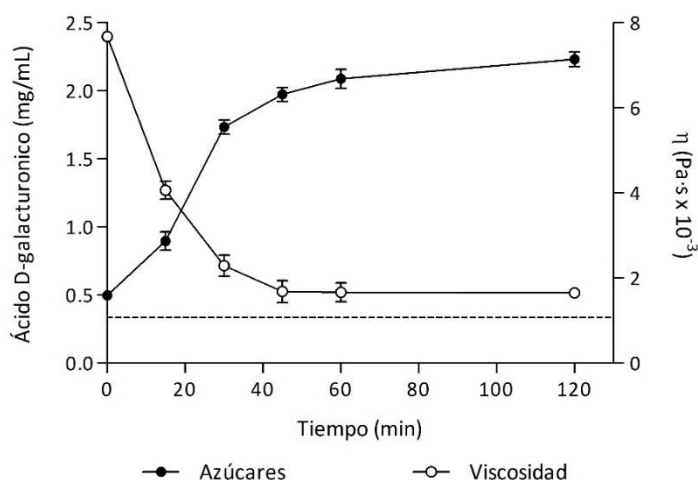


Figura 68. Generación de azúcares reductores y reducción de la viscosidad de suspensiones de albedo de naranja (2% (p/v)) producidas por la acción hidrolítica del biocatalizador con actividad PG inmovilizado por atrapamiento en alginato de sodio. La línea punteada indica el valor de viscosidad (Pa·s) del buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.

Está reportado que el contenido de pectina en la cáscara de frutos cítricos varía entre 16 y 25% (p/p) en base seca según la variedad del fruto. La hidrólisis parcial del polisacárido descompone la molécula en los oligogalacturonanos que la constituyen, siendo principalmente fragmentos de ramnogalacturonanos, oligómeros de ácido D-galacturónico y arabinogalactanos con otros azúcares laterales que ramifican la cadena (Marín *et al.*, 2007). Los oligosacáridos de la pectina, funcionan como fibra dietética que ejercen un

efecto beneficioso en el tracto intestinal, son productos de bajo peso molecular derivados de la hidrólisis de la pectina, son de mayor solubilidad y menos viscosos y se incorporan en los alimentos funcionales (Stone *et al.*, 2008). Dadas las características del hidrolizado obtenido a partir albedo en el presente estudio, se sugiere como un potencial complemento funcional en alimentos dietéticos.

Diseño de biorreactor enzimático

El diseño de biorreactores para conversiones enzimáticas requiere el análisis de múltiples factores, a diferencia de los procesos químicos que se desarrollan mayormente siguiendo un paradigma o pautas que ya han sido establecidas (Fogler, 2011). Entre los factores a tener en cuenta en sistemas biológicos están las características fisicoquímicas y cinéticas de la reacción, aspectos termodinámicos, estabilidad de la enzima, tamaño y forma de las partículas del biocatalizador inmovilizado, resistencia del material particulado, transferencia de masa y la productividad. Con base en los factores mencionados se basa la selección de los equipos que pueden ser de tanque agitado o columnas con lecho empacado o fluidizado y configuraciones de membrana y, el modo de operación, bien sea continuo o por lotes. A continuación, se presenta el desarrollo y análisis de los parámetros para el diseño de una columna de lecho empacado operado por percolación y con recirculación en un sistema discontinuo con el biocatalizador heterogéneo Agar-Mg⁺² con actividad PG.

a. Diseño de biorreactor de lecho percolado

Si bien la productividad de las transformaciones enzimáticas es una variable clave para seleccionar la configuración adecuada del biorreactor, otras variables influyen cuando se trata de biocatalizadores inmovilizados. Por un lado, el estrés mecánico dado por las turbinas de agitación en tanques agitados provocan abrasión y fractura de algunos materiales, este tipo de reactor es más factible para partículas de tamaño micrométrico como los soportes de agarosa y nanoarcillas en los cuales la relación de superficie/volumen es alta y el esfuerzo de cizalla tiene menor impacto, este mismo tipo de partículas podrían resultar menos eficiente si se emplean empacadas en un lecho fijo porque demandaría un mayor volumen del soporte, la porosidad de lecho sería menor y la demanda energética para hacer fluir la solución de sustrato resultaría alta por la caída de presión. Adicionalmente, las configuraciones en columnas de lecho fluidizado se sugieren cuando las reacciones son dependientes del oxígeno y la viscosidad de la solución de sustrato es baja y constante. El lecho empacado es adecuado para partículas que forman lechos porosos con canales que permiten el flujo del fluido y son versátiles para soluciones con variadas características reológicas (Ilsen y Kerim, 2016; Marrazzo *et al.*, 1975).

Con base en las propiedades físicas del biocatalizador heterogéneo indicadas en la tabla 28 y calculadas según las Ecuaciones del 1 al 8, se seleccionó la configuración del lecho empacado para su diseño, caracterización y posterior implementación para la degradación de compuestos pécticos. Adicionalmente, dadas las características variables de la viscosidad durante la reacción, resulta adecuado el flujo por percolación, que también ha sido ampliamente usado para aplicaciones ambientales (Doran, 1955; Tufvesson *et al.*, 2010).

Tabla 28. Propiedades físicas del biocatalizador inmovilizado en Agar-Mg⁺² con actividad PG.

Variable		Unidades	Agar-Mg ⁺²
m_p	Masa de partícula	(g)	0.029
d_p	Diámetro de partícula	(mm)	3.52
ϕ	Factor de esfericidad	(-)	0.941
ε	Porosidad del lecho	(-)	0.25
V_p	Volumen de partícula	(cm ³)	0.023
ρ_p	Densidad de partícula	(g/cm ³)	1.31
ρ_g	Densidad aparente del lecho	(g/cm ³)	1.40
S_p	Superficie de partícula	(cm ²)	0.389
S_g	Superficie específica de partícula	(cm ² /g)	13.423
V_g	Volumen vacío por masa de partícula	(cm ³ /g)	0.352
\bar{a}	Radio medio de poro en el lecho	(μ m)	5.245

El factor de esfericidad de las partículas ($\phi = 0.941$) resultó en un valor muy cercano a 1.0, lo cual da cuenta de un alto grado de aproximación de las mismas a una esfera de igual volumen siendo característica una forma elipsoide, permitiendo una densidad aparente de 1.40 g/cm³ y una porosidad de lecho del 25% y, en consecuencia, un volumen vacío por unidad de masa de partículas de 0.352 cm³/g, el cual es un indicador de la efectividad del área superficial en contacto con el fluido. Adicionalmente, el área superficial específica obtenida de 13.423 cm²/g correspondió al área teórica disponible para la formación de película durante la percolación en la columna empacada, éste valor al ser relacionado con V_g indicó que los canales formados entre las partículas del lecho tuvieron un radio promedio 5.245 μ m asumiendo que éstos son cilíndricos y uniformes a lo largo de toda la columna.

La columna empacada con las partículas caracterizadas se usó para la reacción de hidrólisis de ácido poligalacturónico en una concentración de 5 mg/mL, operando a dos flujos volumétricos de 1 mL/min y 8 mL/min durante 5 horas con recirculación continua, midiendo periódicamente la formación de producto. En la figura 69 se muestra el desarrollo de la reacción con respecto del tiempo de proceso y se halló que el porcentaje de hidrólisis

máximo fue de $31.8 \pm 0.4\%$ en ambas condiciones de proceso. Sin embargo, la diferencia significativa está relacionada a la velocidad de reacción dado que se alcanzó tal nivel de hidrólisis a las 3 horas operando a 1 mL/min y a 1.5 horas con un flujo de 8 mL/min. Se calculó el *holdup* para ambos flujos volumétricos evaluados, ésta variable relaciona el volumen de líquido en circulación por hora por volumen de reactor empacado y resultó en valores de 7.2 y 28.6, a 1 mL/min y 8 mL/min, respectivamente. De esta manera, se tuvo que la mejor condición de productividad se da operando a un flujo volumétrico de 8 mL/min obteniendo una velocidad de reacción de 0.785 mg/h o 0.067 $\mu\text{mol}/\text{min}$ y un *holdup* 4 veces superior, demostrando mayores eventos de contacto del líquido recirculado con el lecho empacado, promoviendo así la reacción enzimática.

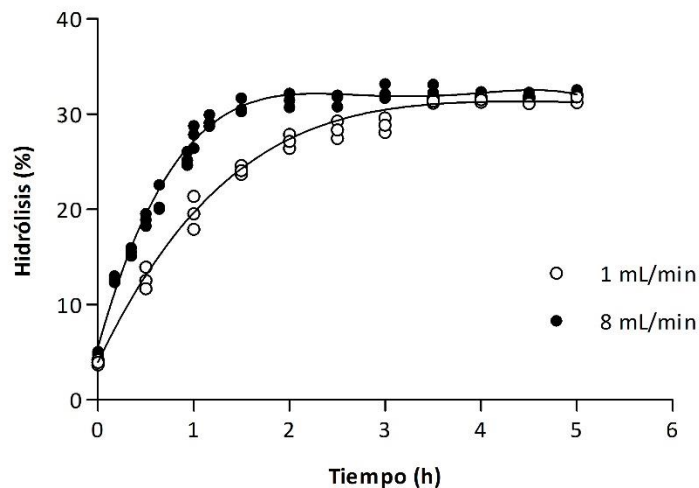


Figura 69. Efecto del flujo volumétrico de percolación con recirculación continua en la hidrólisis de ácido poligalacturónico a 0.5% (p/v) usando un reactor de columna con lecho empacado con partículas de biocatalizador Agar-Mg⁺².

El factor de efectividad experimental del biocatalizador agar-Mg⁺² se calculó según la Ecuación 15 (Engasser, 1978), donde v_{obs} es la velocidad de reacción con el biocatalizador inmovilizado en agar bacteriológico y v_{libre} es la velocidad de reacción utilizando la enzima libre, ambas variables evaluadas en iguales condiciones experimentales de pH 10, temperatura a 50 °C, carga protéica de 0.2 mg por mL de mezcla de reacción y concentración de sustrato a 0.5 % (p/v).

Ecuación 15. Factor de efectividad experimental $\eta_{exp.} = \frac{v_{obs}}{v_{libre}} = \frac{0.056 \text{ mg/min}}{0.078 \text{ mg/min}} = 0.72$

El factor η_{exp} resultó en un valor de 0.72, el cual es indicador de la disminución relativa de la actividad enzimática debido a las limitaciones difusionales según se observó en los resultados reportados en la figura 59, donde se evaluó la cinética de hidrólisis de ácido poligalacturónico con la enzima libre y el biocatalizador inmovilizado en agar bacteriológico.

Los efectos difusionales se pueden calcular mediante modelos y correlaciones basados en estudios de catálisis heterogénea, éstos efectos son externos e internos, es decir, las variables como la velocidad de reacción enzimática observada, la concentración de sustrato y su difusividad molecular, el coeficiente de transferencia de masa externo, el área superficial de partícula y la constante de Michaelis-Menten (K_m) afectan el intercambio de masa en el exterior del biocatalizador inmovilizado. Además, el tamaño de partícula, su tortuosidad y porosidad interna condicionan la difusión interna.

Por tal motivo, se estudiaron modelos de transferencia de masa para determinar analíticamente los efectos difusionales internos y externos y, finalmente, hallar el factor de efectividad teórico (Ecuación 16).

Ecuación 16. Factor de efectividad teórico $\eta = \eta_i \cdot \eta_e$

Donde η_i y η_e corresponde al factor de efectividad interno y externo, respectivamente. Estos factores son usados en catálisis química, sin embargo, los modelos no pueden ser aplicados exactamente a los sistemas biológicos. Engasser (1978) desarrolló un método para ser aplicado con enzimas inmovilizadas y a partir del método expuesto y conceptos de catálisis heterogénea de reactores químicos (Fogler, 2011; Ilse y Kerim, 2016), se determinaron los parámetros requeridos para el cálculo de dichos factores. En la tabla 29 se exponen las variables necesarias para el desarrollo analítico de los modelos y correlaciones para columnas de lecho empacado.

Tabla 29. Variables involucradas en el análisis del sistema a partir de modelos que describen los efectos de transferencia de masa en biorreactores heterogéneos de lecho empacado.

Parámetro del sistema		Valor
Radio de partícula	r_p (cm)	0.176
Temperatura de reacción	T (°C)	40
Densidad sustrato	ρ_s (kg/m ³)	998
Velocidad de percolación	v (cm/s)	12
Viscosidad de solución	η_s (Pa·s)	0.003
Viscosidad del agua	η (Pa·s)	0.001
Constante de Boltzman	k_b (J/K)	1.38065×10^{-23}
Radio hidrodinámico	r_H (m)	3.6×10^{-10}
Velocidad de reacción	v_r (mg/s)	2.18×10^{-4}
Concentración de sustrato	[S] (mg/cm ³)	5
Constante de Michaelis-Menten	Km (mg/cm ³)	5.824
Porosidad de partícula ^a	ϵ	0.91
Tortuosidad de partícula ^a	τ	1.08

^aMarrazzo, W.N., Merson, R.L., McCoy, B.J., 1975. Enzyme immobilized in a packed-bed reactor: Kinetic parameters and mass transfer effects. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1515–1528.

VARIABLES COMO EL RADIO DE PARTÍCULA, DENSIDAD Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO, VELOCIDAD DE PERCOLACIÓN, VELOCIDAD DE REACCIÓN, Y LA CONSTANTE KM FUERON CUANTIFICADOS EXPERIMENTALMENTE. ES DE ANOTAR QUE LA VISCOSIDAD DE LA SOLUCIÓN VA DISMINUYENDO CON RESPECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN, SIN EMBARGO, SU IMPACTO NO RESULTÓ SIGNIFICATIVO EN EL RÉGIMEN DE FLUJO, MANTENIÉNDOSE EN LA REGIÓN LAMINAR OPERANDO A 8 mL/MIN. ADICIONALMENTE, EL RADIO HIDRODINÁMICO EXPRESADO CORRESPONDE A UN PROMEDIO PARA AZÚCARES DE TAMAÑO VARIABLE, CONSIDERANDO HASTA OLIGOGALACTURONATOS DE 8 UNIDADES MONOMÉRICAS (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2011; WITTGREN Y WAHLUND, 1997) Y LA POROSIDAD Y TORTUOSIDAD AL INTERIOR DE LA PARTÍCULA SON VALORES DE REFERENCIA PARA HIDROGELES, LOS CUALES POR LA CANTIDAD DE AGUA OCLUIDA AL INTERIOR DE LA MATRIZ GENERAN BAJA RESISTENCIA (MARRAZZO *et al.*, 1975). POSTERIORMENTE, SE PROCEDIÓ A CALCULAR LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN DIRECTAMENTE EL FACTOR DE EFECTIVIDAD (ECUACIONES 9 A 14), LOS CUALES SE REPORTAN EN LA TABLA 30.

Tabla 30. Variables calculadas con modelos semifundamentales y empíricos para determinar las limitaciones difusionales en el biorreactor heterogéneo de lecho percolado.

Parámetros de modelos		Valor
Número de Reynolds ^a	Re	140.5
Factor de transferencia de masa ^a	j_D	0.133
Difusividad molecular ^b	D (m ² /s)	6.372x10 ⁻¹⁰
Difusividad efectiva ^b	D _{eff} (m ² /s)	5.369x10 ⁻¹⁰
Coefficiente de transferencia de masa externo ^a	h (m/s)	5.686x10 ⁻⁵
Concentración de sustrato en la superficie ^c	[S] _s (mg/cm ³)	4.901
Factor de efectividad externo ^c	η_e	0.95
Factor de efectividad interno ^c	η_i	0.83
Factor de efectividad ^c	η	0.79

^aIlse, Z., Kerim, A., 2016. Multiphase Catalytic Reactors. Theory, Design, Manufacturing, and Applications. Wiley, New Jersey. ^bFogler, H.S., 2011. Diffusion and reaction, in: Essentials of Chemical Reaction Engineering. Pearson Education, pp. 813–866. ^cEngasser, J.M., 1978. A fast evaluation of diffusion effects on bound enzyme activity. BBA - Enzymol. 526, 301–310.

El número de Reynolds varió entre 119.7 y 421.5 debido a los cambios de la viscosidad durante la reacción, formando una película con flujo laminar alrededor de las partículas en la trayectoria del lecho. La difusividad molecular reportada en la tabla 30 corresponde a la de los productos de reacción en sistema acuoso y la difusividad efectiva fue menor en un factor de 0.842 a la molecular, el cual es un indicador de baja resistencia y es un valor característico para hidrogeles, en otros materiales como partículas de sílica, vidrio poroso y arcillas la difusividad efectiva es de aproximadamente D/5. La concentración de sustrato en la superficie de las partículas del biocatalizador es función de la velocidad de reacción y el coeficiente de transferencia de masa externo y resultó en un valor similar a 0.5% (p/v), concentración del ácido poligalacturónico al inicio de la reacción.

Finalmente, el factor η_e fue de 0.95, el cual indicó que en el exterior de las partículas (microambiente condicionado por V_g y \bar{a}) se llevó a cabo de forma eficiente el intercambio de masa de las especies de la reacción. El resultado de η_i sugiere que al interior de la partícula no se presentó alta resistencia en la difusión molecular. En otros sistemas biocatalíticos reportados, este factor varió entre 0.3 y 0.65 (Engasser, 1978; Engasser y Horvath, 1973). De manera global, el factor de efectividad teórico fue 0.79, valor que no difiere del hallado experimentalmente ($\eta_{exp.} = 0.72$), es decir que la resistencia que opone el lecho empacado y el material de la matriz Agar-Mg⁺² a la difusión de los productos y sustratos, reduce entre un 21 y 28% la velocidad de reacción enzimática empleando ácido poligalacturónico a 0.5% (p/v), con respecto de la misma reacción en ausencia de la barrera difusional. Este resultado es relevante dado que caracterizó el sistema particular de la PG

inmovilizada en Agar-Mg²⁺, manteniendo los parámetros hidrodinámicos y de velocidad de hidrólisis en una escala 25 veces mayor operando a 8 mL/min.

En una etapa subsiguiente, se usó el biorreactor de lecho percolado operando a las condiciones establecidas para evaluar su desempeño en la degradación por hidrólisis enzimática de subproductos frutihortícolas desechados por una empresa local productora de jugos.

b. Tratamiento de residuos de pera y pepino

Los residuos derivados del procesamiento de jugos de fruta poseen polisacáridos estructurales, compuestos principalmente de sustancias pécticas. En este sentido, se evaluó el desempeño catalítico de la PG atrapada en la matriz Agar-Mg²⁺ en una configuración de biorreactor de lecho percolado para la hidrólisis enzimática de residuos de pera y pepino. En la figura 70 se indican las condiciones iniciales del efluente y los resultados después del tratamiento enzimático y se observa que el producto de reacción es una corriente con una menor fracción de sólidos suspendidos y un mayor contenido de sólidos solubles y azúcares reductores. El tratamiento enzimático aumentó el contenido de azúcares reductores debido a la conversión de la pectina en oligogalacturonatos solubles, llegando a valores de 15.33 mg/mL y 9.35 mg/mL para pera y pepino, respectivamente. La viscosidad se redujo hasta un 92.3% debido a la sacarificación de los polímeros en el tejido vegetal de ambos ensayos.

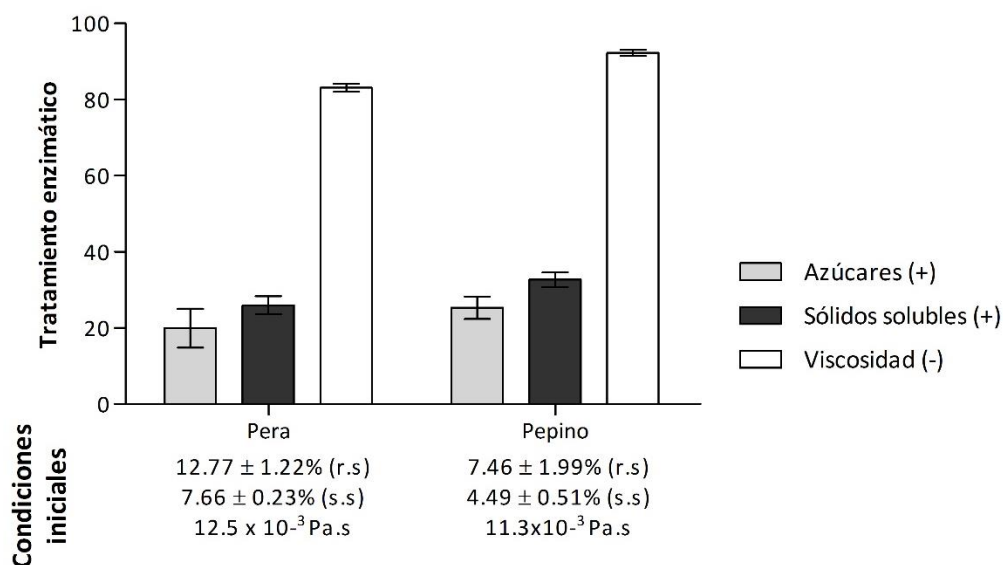


Figura 70. Caracterización de las corrientes iniciales de subproductos de pera y pepino (azúcares reductores (r.c), sólidos solubles (s.s) y viscosidad) y el tratamiento en el biorreactor de lecho percolado con el biocatalizador inmovilizado en Agar-Mg²⁺. Los ensayos fueron realizados a 30 °C con recirculación a 8 mL/min durante 2 horas.

De acuerdo a estos resultados satisfactorios, es posible concluir que el biorreactor de lecho percolado fue eficiente para la degradación de los compuestos pécticos y demostró un alto potencial para continuar aumentando la escala del proceso para el diseño de un biorreactor que trate los desechos en agroindustria y generar efluentes con alto contenido de azúcares que pueden ser transformados en materias primas para productos nutracéuticos con contenido de oligosacáridos o para la producción azúcares fermentables que sean convertidos a biocombustibles y así satisfacer parte de la demanda energética de las mismas industrias.

Conclusión parcial

La aplicación de la enzima PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 en procesos ambientales como el tratamiento de aguas residuales y de subproductos frutihortícolas, así como en manufactura de alimentos para la clarificación enzimática de jugos, demostró resultados satisfactorios. Usando la enzima libre se obtuvo una reducción de la viscosidad hasta del 97% de las aguas derivadas de la preparación de pasta para papel, evidenciando la hidrólisis del material péctico producido por el desgomado de fibras de celulosa. Por otro lado, la clarificación de jugos de ciruela y de uva por efecto del biocatalizador inmovilizado en glioxil-agarosa permitió una reducción de la turbidez hasta del 60%, se aumentó el contenido de azúcares reductores y se mejoró la fluidez del producto. Adicionalmente, la sacarificación del albedo de naranja con el biocatalizador heterogéneo en alginato produjo 2.236 mg/mL de azúcares reductores y 91.29% de reducción de viscosidad.

El biocatalizador Agar-Mg⁺² fue seleccionado como modelo para el diseño del biorreactor de lecho percolado dadas sus características de productividad y producción global de azúcares reductores. Durante la vida útil del biocatalizador, se producen 134.981 mg de azúcares reductores resultando en una productividad de 2.812 mg/h, siendo superior a los sistemas heterogéneos de glioxil-agarosa y alginato. El biorreactor de lecho empacado con operación discontinua y recirculación por percolación a un flujo volumétrico de 8 mL/min, permitió un porcentaje de hidrólisis del 32% en 1.5 horas y un *holdup* de 28.8. El régimen de flujo se mantuvo en la región laminar fluyendo en capas alrededor de las partículas que favorecieron la reacción, con baja resistencia a la difusión de sustrato y productos y un factor de efectividad de 0.79. La columna de lecho empacado fue empleada para la degradación de subproductos de pera y pepino produciendo un aumento de azúcares reductores y sólidos solubles hasta del 30% y una reducción de la viscosidad hasta del 80%. El diseño del biorreactor permitió el tratamiento de subproductos frutihortícolas para la generación de azúcares fermentables para biorefinerías o complemento de productos nutracéuticos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIJN	Asociación europea de jugos de fruta
ATPS	Sistema de bifases acuosas
BSA	Albúmina de suero bovino
CAZY	Enzimas activas en carbohidratos
CLEA	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i>
DEAE	Dietilaminoetil
DNS	Ácido dinitrosalicílico
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
HG	Homogalacturonano
IDA	Ácido iminodiacético
IEF	Electroforesis enfocada en punto isoelectrico
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
MANAE	Monoaminoetil-N-aminoetil
MWCO	Peso molecular de corte
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PEI	Polietilenimina
PG	Poligalacturonasa
PGL	Pectato liasa
PME	Pectin metilesterasa
PSA	Persulfato de amonio
PVA	Polivinilalcohol
PL	Pectin liasa
RG	Ramnogalacturonano
SDS	Dodecil sulfato de amonio
TEMED	Tetrametiletildiamina
TLC	Cromatografía de capa fina
UFC	Unidades formadoras de colonia
XGA	Xilogalacturonano

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de investigación se identificó una cepa bacteriana con capacidad metabólica para producir una poligalacturonasa (PG) extracelular con elevada actividad enzimática. La PG fue inmovilizada desarrollándose un biocatalizador heterogéneo estable, con actividad hidrolítica para aplicaciones en alimentos y ambiente. Se propuso una ruta de diseño del bioproceso que involucró la selección del microorganismo por técnicas de *screening*, la optimización de la producción de la enzima por cultivo líquido en matraz, su inmovilización por técnicas de unión a soportes y atrapamiento y, finalmente, el diseño de un modelo de biorreactor de lecho percolado.

Del *screening* realizado con 100 cepas pertenecientes a más de 29 géneros, aquellas del género *Streptomyces* sobresalieron en su actividad PG. La cepa *S. halstedii* ATCC 10897 mostró la máxima actividad enzimática y el proceso de fermentación en matraz fue optimizado. Se halló que a pH 8, el medio de cultivo con 15 g/L de peptona de soja, 28 °C, agitación a 200 rpm y 12 horas de cultivo celular son las condiciones que maximizan la actividad PG, llegando a valores de 1.076 U/mL y 95% de reducción de viscosidad.

Se identificó que las enzimas con actividad PG producidas por *S. halstedii* ATCC 10897 son de carácter alcalofílico y presentan actividad óptima a pH 12 y 50 °C. Son proteínas monoméricas con un peso molecular aproximado de 48 kDa. El proceso de recuperación y purificación de la proteína con alto rendimiento y selectividad se realizó por ultrafiltración del sobrenadante de cultivo libre de células, empleando una membrana tipo *cassete* de 10 kDa de peso molecular de corte. El extracto enzimático purificado obtenido presentó una concentración de proteína de 2.125 mg/mL y demostró una elevada estabilidad en presencia de iones y solventes orgánicos. La actividad PG del extracto fue de 4.258 U/mL y 98% de reducción de viscosidad y

La inmovilización enzimática de la PG se realizó por unión a soportes de agarosa modificada, atrapamiento en matrices de alginato y agar bacteriológico y en matrices mixtas de agar-poliacrilamida y agar-nanoarcillas. La propuesta metodológica para la optimización del proceso de inmovilización, de reacción y estabilidad mecánica permitieron maximizar el desempeño de los biocatalizadores, demostrando que las estrategias que integraron tanto el análisis estadístico como los estudios bioquímicos y catalíticos fueron novedosas y aportaron un mayor entendimiento del proceso de biocatálisis.

En cuanto a la unión a soportes, el biocatalizador desarrollado por uniones covalentes multipuntuales en glioxil-agarosa presentó las mejores características en términos de reacción hidrolítica y de estabilidad. Con una carga de proteína de 4.389 mg/g se logró una producción de 2.847 mg/mL de ácido D-galacturónico a las 5 horas de reacción, un 28.5% de hidrólisis del ácido poligalacturónico, un rendimiento en la conversión de 10.087 g/g y una reusabilidad de 90 horas. Las características cinéticas resultaron levemente inferiores en comparación con los biocatalizadores desarrollados por atrapamiento.

Los biocatalizadores desarrollados en matrices alginato de sodio por polimerización ionotrópica con calcio y estroncio y en agar bacteriológico con iones magnesio, presentaron características cinéticas similares, aunque se destacó la estabilidad y el rendimiento de reacción obtenido con el biocatalizador inmovilizado en agar. La PG inmovilizada en alginato permitió obtener a las 2 horas de reacción una concentración de 1.542 mg/mL de ácido D-galacturónico, un 30.7% de hidrólisis y un rendimiento de 3.084 g/g. La estabilidad mecánica y catalítica se destacó preservando la actividad enzimática durante 29 ciclos de reacción. Por otro lado, las reacciones realizadas con el biocatalizador heterogéneo en matriz de agar bacteriológico produjeron 1.987 mg/mL de ácido D-galacturónico, lo cual resultó en un 39.7% de hidrólisis y un rendimiento de 9.279 ± 0.316 g/g. Además, La estabilidad catalítica y mecánica del biocatalizador permitió una reusabilidad de 96 ciclos. Se probaron matrices mixtas de agar-poliacrilamida y agar-nanoarcillas pero no mejoraron los resultados obtenidos con la PG en glioxil-agarosa, alginato y agar.

La aplicación de la enzima PG producida por *S. halstedii* ATCC 10897 en procesos ambientales como el tratamiento de aguas residuales de pasta celulósica de papel y de subproductos frutihortícolas, así como en manufactura de alimentos para la clarificación enzimática de jugos, demostró resultados satisfactorios. La clarificación de jugos de fruta con el biocatalizador inmovilizado en glioxil-agarosa permitió una reducción de la turbidez hasta del 60%, se aumentó el contenido de azúcares reductores y se mejoró la fluidez del producto. Proponiéndose con el presente trabajo una estrategia para la industria de alimentos que demanda procesos a condiciones con menor consumo energético y conservación de las propiedades organolépticas y nutricionales de los productos. Adicionalmente, la sacarificación del albedo de naranja con el biocatalizador heterogéneo en alginato fue efectiva para la producción de azúcares reductores.

Con base en las características de productividad y producción global de azúcares reductores, el biocatalizador heterogéneo de partículas de agar bacteriológico con actividad PG fue seleccionado como modelo para el diseño del biorreactor de lecho percolado. El biorreactor en operación discontinua con recirculación a un flujo volumétrico de 8 mL/min

permitió un porcentaje de hidrólisis del 32% en 1.5 horas de reacción y un *holdup* de 28.8. La resistencia difusional del sistema fue baja representada por un factor de efectividad de 0.79. La columna de lecho empacado se empleó para la degradación de subproductos de pera y pepino y produjo un aumento de azúcares reductores y sólidos solubles hasta del 30%, además se logró una reducción de la viscosidad del 80%. Se demostró el potencial del bioproceso desarrollado para un tratamiento de subproductos frutihortícolas que generen azúcares fermentables aptos para biorefinerías y elaboración de productos nutracéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, D.W., Boraston, A.B., 2007. The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase. *J. Mol. Biol.* 368, 1215–22. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.083
- Abd Rahim, S.N., Sulaiman, A., Ku Hamid, K.H., Muhd Rodhi, M.N., Musa, M., Hamzah, F., Edama, N.A., 2013. Nanoclay Supporting Materials for Enzymes Immobilization: Kinetics Investigation of Free and Immobilized System. *Appl. Mech. Mater.* 393, 115–120. doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.393.115
- Agrios, G., 2005. *Plant pathology*, 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington.
- Ahlawat, S., Battan, B., Dhiman, S.S., Sharma, J., Mandhan, R.P., 2007. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 763–70. doi:10.1007/s10295-007-0251-3
- Ahlawat, S., Dhiman, S.S., Battan, B., Mandhan, R.P., Sharma, J., 2009. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochem.* 44, 521–526. doi:10.1016/j.procbio.2009.01.003
- Ahlawat, S., Mandhan, R.P., Dhiman, S.S., Kumar, R., Sharma, J., 2008. Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149, 287–93. doi:10.1007/s12010-007-8096-9
- Andriani, D., Sunwoo, C., Ryu, H.-W., Prasetya, B., Park, D.-H., 2012. Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 29–33. doi:10.1007/s00449-011-0630-z
- Anseth, K.S., Bowman, C.N., Brannon-peppas, L., 1996. REVIEW Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* 17, 1647–1657.
- Anuradha, K., Padma, P.N., Venkateshwar, S., Reddy, G., 2010. Fungal isolates from natural pectic substrates for polygalacturonase and multienzyme production. *Indian J. Microbiol.* 50, 339–344. doi:10.1007/s12088-010-0054-5
- Arroyo, M., 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharm.* 39, 23–39.
- Bauer, F.F., Govender, P., Bester, M.C., 2010. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 31–39. doi:10.1007/s00253-010-2783-0
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal, G.S., 2000a. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 396–402. doi:10.1038/sj.jim.7000010
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal, G.S., 2000b. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 396–402. doi:10.1038/sj.jim.7000010
- Bhardwaj, V., Garg, N., 2014. Production , Purification of Pectinase from *Bacillus* sp. MBRL576 Isolate and its Application in Extraction of Juice. *Int. J. Sci. Res.* 3, 648–652.
- Bibi, Z., Shahid, F., Ul Qader, S.A., Aman, A., 2015. Agar-agar entrapment increases the stability of endo- β -1,4-xylanase for repeated biodegradation of xylan. *Int. J. Biol. Macromol.* 75, 121–127. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.12.051

- Blanco, P., Sieiro, C., Villa, T.G., 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 1–9.
- Blandino, a, Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S., Webb, C., 2001. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochem.* 37, 497–503. doi:10.1016/S0032-9592(01)00241-2
- Bolivar, J.M., Eisl, I., Nidetzky, B., 2015. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. *Catal. Today* 259, 66–80. doi:10.1016/j.cattod.2015.05.004
- Cao, J., Zheng, L., Chen, S., 1992. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 1013–1016.
- Cappa, V.A., Rivero, C.W., Sambeth, J.E., Trelles, J.A., 2016. Bioproduction of Floxuridine Using Nanostabilized Biocatalysts. *Chem. Eng. Technol.* 39, 1723–1730. doi:10.1002/ceat.201500522
- Cappa, V. a., Rivero, C.W., Britos, C.N., Martinez, L.M., Lozano, M.E., Trelles, J. a., 2014. An efficient biocatalytic system for floxuridine biosynthesis based on *Lactobacillus animalis* ATCC 35046 immobilized in *Sr*-alginate. *Process Biochem.* 49, 1169–1175. doi:10.1016/j.procbio.2014.03.029
- Carneiro-Da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2011. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydr. Polym.* 85, 522–528. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.001
- Catapano, G., Czermak, P., Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., 2009. Bioreactor Design and Scale-Up, in: Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., Catapano, G., Czermak, P. (Ed.), *Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Dalal, S., Sharma, A., Gupta, M.N., 2007. A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities. *Chem. Cent. J.* 1, 16. doi:10.1186/1752-153X-1-16
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3, 1–9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7
- Davidovich-Pinhas, M., Bianco-Peled, H., 2010. A quantitative analysis of alginate swelling. *Carbohydr. Polym.* 79, 1020–1027. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.036
- De Benedetti, E.C., Rivero, C.W., Britos, C.N., Lozano, M.E., Trelles, J.A., 2012. Biotransformation of 2,6-diaminopurine nucleosides by immobilized *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Prog.* 28, 1251–1256. doi:10.1002/btpr.1602
- Debing, J., Peijun, L., Stagnitti, F., Xianzhe, X., Li, L., 2006. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 244–50. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.01.002
- Dey, T.B., Adak, S., Bhattacharya, P., Banerjee, R., 2014. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 591–595. doi:10.1016/j.lwt.2014.04.064
- Doran, P.M., 1955. Reactor Engineering, in: *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier Academic Press, pp. 333–391. doi:10.1016/B978-0-12-220851-5.00014-9
- El-sayed, M.H., 2015. Thermoalkali-Stable Pectinase from *Bacillus subtilis* Strain NVFO 19 Isolated from Agricultural Waste Dump Soil. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 3, 805–815.
- Engasser, J.M., 1978. A fast evaluation of diffusion effects on bound enzyme activity. *BBA - Enzymol.* 526, 301–

310. doi:10.1016/0005-2744(78)90122-5

Engasser, J.M., Horvath, C., 1973. Effect of internal diffusion in heterogeneous enzyme systems: Evaluation of true kinetic parameters and substrate diffusivity. *J. Theor. Biol.* 42, 137–155. doi:10.1016/0022-5193(73)90153-7

Essabir, H., Raji, M., Bouh, R., 2016. Nanoclay Reinforced Polymer Composites 29–49. doi:10.1007/978-981-10-0950-1

Fawole, O.B., Odunfa, S. a., 2003. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 52, 223–227. doi:10.1016/S0964-8305(03)00094-5

Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, a., Guisan, J.M., 1993. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 546–550. doi:10.1016/0141-0229(93)90016-U

Fernandez-Lorente, G., Lopez-Gallego, F., Bolivar, J.M., Rocha-Martín, J., Moreno-Perez, S., Guisán, J.M., 2015. Immobilization of Proteins on Glyoxyl Activated Supports: Dramatic Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Pre-Existing Supports. *Curr. Org. Chem.* 19, 1–13. doi:10.2174/1385272819666150429232725

Fogler, H.S., 2011. Diffusion and reaction, in: *Essentials of Chemical Reaction Engineering*. Pearson Education, pp. 813–866.

Fontana, R., Salvador, S., Moura da Silveira, M., 2005. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 371–377.

Gangadharan, D., Madhavan Nampoothiri, K., Sivaramakrishnan, S., Pandey, A., 2009. Immobilized bacterial α -amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch. *Food Res. Int.* 42, 436–442. doi:10.1016/j.foodres.2009.02.008

Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., Mahajan, R., 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6, 1–13. doi:10.1007/s13205-016-0371-4

Gekko, K., Timasheff, S.N., 1981. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. *Biochemistry* 20, 4667–4676. doi:10.1021/bi00519a023

Gomes, J., Zeni, J., Cence, K., Toniazzo, G., Treichel, H., Valduga, E., 2011. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Food Bioprod. Process.* 89, 281–287. doi:10.1016/j.fbp.2010.10.002

Gopinath, S., Sugunan, S., 2006. Enzymes immobilized on montmorillonite: Comparison of performance in batch and packed-bed reactors. *React.Kinet.Catal.Lett* 88, 3–9. doi:10.1556/RKCL.88.2006.1.1

Group, T. freedonia, 2013. *World Enzymes. Industry study with Forecast*. Cleveland.

Guisán, J.M., 2006. *Immobilization of Enzymes and Cells*, Second. ed. Humana Press.

Gulrez, S.K.H., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., 2003. Hydrogels: Methods of Preparation , Characterisation and Applications. *Prog. Mol. Environ. Bioeng.* 51, 117–150. doi:10.1016/j.jvs.2009.12.028

Gummadi, S, Manoj, N. and, Kumar, S., 2007. Structural and biochemical properties of pectinases, in: Polaina, J., Mac Cabe, A. (Eds.), *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 99–115.

- Gupta, S., Kapoor, M., Sharma, K.K., Nair, L.M., Kuhad, R.C., 2008. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Bioresour. Technol.* 99, 937–45. doi:10.1016/j.biortech.2007.03.009
- Highley, T.L., 1997. Carbohydrolase Assays, in: Dashek, W. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press, pp. 309–321.
- Hiteshi, K., Chauhan, S., Gupta, R., 2013. Immobilization of Microbial Pectinases: a Review. *CIBTech J. Biotechnol.* 2, 37–52.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K., 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 409–18. doi:10.1007/s00253-002-1061-1
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Al, H.E.T., 1996. REGULATION OF PECTINOLYSIS IN *ERWINIA CHRYSANTHEMI*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 213–257.
- Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L., Castro, G.R., 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.* 115, 48–57. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.050
- Ilsen, Z., Kerim, A., 2016. *Multiphase Catalytic Reactors. Theory, Design, Manufacturing, and Applications*. Wiley, New Jersey.
- Ismail, A.-M.S., 1996. Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. *Process Biochem.* 31, 645–650. doi:10.1016/S0032-9592(96)00012-X
- Jacob, N., 2009. Pectinolytic enzymes, in: Nigam, P., Pandey, A. (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer Netherlands, Coleraine, pp. 383–396. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7
- Jacob, N., Asha Poorna, C., Prema, P., 2008a. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresour. Technol.* 99, 6697–701. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.002
- Jacob, N., Asha Poorna, C., Prema, P., 2008b. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresour. Technol.* 99, 6697–6701. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.002
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40, 2931–2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026
- Jayani, R.S., Shukla, S.K., Gupta, R., 2010. Screening of bacterial strains for polygalacturonase activity: its production by *Bacillus sphaericus* (MTCC 7542). *Enzyme Res.* 5.
- Jia, H., Zhu, G., Wang, P., 2003. Catalytic Behaviors of Enzymes Attached to Nanoparticles: The Effect of Particle Mobility. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 406–414. doi:10.1002/bit.10781
- Kapoor, M., Khalil Beg, Q., Bhushan, B., Dadhich, K.S., Hoondal, G.S., 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochem.* 36, 467–473. doi:10.1016/S0032-9592(00)00238-7
- Kapoor, M., Kuhad, R.C., 2002. Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 317–22.
- Kapoor, M., Kuhad, R.C., 2002. Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 317–322. doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01107.x
- Kar, S., Ray, R.C., 2011. Purification, Characterization and Application of Thermostable Exo-Polygalacturonase

- From *Streptomyces Erumpens* Mtcc 7317. *J. Food Biochem.* 35, 133–147. doi:10.1111/j.1745-4514.2010.00372.x
- Kashyap, D.R., Chandra, S., Kaul, A., Tewari, R., 2000. Production , puri[®] cation and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp . DT7 4–9.
- Kobashi, T., Higaki, N., Yajima, N., Suzumatsu, A., Hagihara, H., Kawai, S., Ito, S., 2001. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 842–847.
- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T., Hatada, Y., Ito, S., 1999. Purification and Properties of a Low-molecular-weight , High-alkaline Pectate Lyase from an Alkaliphilic Strain of *Bacillus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 65–72. doi:10.1271/bbb.63.65
- Kohli, P., Gupta, R., 2015. Alkaline pectinases: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 279–285. doi:10.1016/j.bcab.2015.07.001
- Kuhad, R.C., Kapoor, M., Rustagi, R., 2004. Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 257–263. doi:10.1023/B:WIBI.0000023833.15866.45
- Lei, Z., Bi, S., Yang, H., 2007. Chitosan-tethered the silica particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. *Food Chem.* 104, 577–584. doi:10.1016/j.foodchem.2006.12.008
- Li, T., Wang, N., Li, S., Zhao, Q., Guo, M., Zhang, C., 2007. Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Biotechnol. Lett.* 29, 1413–1416. doi:10.1007/s10529-007-9409-3
- Li, Z., Bai, Z., Zhang, B., Li, B., Jin, B., Zhang, M., Lin, F., Zhang, H., 2012. Purification and Characterization of Alkaline Pectin Lyase from a Newly Isolated *Bacillus clausii* and Its Application in Elicitation of Plant Disease Resistance. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 2241–2256. doi:10.1007/s12010-012-9758-9
- Liu, K., Zhao, G., He, B., Chen, L., Huang, L., 2012. Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking. *Bioresour. Technol.* 123, 616–619. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.074
- Marín, F.R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., Pérez-Alvarez, J. a., 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chem.* 100, 736–741. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.040
- Marrazzo, W.N., Merson, R.L., McCoy, B.J., 1975. Enzyme immobilized in a packed-bed reactor: Kinetic parameters and mass transfer effects. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1515–1528. doi:10.1002/bit.260171010
- Martins, E.S., Silva, D., da Silva, R., Leite, R.S.R., Gomes, E., 2007. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 291–9. doi:10.1007/s10482-006-9114-6
- Martins Dos Santos, V.A.P., Leenen, E.J.T.M., Rippoll, M.M., Van Der Sluis, C., Van Vliet, T., Tramper, J., Wijffels, R.H., 1997. Relevance of rheological properties of gel beads for their mechanical stability in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 517–529. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19971205)56:5<517::AID-BIT5>3.0.CO;2-L
- Masoud, W., Jespersen, L., 2006. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 291–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030
- Mei, Y., Chen, Y., Zhai, R., Liu, Y., 2013. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable

- pectinase from *Bacillus halodurans* M29. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 94, 77–81. doi:10.1016/j.molcatb.2013.05.004
- Merín, M.G., Mendoza, L.M., Farías, M.E., Morata de Ambrosini, V.I., 2011. Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 144–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.004
- Mieszczakowska-Frac, M., Markowski, J., Zbrzeźniak, M., Płocharski, W., 2012. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 49, 251–256. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.034
- Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Mohamed, S. a, Farid, N.M., Hossiny, E.N., Bassuiny, R.I., 2006. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *J. Biotechnol.* 127, 54–64. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.06.009
- Mohammed, Z.H., Hember, M.W.N., Richardson, R.K., Morris, E.R., 1998. Kinetic and equilibrium processes in the formation and melting of agarose gels. *Carbohydr. Polym.* 36, 15–26. doi:10.1016/S0144-8617(98)00011-3
- Mørch, Å.A., Donati, I., Strand, B.L., Skja, G., 2006. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules* 1471–1480.
- Nadar, S.S., Pawar, R.G., Rathod, V.K., 2017. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *Int. J. Biol. Macromol.* 101, 931–957. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055
- Naidu, G.S.N., Panda, T., 1998. Production of pectolytic enzymes ± a review. *Bioprocess Eng.* 19, 355–361.
- Nawaz, M.A., Karim, A., Aman, A., Marchetti, R., Qader, S.A.U., Molinaro, A., 2014. Continuous degradation of maltose: improvement in stability and catalytic properties of maltase (α -glucosidase) through immobilization using agar-agar gel as a support. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 631–638. doi:10.1007/s00449-014-1302-6
- Niture, S.K., 2008. Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia (Bratisl.)* 63, 1–19.
- Norziah, M.H., Foo, S.L., Karim, A.A., 2006. Rheological studies on mixtures of agar (*Gracilaria changii*) and kappa-carrageenan. *Food Hydrocoll.* 20, 204–217. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.03.020
- Ogawa, J., Shimizu, S., 1999. Microbial enzymes: New industrial applications from traditional screening methods. *Trends Biotechnol.* 17, 13–21. doi:10.1016/S0167-7799(98)01227-X
- Oliveira, R.Q., Rosa, C. a, Uetanabaro, A.P.T., Azeredo, A., Neto, A.G., Assis, S. a, 2009. Polygalacturonase secreted by yeasts from Brazilian semi-arid environments. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60 Suppl 7, 72–80. doi:10.1080/09637480802534517
- Osswald, T., Rudolph, N., 2014. *Polymer Rheology* 237. doi:10.3139/9781569905234
- Palanivelu, P., 2006. Polygalacturonases: Active site analyses and mechanism of action. *Indian J. Biotechnol.* 5, 148–162.
- Patel, S.K., Rodriguez, F., Cohen, C., 1989. Mechanical and swelling properties of polyacrylamide gel spheres. *Polymer (Guildf.)* 30, 2198–2203. doi:10.1016/0032-3861(89)90249-8
- Pawar, S.N., Edgar, K.J., 2012. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications.

- Biomaterials 33, 3279–3305. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.007
- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E.C., 2009. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *Open Biotechnol. J.* 3, 9–18. doi:10.2174/1874070700903010009
- Pessela, B.C.C., Betancor, L., Lopez-gallego, F., Torres, R., Dellamora-ortiz, G.M., Alonso-morales, N., Fuentes, M., Mateo, C., Fern, R., 2005. Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength 37, 295–299. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.04.021
- Pierce Biotechnology, 2005. Protein stability and storage.
- Raj Kashyap, D., Kumar Soni, S., Tewari, R., 2003. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. *Bioresour. Technol.* 88, 251–254. doi:10.1016/S0960-8524(02)00206-7
- Ramírez-Tapias, Y.A., Rivero, C.W., Britos, C.N., Trelles, J. a., 2015. Alkaline and thermostable polygalacturonase from *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 with applications in waste waters. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1–8. doi:10.1016/j.bcab.2014.12.004
- Ramírez-Tapias, Y.A., Rivero, C.W., Gallego, F.L., Guisán, J.M., Trelles, J.A., 2016. Stabilization by multipoint covalent attachment of a biocatalyst with polygalacturonase activity used for juice clarification. *Food Chem.* 208, 252–257. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.086
- Rehman, H.U., Aman, A., Nawaz, M.A., Qader, S.A.U., 2015. Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. *Food Hydrocoll.* 43, 819–824. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.08.018
- Rehman, H.U., Aman, A., Zohra, R.R., Qader, S.A.U., 2014a. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. *Carbohydr. Polym.* 102, 622–626. doi:10.1016/j.carbpol.2013.11.073
- Rehman, H.U., Nawaz, M.A., Aman, A., Baloch, A.H., Qader, S.A.U., 2014b. Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 on chitosan beads for continuous degradation of pectin polymers. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 282–287. doi:10.1016/j.bcab.2014.09.003
- Rehman, H.U., Qader, S.A.U., Aman, A., 2012. Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydr. Polym.* 90, 387–391. doi:10.1016/j.carbpol.2012.05.055
- Reverchon, S., Nasser, W., Condemine, G., *Microorganismes*, L.D.G.M., 1996. Regulation of pectinase biosynthesis in *Erwinia chrysanthemi* i , i, in: Visser, J Voragen, A.G. (Ed.), *Pectins and Pectinases*. pp. 311–330.
- Rijssel, M. Van, Gerwig, G.J., Hansen, T. a, 1993. Isolation and characterization of an extracellular glycosylated protein complex from *Clostridium thermosaccharolyticum* with pectin methylesterase and polygalacturonate Isolation and Characterization of an Extracellular Glycosylated Protein Complex from CI 59, 828–836.
- Rivero, C.W., Britos, C.N., Lozano, M.E., Sinisterra, J. V., Trelles, J.A., 2012. Green biosynthesis of floxuridine by immobilized microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 331, 31–36. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02547.x
- Robyt, J.F., 2000. Thin-Layer (Planar) Chromatography, in: *Carbohydrates Chromatography*. Academic Press, Ames, IA, USA, pp. 2235–2244.

- Rombotus, F., Pilnik, W., 1980. Pectic enzymes. *Microbial Enzym. bioconversions* 5, 227–282.
- Roosdiana, A., Prasetyawan, S., Mahdi, C., Sutrisno, 2013. Production and Characterization of *Bacillus firmus* Pectinase. *J. pure Appl. Chem. Res.* 2, 35–41.
- Sanchez, S., Demain, A.L., 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 895–906. doi:10.1016/S0141-0229(02)00172-2
- Sandri, I.G., Fontana, R.C., Barfknecht, D.M., da Silveira, M.M., 2011. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 2217–2222. doi:10.1016/j.lwt.2011.02.008
- Sattar, A., Aqeel, M., Chisti, Y., Khushk, I., Umar, M., Bano, S., 2012. Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in a date syrup medium. *African J. Biotechnol.* 11, 12563–12570. doi:10.5897/AJB11.4236
- Sharma, D.C., Satyanarayana, T., 2006a. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresour. Technol.* 97, 727–733. doi:10.1016/j.biortech.2005.04.012
- Sharma, D.C., Satyanarayana, T., 2006b. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresour. Technol.* 97, 727–33. doi:10.1016/j.biortech.2005.04.012
- Sheldon, R., van Pelt, S., 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev* 6223–6235. doi:10.1039/c3cs60075k
- Soares, M.M.C.N., Silva, R. Da, Gomes, E., 1999. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Rev. Microbiol.* 30, 299–303. doi:10.1590/S0001-37141999000400002
- Stone, B.A., Svensson, B., Collins, M.E., Rastall, R.A., 2008. Polysaccharide Degradation.
- Stülke, J., Hillen, W., 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 195–201.
- Talbert, J.N., Goddard, J.M., 2012. Enzymes on material surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 93, 8–19. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.003
- Tapre, A.R., Jain, R.K., 2014. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *Int. Food Res. J.* 21, 447–453.
- Tufvesson, P., Fu, W., Jensen, J.S., Woodley, J.M., 2010. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* 88, 3–11. doi:10.1016/j.fbp.2010.01.003
- Wang, F., Su, R.-X., Qi, W., Zhang, M.-J., He, Z.-M., 2009. Preparation and Activity of Bubbling-Immobilized Cellobiase Within Chitosan-Alginate Composite. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 40, 57–64. doi:10.1080/10826060903392939
- Wittgren, B., Wahlund, K.G., 1997. Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation-multiangle light scattering. *J. Chromatogr. A* 760, 205–218. doi:10.1016/S0021-9673(96)00777-7
- Wu, R., He, B., Zhao, G., Li, X., 2014. Immobilization of pectinase on polyethyleneimine-coated pulp fiber for treatment of whitewater from papermaking. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* 99, 163–168. doi:10.1016/j.molcatb.2013.11.007
- Yapo, B.M., 2011. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. *Carbohydr. Polym.* 86, 373–385. doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.065

- Yuan, P., Meng, K., Shi, P., Luo, H., Huang, H., Tu, T., Yang, P., Yao, B., 2012. An alkaline-active and alkali-stable pectate lyase from *Streptomyces* sp. S27 with potential in textile industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 909–915. doi:10.1007/s10295-012-1085-1
- Zhai, C., Cao, J., Wang, Y., 2003. Cloning and expression of a pectate lyase gene from *Bacillus alcalophilus* NTT33. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 173–178. doi:10.1016/S0141-0229(03)00091-7
- Zhang, C., Xing, X., 2011. 2.23 - Enzyme Bioreactors, Second Edi. ed, *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00099-4
- Zhang, C., Yao, J., Zhou, C., Mao, L., Zhang, G., Ma, Y., 2013. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. *BMC Biotechnol.* 13, 13–26. doi:10.1186/1472-6750-13-26