

**INMOVILIZACION DE LEVADURAS CON ACTIVIDAD  
 $\beta$ -GALACTOSIDASA.  
OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UN  
BIOCATALIZADOR CELULAR (*Kluyveromyces lactis*)**

María Victoria FLORES

Tesis presentada para optar al grado de  
DOCTOR EN INGENIERIA

Departamento de Ingeniería Química  
Facultad de Ingeniería U.N.L.P.  
Septiembre 1994.

## **Reconocimientos**

A mis Directores de Trabajo, Dres. Rodolfo J. J. Ertola y Claudio E. Voget.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata, por la autorización y el apoyo en la realización de este Trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por permitir el uso del equipamiento y demás facilidades para la realización de las tareas experimentales en los laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata, y a su Departamento de Post-Grado, por la constante disposición y apoyo.

## Agradecimientos

Al Dr. Rodolfo J. J. Ertola, por su permanente estímulo e interés en el éxito de mi Trabajo de Tesis.

Al Dr. Claudio E. Voget, por el entusiasmo contagioso. De quien adquirí el rigor en el trabajo experimental y en la discusión exhaustiva de los resultados.

A la Lic. Mirta Faloci, por su invaluable apoyo técnico, y a Rubén Oltolina, por la colaboración en la ejecución de los ensayos de hidrólisis.

Al Dr. Carlos Mignone, cuyas discusiones y comentarios fueron un estímulo para el desarrollo de las simulaciones.

Al Dr. Julio Borrajo y a la Ing. Mercedes Ruzzo, por el estímulo y aliento permanente.

A Claudio Avignone Rossa por compartir la alegría de los pequeños logros y suavizar con optimismo los momentos difíciles.

Al grupo del Laboratorio de Investigación en Proteínas Vegetales, por haberme facilitado desinteresadamente el material empleado en las cromatografías.

Al grupo del Centro de Investigaciones del Medio Ambiente por los prestamos desinteresados.

Al Dr. Luis Bruno Blanch de la Cátedra de Farmacoquímica, por la excelente disposición a colaborar.

Al personal del CINDEFI.

A mis compañeros de la Cátedra de Ingeniería de Procesos II.

A mis hermanos y a Gustavo por el apoyo y la paciencia.

A la sociedad toda, por que sin su esfuerzo esta Tesis no hubiera sido posible.

*A mis padres*

# INDICE

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

1.1. BIOCATALIZADORES: GENERALIDADES	2
1.2. LA ENZIMA LACTASA	7
1.3. PROPIEDADES DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE <i>K. lactis</i>	12
1.4. CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS DE LEVADURA	15
1.4.1. Aspectos generales	15
1.4.2. Composición y estructura	16
1.4.3. El sistema autolítico	21
1.5. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS	24

## CAPITULO 2

### TRATAMIENTOS DE PERMEABILIZACION

2.1. INTRODUCCION	28
2.2. MATERIALES Y METODOS	29
2.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo	29
2.2.2. Cosecha y determinación de biomasa	29
2.2.3. Reactivos y soluciones	30
2.2.4. Permeabilización de las células	30
2.2.5. Obtención de un homogeneizado celular	31
2.2.6. Determinaciones analíticas	31
2.2.6.1. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa	31
2.2.6.2. Determinación de la actividad invertasa	32
2.2.6.3. Medida de la liberación de compuestos citoplasmáticos	32
2.2.6.4. Viabilidad celular	32

2.3. RESULTADOS	34
2.3.1. Estudios con cloroformo y tolueno	34
2.3.2. Estudios con etanol	41
2.3.3. Efecto del tratamiento de permeabilización sobre la viabilidad celular	43

2.4. DISCUSION	45
----------------	----

### **CAPITULO 3**

## **ESTABILIZACION DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN CELULAS PERMEABILIZADAS MEDIANTE TRATAMIENTO CON GLUTARALDEHIDO**

3.1. INTRODUCCION	49
3.2. MATERIALES Y METODOS	54
3.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo	54
3.2.2. Reactivos y soluciones	55
3.2.3. Permeabilización y tratamiento con glutaraldehído	56
3.2.4. Determinaciones analíticas	56
3.3. RESULTADOS	58
3.3.1. Estabilidad de $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas	58
3.3.2. Efecto de las condiciones de tratamiento con glutaraldehído en la estabilización de la actividad $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas	60
3.3.2.1. Efecto de la temperatura	60
3.3.2.2. Efecto de la concentración de glutaraldehído	65
3.3.2.3. Efecto de la concentración celular en el tratamiento con glutaraldehído	70
3.3.2.4. Estabilidad de las células tratadas en almacenamiento	71
3.4. DISCUSION.	72

## CAPITULO 4

### ESTUDIO SOBRE EL EFECTO ESTABILIZANTE DEL GLUTARALDEHIDO

4.1. INTRODUCCION	77
4.2. MATERIALES Y METODOS	78
4.2.1. Microorganismo	78
4.2.2. Reactivos y soluciones	78
4.2.3. Permeabilización celular y tratamiento con glutaraldehído	78
4.2.4. Obtención de extractos libres de células	79
4.2.5. Determinación de actividades enzimáticas	79
4.2.5.1. Determinación de la actividad $\beta$ -gal e invertasa	79
4.2.5.2. Determinación de actividad Proteinasa A (PrA)	80
4.2.5.3. Determinación de actividad Proteinasa B (PrB)	80
4.2.5.4. Determinación de actividad Carboxipeptidasa Y	80
4.2.5.5. Determinación de actividad Aminopeptidasa (Ap)	81
4.2.5.6. Determinación de actividad fumarato hidratasa	81
4.2.6. Autólisis de células de <i>K. lactis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	81
4.2.7. Hidrólisis de la pared celular mediante enzimas líticas	82
4.2.8. Otras determinaciones analíticas	82
4.2.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	82
4.2.10. Microscopías electrónicas	83
4.2.11. Cromatografía de tamiz molecular	83
4.3. RESULTADOS	84
4.3.1. Liberación de diversas actividades enzimáticas de células permeabilizadas	84
4.3.2. Efecto del tratamiento de permeabilización y estabilización con glutaraldehído en el proceso autolítico	86
4.3.3. Efecto de la integridad de la pared en la solubilización de $\beta$ -galactosidasa	94
4.3.4. Relación entre la integridad celular durante el tratamiento con GA y el efecto de insolubilización	101
4.3.5. Susceptibilidad de las células estabilizadas a los esfuerzos de corte	105
4.3.6. Susceptibilidad de las estructura estabilizada a la degradación proteolítica externa	108
4.4. DISCUSION	111

## **CAPITULO 5**

### **PROPIEDADES DEL BIOCATALIZADOR**

5.1. INTRODUCCION	116
5.2. MATERIALES Y METODOS	117
5.2.1. Reactivos y soluciones	117
5.2.2. Fuentes de enzima utilizadas	117
5.2.3. Ensayos de actividad	118
5.2.4. Cinéticas de hidrólisis en lactosa	119
5.2.4.1. Ensayos de hidrólisis	119
5.2.4.2. Determinación de los productos de hidrólisis	119
5.2.4.3. Determinación de la conversión	119
5.2.5. Estudios de estabilidad	120
5.3. RESULTADOS	121
5.3.1. Estudios de estabilidad	121
5.3.1.1. Efecto de la temperatura	121
5.3.1.2. Efecto del pH	124
5.3.1.3. Efecto del entorno iónico	126
5.3.2. Estudios de actividad	127
5.3.2.1. Parámetros cinéticos para la hidrólisis de lactosa (V <sub>max</sub> , K <sub>m</sub> ). Efecto de la temperatura	127
5.3.2.2. Efecto del entorno iónico	128
5.3.2.3. Efecto del pH sobre la actividad	129
5.3.3. Cinéticas de hidrólisis en lactosa	131
5.3.4. Distribución de productos de hidrólisis	133
5.3.5. Reutilización del preparado celular	133
5.4. DISCUSION	138



## **CAPITULO 6**

### **MODELO PARA LA HIDROLISIS DE LACTOSA: Influencia del entorno iónico**

<b>6.1. CONSIDERACIONES PRELIMINARES</b>	<b>143</b>
6.1.1. Modelos de hidrólisis de lactosa	143
<b>6.2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>146</b>
6.2.1. Reactivos y soluciones	146
6.2.2. Fuentes de enzima utilizadas	146
6.2.3. Ensayos de actividad	146
6.2.4. Ensayos de hidrólisis y determinación de la conversión	146
6.2.5. Evaluación de parámetros cinéticos y uso de simuladores	147
<b>6.3. RESULTADOS</b>	<b>148</b>
6.3.1. Selección de un modelo de hidrólisis	148
6.3.2. Efecto de los cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ ) en la cinética de hidrólisis de lactosa	156
6.3.3. Comprobación experimental del modelo	160
6.3.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos	160
6.3.3.2. Determinación de la velocidad inicial de hidrólisis en mezclas $\text{Na}^+/\text{K}^+$	162
6.3.3.3. Determinación de la conversión	164
6.3.3.4. Predicción de la hidrólisis en leche	164

## **CAPITULO 7**

### **CONCLUSIONES GENERALES**

<b>7.1. CONCLUSIONES</b>	<b>168</b>
--------------------------	------------

### **REFERENCIAS**

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>171</b>
-----------------------------------	------------

---

**CAPITULO 1**

**INTRODUCCION**

## 1.1. BIOCATALIZADORES: GENERALIDADES

A diferencia de los catalizadores químicos comunes, las enzimas presentan la característica de catalizar reacciones en medios acuosos bajo condiciones moderadas de pH, fuerza iónica, a presión y temperaturas normales, y con una muy alta especificidad por el sustrato. Sin embargo, aunque las enzimas son catalizadores efectivos y eficientes, no siempre son ideales para aplicaciones prácticas. En general son inestables, pueden usarse en forma moderada en presencia de solventes orgánicos, y la mayoría son termolábiles y difíciles de recuperar de las mezclas de reacción para su reutilización.

Para eliminar en parte estas desventajas, así como para obtener mejores catalizadores, es posible intentar la "modificación" de las enzimas: una alternativa para este propósito es la inmovilización.

De acuerdo a la First Enzyme Engineering Conference, 1971 se puede definir como **enzima inmovilizada** a aquellas "enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica, y con la posibilidad de ser usada de modo continuo y repetidas veces" (Klein y Wagner, 1983). Por extensión este concepto puede emplearse también para microorganismos o células inmovilizadas.

En todo proceso industrial la decisión entre la aplicación de un biocatalizador libre o uno inmovilizado se basa en la relación entre el costo del sistema inmovilizado y el beneficio del proceso enzimático. En general se puede decir que un sistema inmovilizado presenta las siguientes ventajas :

- La estabilidad del biocatalizador se incrementa.
- Las enzimas pueden ser reutilizadas.
- Las operaciones de sistemas en forma continua se ven facilitadas.
- Las reacciones requieren menores volúmenes de operación.
- Pueden obtenerse productos con alta pureza, facilitándose así las operaciones de purificación.

La inmovilización de enzimas es también la base del desarrollo de biosensores, los que constituyen un prolífico campo en el análisis bioquímico.

La inmovilización no es solamente un procedimiento artificial ya que los *films* bacterianos, producidos como consecuencia de la adherencia y crecimiento de bacterias sobre soportes sólidos, son muy comunes en la naturaleza. El primer antecedente de uso de estos *films* bacterianos como biocatalizador data del siglo XVII, en el proceso de producción de vinagre. Este se llevaba a cabo poniendo en contacto una solución de nutrientes y aire con *Acetobacter* soportado sobre madera, cerámica, piedra pómez o carbón.

Con el desarrollo de la microbiología y la química biológica, aparecen los primeros estudios científicos sobre la inmovilización de enzimas. Los primeros trabajos experimentales, relacionados con la inmovilización de enzimas por adsorción en soportes sólidos inertes, datan de principios de este siglo. En 1908, Michaelis y Ehrenreich estudiaron la adsorción de una variedad de enzimas sobre diversos sólidos adsorbentes. En 1916, Nelson y Griffin demostraron que la invertasa de levadura adsorbida sobre carbón presentaba la misma actividad que la enzima nativa. En 1920, estudios sobre adsorción de proteínas, enfocados hacia la purificación de enzimas, ayudaron a esclarecer el mecanismo físico y químico de la adsorción.

El período comprendido entre 1930 y 1960 se caracterizó por el desarrollo de trabajos sobre aplicaciones particulares de métodos de inmovilización, y por el desarrollo y empleo de polímeros sintéticos y naturales para tal fin. En 1960, Katchalsky-Katzir y sus colaboradores llevaron a cabo estudios sobre técnicas de inmovilización y sobre las propiedades físicas y químicas de las enzimas inmovilizadas

Así a fines de la década del 60, se logra llevar a escala industrial procesos con aminoacilasa inmovilizada (desarrollado por el grupo de Chibata para Tanabe Seiyaku Co. Ltd., Japón), con penicilina G acilasa (Lilly y colaboradores, del University College of London, para Beechman Pharmaceuticals, Inglaterra), y con glucosa isomerasa (Nabisco Brands de Estados Unidos con tecnología del grupo Takasaki del Fermentation Research Institute, Chiba City, Japon). De los procesos antes mencionados, quizás el de mayor impacto económico y comercial es el destinado a obtener jarabes edulcorantes con alto contenido de fructosa.

De modo simultáneo a la investigación sobre inmovilización de enzimas, comienza a desarrollarse, en la década de los años sesenta, la inmovilización de células enteras. Esto constituye en la actualidad un área de intensa investigación y

desarrollo (Hocknull y Lilly, 1990; Hooijmans y col., 1990; Constantinides y Mehta, 1991; Fursaki y Seki, 1992).

De acuerdo al estado del biocatalizador usado, la inmovilización celular puede dividirse en dos grandes áreas: una que comprende el empleo de células viables, incluyendo células en estado latente o de crecimiento muy limitado (*resting cell systems*), destinadas, por ejemplo, a la obtención de metabolitos primarios (etanol, glicerol, ácido cítrico, aminoácidos), metabolitos secundarios (alcaloides y antibióticos), o bien a simples biotransformaciones (conversión de esteroides, modificación de antibióticos lactámicos, producción de ácidos orgánicos). En todos estos casos se aprovecha la capacidad multienzimática de las células, incluyendo su aptitud para reciclar cofactores, lo que es casi imposible en sistemas con enzimas purificadas (Chen y col., 1990; Galazzo y Bailey, 1990; Chun y col., 1991; Yabannavar y Wang, 1991).

Dentro de esta área están también las aplicaciones de sistemas relacionados con el tratamiento de diversos tipos de efluentes. Así, se destacan el uso de microorganismos inmovilizados en la degradación de contaminantes solubles, como fenoles, compuestos clorados, y otros compuestos aromáticos, y de contaminantes gaseosos, tales como sulfuros (Moersen y Rehm, 1976; Beunink y Rehm, 1990). Debe resaltarse que las células inmovilizadas suelen presentar dos propiedades importantes que las hacen más aptas que las células libres para su uso en tratamiento de efluentes: son menos sensibles a compuestos tóxicos y presentan mayor estabilidad operacional.

La otra área se refiere al uso de células inmovilizadas en aquellas aplicaciones donde no es indispensable la viabilidad. Existen procesos donde es necesario destruir la viabilidad celular mediante el uso de tratamientos químicos o físicos. Estos tratamientos están destinados a facilitar el acceso de sustratos, mejorar la estabilidad del catalizador, etcétera.

En general las células no viables que serán empleadas como biocatalizador suelen ser sometidas a diversos tratamientos para estabilizar la estructura celular y fijar la enzima a la misma. Estas, pueden luego aglomerarse o ser inmovilizadas por algún método tradicional, ya sea adsorción sobre soportes sólidos o entrapamiento en geles, entre otros. Los procesos de inactivación/estabilización e inmovilización no tienen que seguir necesariamente dicho orden, y existen variantes de acuerdo al sistema empleado.

El uso de células no viables se realiza principalmente cuando las reacciones enzimáticas de interés proceden en una sola etapa. Su versatilidad hace que sea de elección frente a la inmovilización de la enzima extraída de la misma célula.

En general, puede decirse que el método de inmovilización de células no viables es ventajoso en los siguientes casos:

- Cuando la enzima es intracelular.
- Cuando la enzima extraída de la célula es inestable durante o después del tratamiento de inmovilización.
- Cuando otros compuestos presentes en la célula no inactivan la enzima.
- Cuando los sustratos y productos no son de alto peso molecular.

Los beneficios que ofrece el uso de un sistema de células inmovilizadas pueden resumirse en los siguientes puntos:

- No es necesario realizar procesos de separación y purificación de la enzima.
- Los sistemas tienen generalmente alta estabilidad operacional.
- Tienen bajo costo de preparación.

En 1974 se puso en marcha el primer proceso industrial que hizo uso de células enteras inmovilizadas para reacciones en una sola etapa: la conversión de ácido fumárico en ácido L-aspártico con células de *E. coli* inmovilizadas (Chibata y col., 1974). A este proceso le sucedieron otros tales como la producción de ácido L-málico usando *Brevibacterium ammoniagenes* (industrializado en 1974), la producción de ácido 6-aminopenicilánico y la producción de glutatión, entre otros.

Numerosos procesos en la actualidad hacen uso de tecnologías tanto de enzimas como de células inmovilizadas. En la Tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de aplicaciones industriales, junto con los métodos de preparación del biocatalizador.

**Tabla 1.1. Procesos industriales con células y enzimas inmovilizadas.**

Enzimas	Producción anual de los principales productores (ton)	Aplicación	Métodos de Inmovilización
- Glucosa isomerasa	1500 - 1700	Jarabes de alta fructosa	Células de <i>A. missouriensis</i> mezcladas con gelatina y ligadas con GA* (Gist Brocades, NL). Homogeneizado celular ( <i>B. coagulans</i> ) ligado con GA. (Novo Ind., DK)
- Amiloglucosidasa	1	Sacarificación de dextrinas	Homogeneizados celulares ligados con GA. (Novo Ind., DK)
- Penicilina G acilasa	3 - 4	Ácido 6-aminopenicilánico	Enzima de <i>B. megaterium</i> covalentemente unida a fibras de poliacrilonitrilo activadas con GA. (Toyo Jozo, Japón)
- Aminoacilasa	5	L-aminoácidos	Aminoacilasa soluble en reactores de membrana. (Degussa, Japón)
- Amiloglucosidasa glucoamilasa	< 1	Glucosa	Enzima de <i>A. niger</i> adsorbida en C activado granulado. (Tate and Lyle, U.K.)
- Nitrilasa	0.1	Acrilamida	Enzima de <i>Corynebacterium</i> inmovilizada en geles de acrilamida catiónica. (Nitto, Japón)

\* GA: glutaraldehído.

## 1.2. LA ENZIMA LACTASA

La enzima lactasa ( $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa E.C. 3.2.1.23) es ampliamente usada en la industria de alimentos. La reacción principal catalizada por esta enzima es la hidrólisis del disacárido lactosa para dar glucosa y galactosa. Desde el punto de vista de su aplicación en la industria de alimentos, el producto obtenido presenta dos propiedades de interés: mayor solubilidad que la lactosa (las solubilidades a 25°C son: lactosa, 17 g/100 ml, glucosa 154 g/100 ml, y galactosa 68.3 g/100 ml) y mayor poder edulcorante (tomando a sacarosa como 100, el poder edulcorante de lactosa es 40 y el de la mezcla glucosa-galactosa 60).

La hidrólisis de lactosa es empleada principalmente en:

- a. Obtención de productos lácteos con bajo contenido de lactosa, destinados a individuos que muestran intolerancia a ese disacárido.
- b. Obtención de nuevos productos lácteos y mejoramiento de los ya existentes (elaboración de yoghurts, quesos, dulce de leche, etc.).
- c. Valoración de subproductos de la industria quesera, como sueros y permeados. La hidrólisis permite el reciclado de estos subproductos como jarabes edulcorantes, o bien su uso como sustratos para otros procesos microbianos. Los jarabes obtenidos pueden ser usados en reemplazo de la sacarosa. Por ejemplo, Valio Process (Finlandia) obtiene un jarabe que contiene (%): glucosa, 10; galactosa, 20; lactosa, 10; proteínas, 10, y bajo contenido en sales, que fue usado en la fabricación de helados. Estos jarabes también pueden ser usados como fuente de carbono en procesos fermentativos; Nutriscarch (Estados Unidos) emplea el suero hidrolizado para la producción de levadura de panificación.

Si se tienen en cuenta las grandes cantidades de sueros y permeados que son descartados, el aprovechamiento de estos subproductos tiene a su vez un enorme impacto ambiental. La producción mundial anual de suero proveniente de la industria láctea en 1974 fue de  $70 \times 10^6$  toneladas, de las cuales sólo el 56% de los sólidos se utilizó para alimentación humana y animal (Kosaric y Asher, 1985). En la Argentina la producción de suero y permeado se estima en 3 000 y 100 ton/día, respectivamente.



Las fuentes de lactasa ( $\beta$ -gal) son variadas. El primer informe acerca de células de levaduras capaces de hidrolizar lactosa a monosacáridos fue realizado por Beijerinck en 1889 (Rouwenhorst y col., 1989). Aunque la enzima fue luego aislada de una amplia variedad de organismos, tales como plantas, tejidos animales y microorganismos, la obtención para uso industrial se realiza a partir de microorganismos considerados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Así, las lactasas provenientes de *Aspergillus niger* y *A. oryzae* y las de *Kluyveromyces lactis* y *K. fragilis* son consideradas seguras debido a que han sido empleadas durante mucho tiempo en la industria alimenticia, habiendo sido sometidas a numerosos ensayos. En cambio la lactasa de *Escherichia coli* no puede ser aplicada en la industria alimentaria debido a los problemas de toxicidad que presentan los extractos crudos.

---

**Tabla 1.2.** Preparados comerciales de lactasa.

---

---

***Aspergillus niger***

Baxter Laboratories, Chicago, USA  
Dairland Food Labs, Waukesha, USA  
Kyowa Hakko Kogyo Co. Japón  
Société Rapidase, Seclin, Francia

***Kluyveromyces lactis***

Gist Brocades, Holanda ("Maxilact")  
Nutritional Biochemicals Co., USA  
Tokyo Tanabe Co., Japón

***Kluyveromyces fragilis***

Kyowa Hakko Kogyo Co., Japón  
Sigma Chemicals Co., USA  
Novo A/S, Dinamarca ("Lactozym")

***Escherichia coli***

CF Boehringer Mannheim, Germany  
Worthington Biochemical Corp., USA

---

Como es ampliamente conocido, las propiedades de las enzimas (temperatura óptima, pH, estabilidad, etc.) dependen tanto de su fuente de origen como de la preparación. Así, las lactasas provenientes de levaduras tienen un pH óptimo en el rango neutro (6 - 7). En cambio, las de origen fúngico tienen un rango óptimo en la zona ácida (2.5 - 4.5). En la Tabla 1.2 se presenta una lista de preparados comerciales con la enzima libre, provenientes de diferentes orígenes, y en la Tabla 1.3 las tecnologías descritas sobre la inmovilización de la enzima y sus aplicaciones. La mayor información disponible acerca de la inmovilización de lactasa está referida a la enzima fúngica, la cual ha sido inmovilizada sobre numerosos soportes. Se han descrito al menos dos procesos industriales con la enzima de *A. niger* (Tabla 1.3). La enzima fúngica es aplicada principalmente en la hidrólisis de sueros ácidos clarificados. La mayor ventaja es su estabilidad térmica, lo que posibilita la operación de los reactores a temperaturas cercanas a 50 °C, y dado que el pH óptimo de estas enzimas es 3.5, la posibilidad de contaminación se ve marcadamente reducida. La situación es diferente con la lactasa de levadura, ya que presentan una baja estabilidad térmica. Esta condición, sumada al hecho de que la enzima presenta un pH óptimo cercano al neutro, plantea el inconveniente de tener que realizar las reacciones de hidrólisis en condiciones que favorecen la posibilidad de contaminación. Esto limita el tiempo del proceso. Sin embargo, la enzima presenta alta actividad a 5 °C, y en la práctica industrial es común realizar el proceso de hidrólisis a esta temperatura.

La tecnología más simple para la hidrólisis de lactosa se basa en el uso de la enzima purificada, que se emplea por única vez (proceso batch). El costo restringe, sin embargo, el uso masivo de la enzima soluble. Esto es particularmente crítico para el aprovechamiento de grandes volúmenes de suero y permeado. Si bien la enzima libre puede ser reutilizada, empleándose en procesos continuos con reactores de membrana, la inmovilización permite utilizar configuraciones de reactores mas versátiles, como los de lecho fijo o fluidizado. Esto es aplicable tanto a la enzima de levadura como a la de origen fúngico.

Si bien la inmovilización de la enzima ha sido ampliamente estudiada, y existen varios procesos industriales que hacen uso de lactasa fúngica, sólo se menciona en bibliografía un proceso industrial que utiliza lactasa de *K. lactis*, en el cual la enzima se encuentra entrampada en fibras de acetato de celulosa (Tabla 1.3).

---

**Tabla 1.3. Tecnologías de lactasa inmovilizada**

---

Origen de la tecnología	Sistema de inmovilización y su aplicación	Escala de aplicación
Snam Progetti	Lactasa de <i>K. lactis</i> inmovilizada en triacetato de celulosa. Hidrólisis de leche. Proceso batch.	Industrial Centrale Latteria di Milano (Italia)
Corning Glass	Lactasa de <i>A. niger</i> enlazada a sílica. Hidrólisis de suero. Lecho fijo.	Semi industrial UNL Condi (Francia) Dairy Crest (UK) Kroger (USA)
Connecticut/Lehigh Universities	Lactasa de <i>A. niger</i> adsorbida a alúmina. Hidrólisis de suero. Lecho fluidizado.	Planta piloto (USA)
Valio Laboratory	Lactasa de <i>A. niger</i> adsorbida en resinas de fenol-formaldehído. Hidrólisis de suero.	Industrial Keymenlaakso Dairy (Finlandia)
Gist-Brocades	Lactasa de <i>K. fragilis</i> . Hidrólisis de leche. Reactor de membrana.	Planta piloto (Holanda)
Röhm GmbH	Lactasa de <i>A. oryzae</i> enlace covalente al soporte. Procesamiento de leche y suero.	Planta piloto (Alemania)
Sumitomo	Lactasa de <i>A. oryzae</i> unida a resinas de intercambio iónico. Hidrólisis de suero y leche.	Planta piloto (Japón)
Checoslovaquia	Lactasa en células enteras de <i>K. lactis</i> y <i>E. coli</i> permeabilizadas	Planta piloto (Checoslovaquia)
Amerace Corp.	Lactasa de <i>A. oryzae</i> unida a sílica. Hidrólisis de suero.	Planta piloto (USA)

---

Esta tecnología ha sido aplicada también a otras enzimas de interés industrial, pero los detalles de su preparación no han sido publicados.

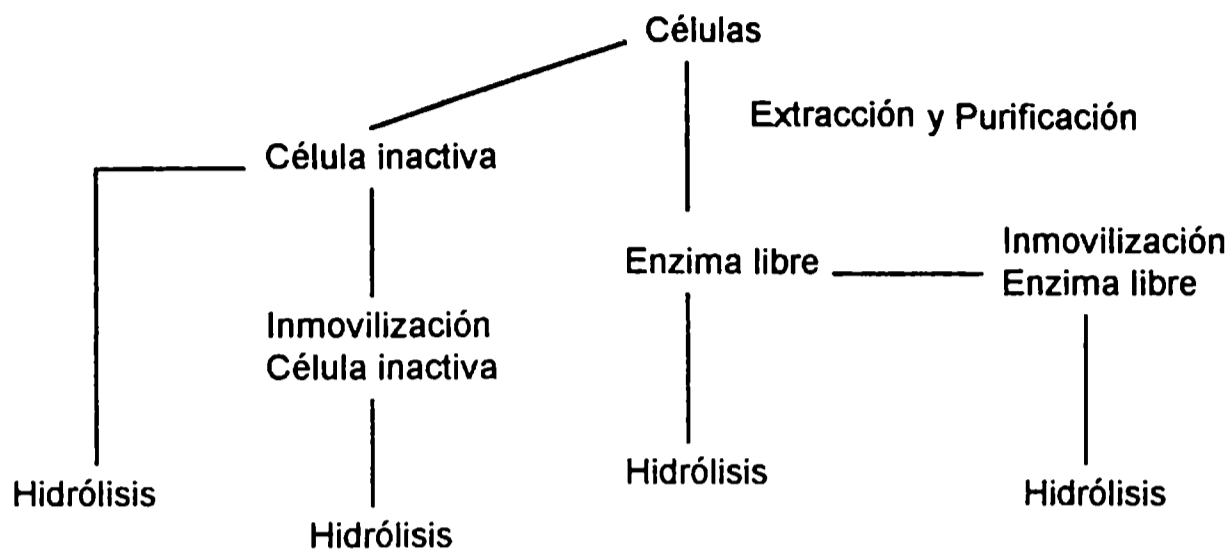
Otra alternativa para reducir los costos de hidrólisis es el empleo de productos basados en células enteras no viables para uso por única vez. Las células generalmente se inactivan mediante tratamientos de permeabilización, y se pueden deshidratar para su conservación (Chen y col., 1985; Irvine y Hill, 1985; Brodsky y GrootWassink, 1986).

La reacción de hidrólisis con la  $\beta$ -gal de levadura es un caso típico donde el sistema de inmovilización de células no viables puede competir con el de la enzima purificada. En relación a esta posibilidad se han descrito diferentes sistemas de inmovilización que emplean células no viables estabilizadas generalmente con reactivos de entrecruzamiento. Los métodos empleados son inmovilización de células no viables de levadura entrampadas en geles de alginato (Decleire y col., 1985b), en espumas de poliuretano (Vlach y col., 1984), o bien adsorbidas a soportes sólidos (Champluvier y col., 1988a; 1989), también se ha descrito el uso de células no inactivadas de *S. anemensis* entrampadas en agar (Banerjee y col., 1982). En la Tabla 1.3. se menciona un proceso con células de *K. lactis* y *E. coli* permeabilizadas y ligadas. El proceso se usa a escala piloto y no se mencionan detalles acerca del procedimiento empleado para la estabilización (Vojtíšek, 1989).

Hasta el momento no ha sido descrito ningún proceso industrial para la hidrólisis de leche o subproductos que haga uso de células de levadura inmovilizadas con actividad  $\beta$ -gal. A pesar de ello, es evidente que un sistema de este tipo constituye una alternativa interesante para la hidrólisis de subproductos neutros.

En la Figura 1.1 se presenta un esquema de las diferentes alternativas de preparaciones enzimáticas que pueden usarse para la hidrólisis enzimática de lactosa.

**Figura 1.1. Alternativas para la hidrólisis enzimática de lactosa**



Este trabajo de Tesis está dirigido a la obtención y caracterización de un biocatalizador con actividad  $\beta$ -galactosidasa, basado en células enteras de levaduras (*K. lactis*), por lo que las secciones siguientes sólo se referirán a la lactasa de este origen.

### 1.3. PROPIEDADES DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *K. lactis*

La  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* ha sido aislada y purificada de la cepa NRRL 1140 por Dickson y col. (1979). Es una proteína globular compuesta por dos subunidades idénticas, de peso molecular  $135 \pm 10\%$  kDa. La actividad específica de la enzima pura, determinada en las condiciones descritas por Dickson, es 139 U/mg de proteína, medida con el sustrato *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (ONPG). La enzima tiene un pH óptimo entre 6.0 y 7.0 (ONPG) y es inactivada a alta velocidad a temperaturas mayores que 40 °C.

La enzima requiere un catión monovalente (sodio o potasio) para tener máxima actividad, cuando se usa ONPG como sustrato (Dickson y col., 1979). Otros trabajos realizados con la lactasa de *K. fragilis* demuestran que la

dependencia de la velocidad de reacción con los cationes monovalente depende del sustrato usado. Con un sustrato artificial como ONPG la velocidad máxima de hidrólisis es similar en presencia de sodio o potasio, pero con el sustrato natural (lactosa) la velocidad de hidrólisis es menor en presencia de sodio que en potasio. Mas aún en presencia de potasio el sodio inhibe la actividad (Mahoney y Whitaker, 1977; Mahoney y Adamchuck, 1980). Este comportamiento fue observado también con la enzima de *K. lactis* (Voget y col., 1994). Este comportamiento muestra claramente que los resultados obtenidos usando sustratos artificiales para evaluar las propiedades del catalizador son difícilmente extrapolables a situaciones reales de proceso, en las cuales es hidrolizado el sustrato natural.

Dickson y col., (1979) estudiaron también el efecto de cationes divalentes sobre la actividad con ONPG. La actividad es estimulada por cationes tales como  $Mn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ . El catión  $Mn^{+2}$ , en concentraciones de 0.1 a 1 mM, provoca la máxima actividad. Sin embargo, concentraciones mayores (10 mM) causan la inhibición de la enzima. El  $Mg^{+2}$  en concentraciones entre 0.1 y 1 mM permiten obtener sólo un tercio de la actividad máxima. Sin embargo, en presencia de un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol o ditiotretitol) e iguales concentraciones de magnesio, la actividad alcanzada es igual a la obtenida en presencia de manganeso. Concentraciones mayores de  $Mg^{+2}$  (2.5 - 5 mM) no inhiben a la enzima. Otros cationes divalentes tales como cobre ( $10^{-4}$  M), zinc ( $10^{-3}$  M), o calcio ( $10^{-4}$  M), provocan un efecto inhibitor sobre la actividad de la enzima.

Trabajos posteriores efectuados con enzimas comerciales purificadas y con células permeabilizadas de *K. lactis* mostraron que el  $Mn^{+2}$ , y en menor grado el  $Mg^{+2}$ , poseen un rol único en la estabilización térmica de la enzima y cumpliría una función estructural más que catalítica. Además cationes como  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  o  $Cu^{+2}$ , en realidad, desactivan la enzima siguiendo una cinética de pseudoprimer orden, donde la constante de inactivación depende de la temperatura y de la concentración del catión. La desactivación por  $Zn^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  puede ser parcialmente revertida por agentes como EDTA o fosfatos (Voget y col., 1994).

Mas allá de estos datos, muy poco se ha estudiado acerca de la estructura y propiedades de  $\beta$ -gal de *K. lactis*.

El mecanismo de la reacción de hidrólisis de lactosa catalizada por  $\beta$ -gal es complejo. La reacción principal es la formación de glucosa y galactosa. Al menos dos mecanismos han sido propuestos para explicar la reacción principal. En ambos

casos se forma un complejo enzima-galactosa. La enzima es en realidad una transglicosidasa, y el grupo galactosídico unido al centro activo puede reaccionar con cualquier molécula del medio de reacción que contenga un grupo hidroxilo. Cuando la molécula reaccionante es agua se obtiene galactosa libre. Si en cambio el grupo hidroxilo es aportado por galactosa, glucosa o lactosa, se producen otros disacáridos y oligosacáridos. De este modo es factible encontrar en la hidrólisis de lactosa productos de reacción tales como alolactosa, galactobiosa, trisacáridos y diversos oligosacáridos de mayor orden, que se van formando por las reacciones de transglicosidación (Dickson y col. 1979; Prenosil y col. 1987a). En la Figura 1.2 se presenta un esquema simplificado de la formación de disacáridos y trisacáridos.

La acumulación de oligosacáridos depende de la concentración inicial de lactosa usada. Cuando ésta es elevada (15 a 30%) se favorece la formación de tri, tetra y pentasacáridos. Los oligosacáridos pueden representar alrededor del 12 % en peso de los azúcares totales (Prenosil y col, 1987b). De todos modos, la reacción principal es la producción de glucosa y galactosa.

El modelo cinético mas sencillo considera que la hidrólisis sigue una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (Mecanismo 1). Una variante de este modelo contempla la formación de un intermediario enzima-galactosa, que se produce conjuntamente con la glucosa (Mecanismo 2). En estos modelos no se considera la formación de oligosacáridos.

Mecanismos mas complejos de inhibición por producto se han planteado para las lactasas de *A. niger*, *A. oryzae* y *B. circulans*, en el cual se considera la mutarrotación de la galactosa. Cuando la galactosa abandona el sitio activo presenta una configuración del tipo  $\beta$  y al mutarrotar se genera la forma  $\alpha$ . Este modelo considera que la inhibición por galactosa es diferente para la forma  $\alpha$  y  $\beta$  del azúcar. Ambos anómeros son reconocidos por la enzima, y la forma  $\alpha$  del azúcar es un inhibidor más fuerte que su anómero (Flaschel y col., 1982; Peterson y col., 1989; Yang y Okos, 1989; Bakken y col., 1992). Este fenómeno no ha sido considerado para las enzimas provenientes de levaduras.

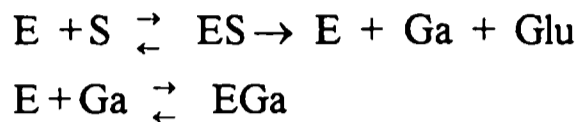
En general se considera que la glucosa no interviene en reacciones secundarias de transglicosidación, y su formación permite seguir el curso de la reacción hidrolítica.

---

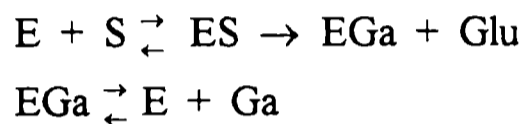
**Figura 1.2. Productos de reacción en la hidrólisis enzimática de lactosa. Esquema simplificado.**

---

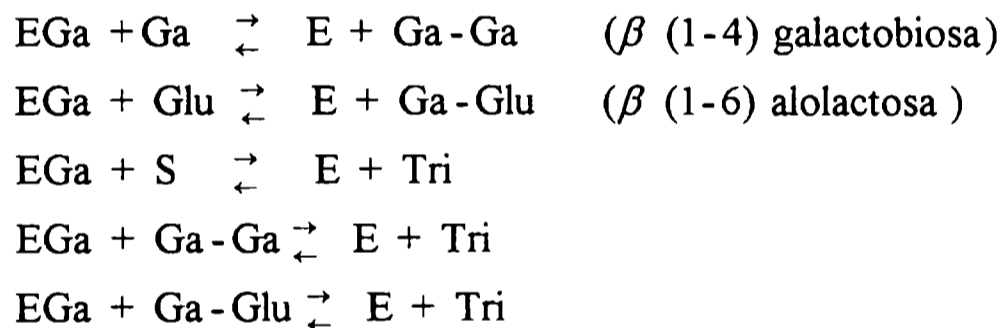
**Mecanismo1**



**Mecanismo2**



**Reacciones secundarias**



S: lactosa, Glu: glucosa, Ga: galactosa; E: enzima; Tri: trisacáridos diversos

## **1.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS CELULAS DE LEVADURA**

### **1.4.1. Aspectos generales**

Las levaduras son microorganismos eucariotas que se describen como microhongos. La mayor parte del conocimiento de su estructura biológica, bioquímica y genética proviene de estudios empleando como modelo a la levadura



*Saccharomyces cerevisiae*. El género *Kluyveromyces* presenta estrecha relación de parentesco con aquella, ya que ambas levaduras son *Ascomycotínicas* y pertenecen a la familia *Saccharomycetaceae* (existen como células individuales, forman entre 1 y 16 esporos por asco y pueden dar lugar a pseudomicelio). *Saccharomycetaceae* se subdivide en cuatro subfamilias, de las cuales *Saccharomycetoideae* incluye 26 géneros que presentan gemación multilateral. Entre esos géneros se encuentran *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. Estos se diferencian entre sí por la forma del asco, por la capacidad de aglutinamiento de los esporos y por la evanescencia del asco. Dentro del género *Kluyveromyces* el número de especies se ha reducido a nueve que se clasifican como variedades de la especie *K. marxianus* (por ejemplo *K. fragilis* se denomina *K. marxianus* var. *marxianus* y *K. lactis* es *K. marxianus* var. *lactis*). *K. lactis* produce entre 1 y 4 ascosporos esféricos, fermenta lactosa, sacarosa y, muy pocas poseen actividad inulinasa (Barnett y col., 1983). Esta especie puede aislarse de quesos y yogurt (Suriyarachchi y Fleet, 1981). Con fines de estudio básicos, *K. lactis* es usada como modelo genético, fundamentalmente del regulón lactosa-galactosa, el cual es análogo, en cierto modo, al regulón melobiosa-galactosa de *S. cerevisiae*. *K. lactis* ha mostrado, también, propiedades ventajosas para la expresión de proteínas heterólogas, lo que la convierte en una potencial productora de moléculas recombinantes (Rowenhorst y col., 1990).

#### 1.4.2. Composición y estructura

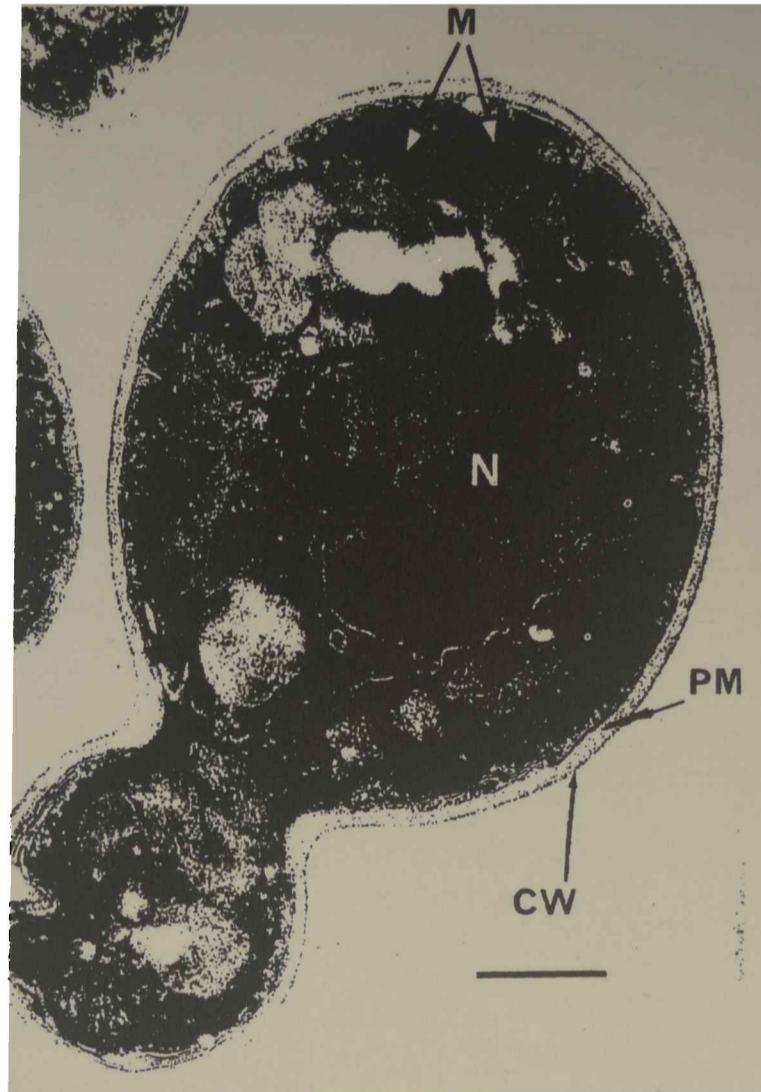
El tamaño celular depende de las condiciones de cultivo. Valores típicos son 5 a 16  $\mu\text{m}$  de largo por 4 a 8  $\mu\text{m}$  de ancho. La densidad está en el rango 1.03 - 1.1  $\text{g}/\text{cm}^3$ , y el contenido de agua varía entre el 65 y el 85% en peso.

Su composición macromolecular (en base seca, %): proteínas, 40 - 60; carbohidratos, 25 - 35; lípidos, 4 - 20; fosfolípidos, 3.7 - 5; ácidos nucleicos, 3 - 8; y cenizas, 6 - 9. Los géneros *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* presentan alto contenido de ácidos grasos 16:1 y 18:1 (palmitoléico y oléico), mientras que otras levaduras comestibles, tales como *C. utilis*, poseen alto contenido de 18:1 y 18:2 (oléico y linoléico). El contenido típico de ergosterol en *K. lactis* es de aproximadamente 0.7% (del peso seco). La mayor parte de los carbohidratos se localizan en la pared celular, en forma de polisacáridos de glucosa y manosa, aunque también pueden acumularse glucógeno y trealosa. Como toda célula eucariota, las levaduras poseen una compleja microestructura (ver Figura 1.3). En la Tabla 1.4 se destacan los principales componentes de la estructura celular.

---

**Figura 1.3. Ultraestructura de una célula de levadura.**

---



---

Microscopía electrónica de una célula de levadura (Watson 1987). M: Mitocondria, N: Núcleo, CW: Pared celular, PM: Membrana plasmática. La barra representa 1  $\mu\text{m}$ .

---

**Tabla 1.4. Principales componentes de la estructura celular de levaduras.**

Componente celular	Peso <sup>a</sup> %	Composición química (%)	Estructura	Actividades enzimáticas
Pared	20 - 30	mananos 30, glucanos 40, proteínas 13, lípidos 8.5, quitina.	Espesor 0.1-0.2 $\mu\text{m}$ . Capa interna de tipo fibrilar, formada por $\beta$ (1-3) y $\beta$ (1-6) glucanos. Capa externa: complejo covalente de mananoproteínas.	Inulinasa, fosfatasa ácida, $\beta$ -fructosidasa, $\beta$ -glucanasa.
Membrana plasmática	13 - 20	Proteínas 50, esteroides 2.5, polisacáridos 7 y fosfolípidos 25.	Espesor 0.01 $\mu\text{m}$ . Sistema bicapa. Los esteroides controlan la fluidez.	ATPasa, quitinsintetasa, glucano sintetasa, permeasas.
Vacuola (lisosoma de levadura)		Gránulos de polifosfato, aminoácidos libres, derivados purínicos.	Organela de 0.3-3 $\mu\text{m}$ , rodeada por membrana.	Proteinasas, ribonucleasas, esterasas, (membrana).
Mitocondrias		Proteínas 65, lípidos 35, ácidos nucleicos 1.	Tamaño 0.3 - 1 $\mu\text{m}$ largo. Pueden ocupar hasta el 12% del volumen celular. Sistema complejo de membranas.	Enzimas catabólicas del sistema respiratorio.
Reticulo endoplásmico (incluye aparato de Golgi y ribosomas)		Alto contenido de proteínas y RNA.	Sistema membranoso en forma de sistemas, túbulos, etc.	Síntesis de proteínas y péptidos.
Citosol		Alta concentración de proteínas, 10%. Carbohidratos: glucógeno, trealosa. Pool de aminoácidos.	Sistema coloidal. Se hallan presentes pequeños cuerpos, tales como microsomas y peroxisomas.	Sistema glicolítico; enzimas del metabolismo del N. Enzimas oxidativas en microsomas y peroxisomas.

<sup>a</sup>: Expresado como porcentaje en peso de la célula.

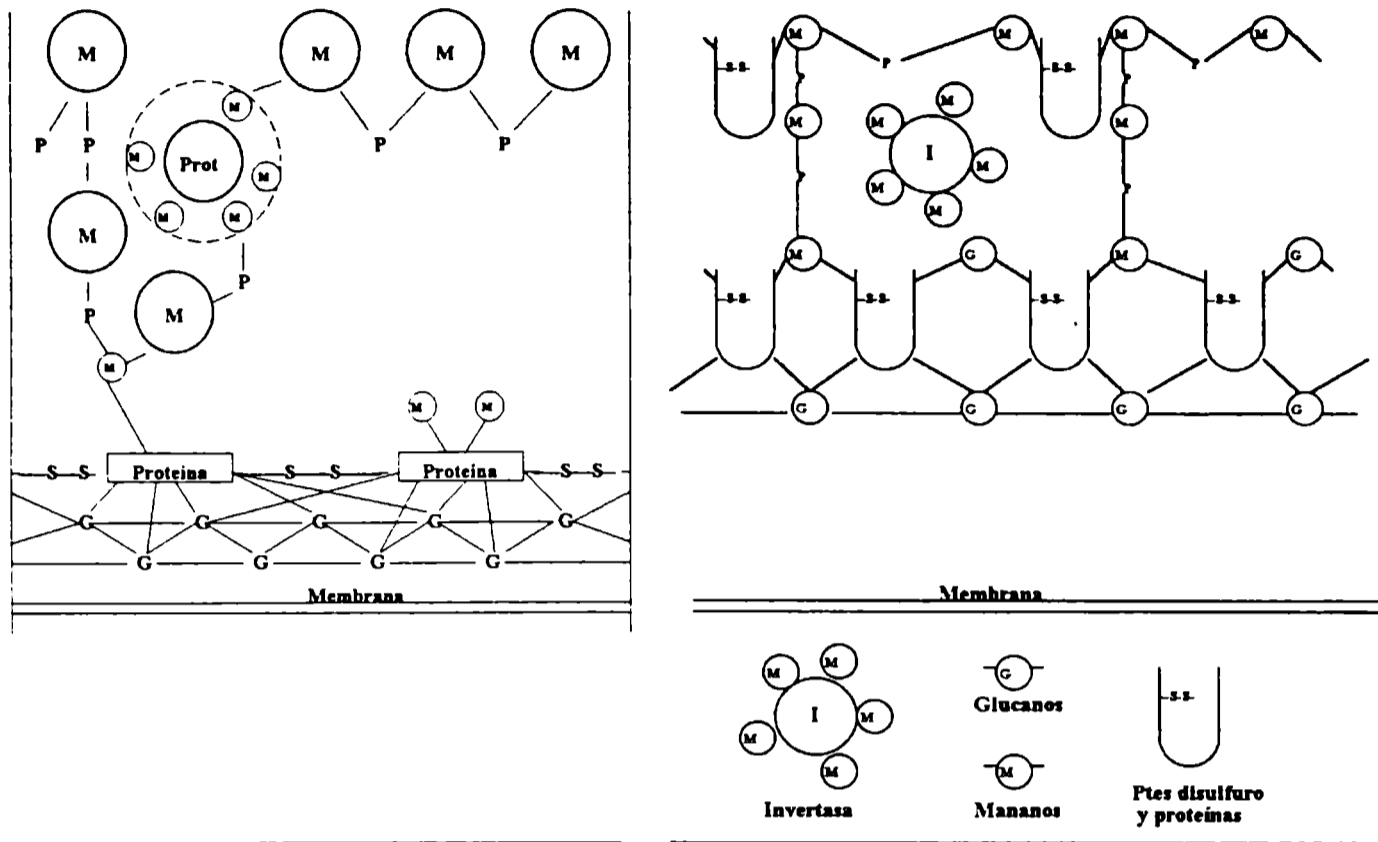
La pared celular de levaduras es una estructura compleja, constituida por diferentes biopolímeros que incluyen mananos, glucanos, proteínas y pequeñas cantidades de quitina. Los glucanos están unidos entre sí por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6), forman una estructura microfibrilar, constituyen el 55 - 60% del peso seco de la pared y están localizados en la superficie interna de la misma.

Los mananos y proteínas forman uniones covalentes y dan lugar a una estructura caracterizada por grandes moléculas que se encuentran localizadas en la superficie exterior de la pared (Figura 1.3). Entre las glicoproteínas de pared, o periplasmáticas se encuentran la fosfatasa ácida y la invertasa ( $\beta$ -D-fructofuranosido fructohidrolasa E.C. 3.2.1.26), cuyo estudio de liberación ha servido como modelo para el análisis de la degradación de la estructura de la pared (Arnold, 1972b). También se han identificado  $\beta$ -glucanasas, fosfolipasas y glucoamilasas. Estas enzimas son secretadas desde el citoplasma en forma de glicoproteínas, particularmente mananoproteínas, particularmente como mananoproteínas.

Para explicar la retención de las enzimas u otras glicoproteínas ubicadas en pared o espacio periplasmático, se han propuesto dos modelos de estructura de la pared de levaduras. El modelo de Lampen (Matile y col., 1969) propone que la capa externa está constituida por mananos unidos por enlaces fosfodiéster; las glicoproteínas se localizarían debajo de esta capa, unidas a la pared por puentes establecidos entre mananos y aminoácidos (tal como ácido aspártico), por puentes hidrógeno u otras fuerzas hidrofílicas. La glicosilación de proteínas sería un medio para que las proteínas quedaran retenidas por la pared celular.

Contrario al modelo de Lampen, el modelo de Kidby y Davies (1970) propone que las glicoproteínas no están enlazadas a la pared, sino que están solubles dentro de la matriz de la misma. La pared, cuya estructura estaría mantenida por enlaces disulfuros, actuaría como una barrera a la permeabilidad. Por lo tanto la retención de invertasa depende de componentes de pared que pueden ser reducibles por compuestos sulfhidrilos tales como el  $\beta$ -mercaptoetanol. De este modo la retención estaría correlacionada con la permeabilidad de la pared. Por lo tanto, un aumento del peso molecular de la proteína, por multimerización y o glicosilación, favorecería su retención. En la Figura 1.4 se muestran esquemas de ambos modelos.

**Figura 1.4.** Esquemas propuestos de los modelos de pared de levaduras.



**A**

**B**

Esquema de la estructura de la pared celular de levaduras y del modo de retención de glicoproteínas de acuerdo a: **(A)** Lampen; adaptado de Matile y col. (1969). **(B)** Kidby y Davies, adaptado de Kidby y Davies (1970).

En relación a la membrana celular, los análisis de peso seco de fracciones de membrana lipídica de levaduras indican que su composición es (%): lípidos, 51; proteínas, 34; azúcares, 7; RNA, 5; esteroides, 2.5; y fósforo lipídico, 0.5. El contenido de agua en membranas varía entre 68 y 92%, y su densidad se encuentra entre 1.10 y 1.16 g/cm<sup>3</sup>.

### 1.4.3. El sistema autolítico

Cuando la célula pierde su viabilidad se ponen en evidencia procesos hidrolíticos que conduce a la autodigestión de los diferentes componentes celulares. Estos involucran además de actividad proteolítica, la intervención de otras actividades tales como glucanasas, fosfolipasas y nucleasas.

El sistema de proteasas intracelulares que presentan las levaduras es muy complejo, y, de acuerdo a su ubicación en la célula, pueden describirse: un sistema vacuolar, uno citoplasmático y uno presente en el sistema de membranas, que participa en la maduración de proteínas (Holzer, 1986; Jones, 1991; Hilt y Wolf 1992).

El sistema proteolítico vacuolar está constituido por una variedad de peptidasas no específicas que participan en el recambio de proteínas. Dentro de las proteasas vacuolares pueden describirse dos endoproteinasas, PrA (peptidil-L-aminoácido-hidrolasa E.C. 3.4.17.1) y PrB (peptidil-L-lisina hidrolasa E.C. 3.4.17.2), dos carboxipeptidasas, CpY (peptidil-L-glicina hidrolasa E.C. 3.4.17.4) y CpS, dos aminopeptidasas, ApI ( $\alpha$ -aminoacil-péptido-hidrolasa E.C. 3.4.11.1), y ApCo, y una dipeptidilaminopeptidasa (DPAP-B) localizada en la membrana vacuolar. Por otro lado estas actividades proteolíticas pueden ser inhibidas por polipéptidos específicos localizados en el citoplasma. En la Tabla 1.5 se describen algunas características del sistema proteolítico vacuolar.

Las proteasas del sistema citoplasmático son peptidasas altamente específicas que tienen diferentes localizaciones dentro del medio celular. El proteosoma PrE, también llamado proteinasa multicatalítica o proteinasa multifuncional es uno de los componentes de este sistema proteolítico. Es un cilindro hueco de alto peso molecular (700 kDa), compuesto por subunidades catalíticas de pesos moleculares comprendidos entre 20 y 35 kDa, que está altamente conservado en células eucariotas, desde levaduras hasta el hombre. Por estar situado en el citoplasma, este sistema actúa mediado por señales de reconocimiento (sistema de la ubiquitina).

Cuando las células son sometidas a condiciones de *stress*, como por ejemplo cultivos en medios pobres en nitrógeno, las proteasas vacuolares catalizan la degradación masiva de proteínas, facilitándose así la reestructuración de los

componentes celulares. Aproximadamente el 80% de esta degradación de proteínas es debida a las proteasas vacuolares PrA y PrB.

Así, en células viables la degradación proteolítica puede ser alcanzada por toma selectiva de las proteínas dentro de las vacuolas, donde ocurre una degradación proteolítica no selectiva, o por degradación en el citoplasma de proteínas que han sido previamente marcadas, y que son reconocidas por el proteosoma.

Otro sistema proteolítico que puede distinguirse en levaduras es el asociado a membranas, están relacionadas con modificaciones post-traslacionales, y actúan sobre moléculas que van a ser secretadas.

**Tabla 1.5.** Características de las proteasas vacuolares.

Enzima	Tipo	Zimógeno	Tamaño (kDa)
PrA	Aspartil	si	42
PrB	Serin	si	31
CpY	Serin	si	61
CpS	Metaloenzima (Zn <sup>+2</sup> )	--	--
ApI	Metaloenzima (Zn <sup>+2</sup> )	si	--
ApCo	Metaloenzima (Co <sup>+2</sup> )	--	100
DPAP-B	Serin	no	120

Datos adaptados de Jones (1991). -- : No existe información bibliográfica

Cuando la célula es sometida a tratamientos que destruyen su viabilidad, los sistemas selectivos que controlan la proteólisis endógena, dejan de actuar de manera que todas las proteínas son susceptibles de degradación, iniciándose así una proteólisis generalizada típica del proceso de autólisis.

Además del sistema proteolítico, otra actividad hidrolítica de importancia está dada por las glucanasas. Estas glicoproteínas son capaces de hidrolizar los enlaces  $\beta$  (1→6) glicosídicos de los glucanos que constituyen la pared celular. Se han identificado exo- y endo-glucanasas que se localizan en la región

periplasmática y también en el citoplasma. La hidrólisis de la pared por glucanasas genera glucosa, laminarin oligosacáridos y otros productos solubles de alto peso molecular. Durante la autohidrólisis la actividad de las glucanasas se solubiliza junto con otras enzimas localizadas en la pared (Hien y Fleet, 1983; Farkas, 1989). Si bien los glucanos de la pared de levadura no presentan un grado de recambio apreciable durante el crecimiento vegetativo, es posible detectar hidrólisis de los componentes de la pared, mediada por glucanasas endógenas durante las fases de gemación, formación del asco, etc. La hidrólisis de los glucanos también se manifiesta en forma no controlada una vez que la célula ha perdido su viabilidad. La biosíntesis del complejo manano proteína ha sido intensamente estudiado, sin embargo, poco se ha publicado acerca de la degradación durante la autólisis. Levaduras como *S. cerevisiae* o *S. bayannus*, evidencian durante la autólisis una degradación diferencial de la capa de manano proteínas cuando son cultivadas en medios sintéticos (Charpentier y col., 1986).



## 1.5. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

Tal como se mencionó en la Sección 1.2., se han descrito diferentes sistemas que emplean células de levaduras inmovilizadas y que son empleados para la hidrólisis de leche, sueros y permeados. El objetivo básico en todos los casos es estudiar la factibilidad del uso de un sistema que presente ventajas técnicas y económicas con respecto al de la enzima inmovilizada. Si bien han sido publicados en la literatura trabajos referidos al uso de células para la hidrólisis de lactosa de leche y suero, los mismos se refieren a estudios realizados sobre el procedimiento de inmovilización celular (entrampamiento, adsorción etc.) y al análisis de la operación del reactor. Sin embargo, la factibilidad de desarrollo de un sistema celular inmovilizado requiere del conocimiento básico sobre los procesos involucrados en las diferentes etapas de la obtención, de modo de hacer efectiva y racional su preparación. Los procesos de inactivación celular y de estabilización constituyen procesos críticos en la obtención de un sistema inmovilizado. Sin embargo, es poco lo que se ha descrito acerca de ambos procesos y de las modificaciones que pueden ocurrir en las propiedades del catalizador. Mas aún la caracterización del catalizador celular se ha realizado, en general, con sustratos artificiales tales como ONPG, cuyos resultados no son siempre extrapolables a lo que sucede con sustratos naturales como lactosa.

El presente trabajo de Tesis tiene por objeto investigar el proceso de permeabilización y la posterior estabilización de la  $\beta$ -gal en células de levaduras no viables mediante el uso de reactivos ligantes o de *cross-linking*. Determinar los parámetros básicos de dichos procesos y contribuir así a aclarar las causas del efecto ligante, como también determinar el efecto del tratamiento sobre las propiedades del biocatalizador celular. El conocimiento básico permitirá diseñar biocatalizadores celulares con un criterio mas racional.

Para cumplir este objetivo se plantearon las siguientes etapas:

- **Obtención de células no viables de levadura capaces de hidrolizar lactosa.**

El procedimiento habitual para la obtención de células no viables se realiza mediante tratamientos físicos o químicos que desorganizan la membrana

plasmática. Este proceso se conoce como permeabilización. Con este proceso se logra no solo obtener células no viables, sino también eliminar la barrera difusional y permitir el libre acceso de los sustratos hacia la enzima.

En esta etapa se estudió el proceso de permeabilización, fundamentalmente mediante el uso de solventes orgánicos. Se determinó la influencia de diversos parámetros, tales como tiempo de contacto, temperatura, concentración de reactivo permeabilizante y concentración celular en el proceso de permeabilización. Se obtuvieron así células no viables con actividad  $\beta$ -galactosidasa.

- **Retención y estabilización de  $\beta$ -galactosidasa en la célula permeabilizada**

La célula, una vez permeabilizada, es inestable. La pérdida de viabilidad provocada por la desorganización de la estructura celular desencadena el proceso autolítico, con la consiguiente degradación de la estructura celular y la desactivación de la enzima.

Por lo tanto, luego de la permeabilización es necesario tratar las células para estabilizar la actividad  $\beta$ -gal y la estructura celular global de la levadura. Este procedimiento ha sido intentado mediante el uso de reactivos de *cross-linking* de proteínas, tal como glutaraldehído.

En esta segunda etapa se investigó el proceso de estabilización de  $\beta$ -gal en la célula permeabilizada mediante el uso de glutaraldehído.

- **Estudios sobre el efecto del glutaraldehído en la estructura celular**

En esta etapa se trataron de aclarar los mecanismos por los cuales el glutaraldehído estabiliza la estructura celular y retiene la  $\beta$ -gal, para lo cual se llevaron a cabo diversos estudios para establecer el modo de acción del agente ligante.

- **Estudios sobre propiedades del biocatalizador**

En general los métodos de inmovilización pueden provocar cambios en las propiedades de la enzima. Esas modificaciones pueden involucrar cambios en las propiedades cinéticas del biocatalizador, así como variaciones en la estabilidad térmica y cambios en las condiciones para obtener una máxima actividad de la enzima.

Para determinar si el tratamiento provocó cambios y cuantificar la magnitud de esos cambios en las propiedades del biocatalizador, se evaluaron las propiedades cinéticas y la estabilidad del sistema celular estabilizado y se efectuaron comparaciones con las propiedades de la enzima libre.

- **Modelo de hidrólisis de lactosa**

En la parte final del trabajo de Tesis se analizaron diferentes modelos cinéticos para la hidrólisis de lactosa, y se propone un modelo destinado a explicar el efecto de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) sobre dicha reacción.

---

**CAPITULO 2**

**TRATAMIENTOS DE PERMEABILIZACION**

## 2.1. INTRODUCCION

Las células controlan la entrada de solutos por medio de la membrana plasmática. La permeabilidad de esta membrana puede ser dañada, sin destruir la integridad total de la célula, mediante tratamientos de permeabilización. Con relación a la  $\beta$ -galactosidasa de levaduras, el tratamiento de permeabilización ha sido empleado para medir la actividad enzimática *in situ*, para extraer la enzima de la célula y para preparar biocatalizadores con células no viables (Serrano y col., 1973; Fenton, 1982; Brodsky y GrootWassink, 1986; Decleire y col., 1987; Champluvier y col., 1988b; Joshi y col., 1989).

El método de permeabilización más usado es el tratamiento de una suspensión de levaduras con un agente químico capaz de desorganizar la membrana plasmática; como solventes orgánicos, detergentes, proteínas básicas, o soluciones de alta fuerza iónica (Hansruedi, 1982).

De los métodos mencionados el de uso más frecuente, debido a su eficiencia y bajo costo, es el tratamiento con solventes orgánicos. Los solventes más comúnmente usados son etanol, cloroformo y tolueno (Serrano y col., 1973, Fenton, 1982; Decleire y col. 1987; Champluvier y col., 1988b).

A pesar del extendido uso de solventes orgánicos como agentes permeabilizantes existen muy pocos datos acerca de los factores que afectan el comportamiento de estos solventes frente a células de levadura. En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos en estudios de permeabilización de *K. lactis* con cloroformo, tolueno y etanol en función de las condiciones de proceso.

La evaluación de la permeabilidad celular se realizó determinando la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente al sustrato cromogénico *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (ONPG). En las condiciones de trabajo empleadas, este sustrato es incapaz de penetrar la membrana plasmática cuando ésta no ha sido sometida a tratamientos de permeabilización. Se evaluó además la liberación de compuestos citoplasmáticos que absorben en UV como una medida del daño provocado a la célula (Jasper y col., 1975; Michiko, 1978). Dado que las células permeabilizadas serán empleadas como biocatalizadores para la hidrólisis enzimática de lactosa, y este proceso requiere la pérdida total de la viabilidad, se evaluó también el efecto de los solventes sobre la viabilidad celular.

## **2.2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo**

La cepa usada *Kluyveromyces lactis* CBS 683 fue mantenida a 5 °C en agar nutritivo bajo vaselina. La composición del medio fue la siguiente (g/l): lactosa, 20; peptona, 5; extracto de levadura, 3; extracto de malta, 3; agar, 30. El pH fue ajustado a 4.5. Los cultivos en medio líquido se realizaron en un medio conteniendo (g/l): lactosa, 25; urea, 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.6; extracto de levadura, 2.5; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0025; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.005; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0025. El valor inicial del pH fue 5.0.

Las células provenientes de un cultivo *stock* se desarrollaron 48 h en agar nutritivo, se resuspendieron en agua estéril, y se usaron para inocular tres erlenmeyer de 1 litro conteniendo 100 ml de medio cada uno, ajustándose la DO (620 nm) a 0.3 unidades. Luego fueron incubados entre 10 y 12 h en agitador rotatorio a 200 rpm, y los cultivos obtenidos se usaron para inocular un fermentador New Brunswick de 6 litros conteniendo 3 litros de medio. Las condiciones de cultivo empleadas fueron: temperatura, 30 °C; aireación: 180 l/h; agitación: 800 rpm. La concentración inicial de biomasa fue de  $5 \times 10^7$  células/ml. El cultivo se mantuvo en condiciones aeróbicas hasta alcanzar la fase estacionaria. La concentración de biomasa final fue  $10^9$  células/ml. El cultivo se realizó sin control de pH, alcanzando un valor de 3.5 al final del proceso. El rendimiento celular fue de alrededor de 0.42 g de biomasa/g de lactosa y la actividad  $\beta$ -gal de  $1.15 \pm 0.15$  ONPG/mg de biomasa.

### **2.2.2. Cosecha y determinación de biomasa**

El cultivo fue centrifugado a 5 °C y 3 000g durante 10 min. El paquete celular se lavó una vez con buffer pH 6.6 y se mantuvo a 5 °C (no más de 12 horas) o fue congelado a -20 °C hasta su uso. La concentración celular se determinó por recuento en cámara de Neubauer y por determinación de peso seco. Un miligramo de células secas corresponde aproximadamente a  $10^8$  células.

### 2.2.3. Reactivos y soluciones

Los reactivos usados fueron: cloroformo (Merck), tolueno y etanol absoluto (Carlo Erba). *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (ONPG), Triton X-100, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y desoxicolato de sodio (DOCH) (Sigma). El resto de las drogas usadas fueron de grado analítico.

El buffer usado fue  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, (pH 6.6 ó 7.0) ajustado con KOH y suplementado con  $\text{MnCl}_2$  (0.1 mM), que será mencionado como PPB-Mn. La solución de ONPG (1.25 mM) se preparó en PPB-Mn, pH 6.6.

### 2.2.4. Permeabilización de las células

Para los ensayos con cloroformo o tolueno, el paquete celular se resuspendió con PPB-Mn, pH 6.6, a la concentración celular deseada. Un volumen de 18 ml de esa suspensión se adicionó a un tubo con tapa de 100 ml, y se termostató durante 15 minutos. Luego del agregado de 2 ml de etanol o de buffer, se adicionaron las cantidades deseadas de cloroformo o tolueno, y la mezcla se agitó vigorosamente para permitir un buen contacto entre las células y los solventes. La concentración de tolueno y cloroformo se expresó como un porcentaje del volumen de la suspensión. La concentración final de células en la mezcla se varió entre  $3$  y  $15 \times 10^9$  células/ml.

Los ensayos con etanol, como único agente permeabilizante, se llevaron a cabo del siguiente modo: los paquetes celulares se resuspendieron en agua destilada conteniendo KCl 50 mM y  $\text{MnCl}_2$  0.1 mM, en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de  $16 \times 10^9$  células/ml. La permeabilización se realizó agregando 10 ml de una solución de etanol a 10 ml de la suspensión celular. El etanol se agregó en un tiempo no mayor que 5 min, con agitación permanente. La concentración final de etanol en la mezcla se varió entre 20 y 50%. Los cambios de volumen no fueron considerados. La concentración celular en la mezcla fue de  $8 \times 10^9$  células/ml.

La permeabilización con detergente se llevó a cabo incubando la suspensión celular ( $8 \times 10^9$  células/ml) en PPB-Mn con 0.2 % del detergente, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

### **2.2.5. Obtención de un homogeneizado celular**

El homogeneizado celular se obtuvo desintegrando las células por medio de la prensa X (Edebo, 1969). Para ello, 25 ml de una suspensión celular ( $8 \times 10^9$  células/ml en PPB-Mn), se sometieron a seis pasajes por la prensa X a  $-25$  °C. Después de la ruptura, la suspensión fue descongelada y mantenida a  $5$  °C hasta su análisis.

### **2.2.6. Determinaciones analíticas**

#### **2.2.6.1. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa**

La determinación de la actividad  $\beta$ -gal con ONPG se efectuó adicionando  $50 \mu\text{l}$  de enzima a 2 ml de la solución de sustrato (1.25 mM ONPG en PPB-Mn). la mezcla se incubó a  $37$  °C entre 5 y 30 min, según la actividad de la muestra. La reacción se detuvo agregando 0.5 ml de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  1M, luego de lo cual se determinó la absorbancia a 420 nm. El valor de absorbancia fue siempre inferior a una unidad. El ONPG hidrolizado se calculó a partir del coeficiente de extinción molar del *o*-nitrofenol en las condiciones del ensayo ( $\epsilon$ :  $4500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad se define como la cantidad de  $\beta$ -gal que hidroliza  $1 \mu\text{mol}$  de ONPG por minuto.

Para la determinación de actividad durante la permeabilización se tomó una muestra de la suspensión y se la diluyó a una concentración de  $5 \times 10^7$  células /ml en PPB-Mn frío (baño de hielo). De este modo se detuvo el proceso de permeabilización por enfriamiento y dilución del solvente. La actividad así medida corresponde a la actividad total en mezcla de incubación. La actividad extracelular se midió en el sobrenadante obtenido por centrifugación de la



suspensión en microfuga (14 000g, 1 min). La actividad celular es la diferencia entre la total y la extracelular.

#### **2.2.6.2. Determinación de la actividad invertasa**

La actividad se determinó mezclando 0.1 ml de la suspensión celular con 2.4 ml de una solución de sustrato (80 mM de sacarosa en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4.8), e incubando durante 15 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo manteniendo la mezcla en baño de agua hirviendo durante un minuto. La glucosa producida por la reacción se determinó usando el sistema de la glucosa-oxidasa-peroxidasa. La actividad se expresó en  $\mu$ moles de sacarosa hidrolizados por minuto cada  $10^9$  células. Para medir la actividad total, un volumen de la suspensión celular se diluyó en buffer acetato de sodio, hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml. La actividad extracelular se midió en el sobrenadante obtenido por centrifugación de la suspensión.

#### **2.2.6.3. Medida de la liberación de compuestos citoplasmáticos**

La absorbancia a 260 nm se usó como parámetro del daño celular. La misma se determinó en el sobrenadante diluido con PPB-Mn, pH 7.0, y se expresó como el incremento neto de absorbancia cada  $10^9$  células tratadas. El mismo se calculó como la diferencia entre la absorbancia de la muestra tratada y la absorbancia del sobrenadante de células enteras antes de la adición de solventes.

#### **2.2.6.4. Viabilidad celular**

Las células permeabilizadas y las células control se lavaron dos veces con buffer estéril, se diluyeron en forma seriada con solución de Ringer estéril (diluída 1/4), y se plaquearon en agar nutritivo para obtener el recuento de viables. El plaqueo se realizó por triplicado utilizando en todos los casos 1 ml de

muestra. Una alícuota de la misma solución se usó para determinar la fracción de células teñidas por el método de tinción con azul de metileno (Lee y col., 1981). En el ensayo de tinción se contaron entre 300 y 400 células de levadura. Las células en gemación se consideraron como una única unidad formadora de colonias (UFC).

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Estudios con cloroformo y tolueno**

Para estudiar el efecto del tiempo de incubación y la temperatura sobre la permeabilización, las suspensiones celulares se trataron con 2% de cloroformo y 2% de tolueno. Estas concentraciones se seleccionaron por ser las concentraciones de solventes típicamente usadas en la extracción de la enzima (Gonçalvez y Castillo, 1985; Mahoney y col., 1975). Las muestras se incubaron a 5, 30, y 37 °C durante una hora. Se tomaron muestras cada 5 minutos, y se determinó la actividad  $\beta$ -gal total y extracelular, como así también la absorbancia en UV del sobrenadante. Como la adición de bajas concentraciones de etanol aumenta la eficiencia de la permeabilización (Serrano y col., 1973), los solventes también fueron ensayados en presencia de 10% de etanol. En todos los casos, la concentración celular fue de  $8 \times 10^9$  células/ml. Los resultados se muestran en la Tabla 2.1.

La actividad  $\beta$ -gal total fue muy baja o nula en las muestras que se usaron como control (células sin agregado de solventes y células con 10% de etanol). El mismo fenómeno, sin embargo, se observó en las muestras tratadas con tolueno o con la mezcla tolueno/etanol a 5 °C.

En las otras condiciones de incubación, las suspensiones muestran una actividad  $\beta$ -gal máxima. En concordancia con ello, se observa un aumento de la absorbancia en UV del sobrenadante, adjudicable a componentes celulares que han sido liberados por la permeabilización. Una excepción la constituyen las células tratadas con tolueno como único agente permeabilizante. Las causas de este resultado no son claras.

Por otra parte, puede verse que la velocidad de permeabilización aumentó con la temperatura, así como con el agregado de etanol. A 37 °C, el proceso de permeabilización fue muy rápido, ocurriendo en un tiempo igual o menor que 5 minutos.

**Tabla 2.1.** Permeabilización de *K. lactis* con tolueno y cloroformo a distintas temperaturas.

Solvente agregado	T (°C)	Tiempo <sup>a</sup> (min)	Actividad $\beta$ -gal celular <sup>b</sup>	Absorbancia a 260 nm <sup>c</sup>
Sin agregado	5	60	0	0.02
	30	60	0.06	0.05
	37	60	0.12	0.16
etanol 10%	5	0	0	-
	30	60	0.52	-
	37	60	0.60	-
tolueno 2%	5	60	0.3	0.02
	30	40	9.4	0.20
	37	10	9.7	0.22
tolueno 2% etanol 10%	5	60	1.2	0.03
	30	10	9.4	1.40
	37	5	9.7	1.67
cloroformo 2%	5	20	10.2	1.10
	30	10	10.2	1.44
	37	5	10.8	1.83
cloroformo 2% etanol 10%	5	10	9.5	1.86
	30	5	10.3	1.44
	37	5	9.4	1.80
	37 <sup>+</sup>	5	11.0	-
suspensión de células rotas <sup>d</sup>	-	-	9.6	-

<sup>a</sup>: Tiempo transcurrido entre el agregado de solvente y la máxima actividad  $\beta$ -gal observada. Las suspensiones se incubaron durante 60 minutos y las muestras fueron tomadas cada 5 minutos.

<sup>b</sup>: Actividad  $\beta$ -gal máxima, expresada en  $\mu$ moles de ONPG hidrolizados por minuto cada  $10^9$  células.

<sup>c</sup>: Absorbancia en el medio extracelular cada  $10^9$  células. Diferencia entre el valor medido y el valor de la muestra a tiempo cero (control).

<sup>d</sup>: Actividad de células sometidas a seis pasajes por prensa X.

<sup>+</sup>: La mezcla de solventes se agregó después de incubar la suspensión celular 60 minutos a la temperatura indicada. Concentración celular  $8 \times 10^9$  células/ml en PPB-Mn.

Para todas las temperaturas ensayadas, al alcanzarse la máxima actividad  $\beta$ -gal no se detectó actividad enzimática extracelular, lo que implica que la enzima está completamente retenida dentro de la célula. Esta actividad máxima coincidió con la actividad encontrada en una suspensión de células desintegradas. Esto indica que la membrana fue dañada y el sustrato de bajo peso molecular difunde en forma libre hacia la enzima.

La actividad enzimática total no cambia durante los 60 minutos de incubación. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando las células se incubaron durante 60 minutos a 37 °C antes del agregado del cloroformo/etanol. Se puede concluir así que la  $\beta$ -gal es estable en la célula intacta, y que no es inactivada por los solventes en las condiciones del ensayo.

En la Tabla 2.2 se presentan resultados de la permeabilización con cloroformo y la mezcla cloroformo/etanol durante los primeros 30 minutos de incubación. Los datos incluyen la actividad invertasa total y extracelular y la concentración de proteína extracelular. La actividad invertasa fue medida como un indicador del efecto de los solventes sobre la pared celular (Arnold, 1972a; Scherrer y col., 1974). La actividad de esta enzima se expresa en la célula no permeabilizada, como era de esperar debido a su localización periplasmática. En las células tratadas con solventes la actividad extracelular observada indicaría una pequeña liberación de la enzima.

Como se mencionó en el Capítulo 1 existe una controversia acerca de las causas que retienen a la invertasa en el entorno de la pared. Independientemente de ello, los datos obtenidos sugieren que el tratamiento con cloroformo no resultaría en una alteración significativa de la estructura de la pared. Los tratamientos con tolueno presentaron resultados similares.

La absorbancia en UV en el medio extracelular se incrementó rápidamente en los primeros cinco minutos. Esto puede ser atribuido a la liberación de compuestos de bajo peso molecular, tales como NAD, ATP, etc., que difunden rápidamente una vez que la membrana ha sido dañada. Sin embargo, la absorbancia continuó aumentando, aunque a baja velocidad, lo que se puede atribuir a una cinética de liberación de proteínas más lenta. Esta hipótesis es apoyada por el incremento de la actividad  $\beta$ -gal observado en el medio extracelular. La liberación de  $\beta$ -gal al medio fue menos pronunciada cuando la

mezcla de permeabilización incluía etanol. La actividad  $\beta$ -gal extracelular fluctuó entre 0.5 y 2% de la actividad total después de 30 minutos de incubación a 37 °C, mientras que la cantidad de proteína liberada fue el 5% de la proteína total de la célula. Si la temperatura de permeabilización disminuye, la actividad  $\beta$ -gal liberada y la proteína extracelular también disminuyen (datos no mostrados).

**Tabla 2.2.** Permeabilización de *K. lactis* con cloroformo y mezclas cloroformo-etanol a 37 °C.

Solvente agregado	Tiempo de incubación (min)	Actividad $\beta$ -gal <sup>a</sup>		Actividad invertasa <sup>a</sup>		Absorbancia (260 nm) <sup>b</sup>	Proteína extracelular <sup>c</sup>
		T	E	T	E		
Sin agregado	0	0.12	-	7.5	0.16	0	0.02
	30	0.12	-	7.9	0.20	0.09	0.05
etanol 10%	5	0.57	-	7.9	0.23	0.30	-
	30	0.60	-	7.9	0.27	0.90	0.065
cloroformo 2%	5	10.9	0	8.3	0.49	1.9	0.08
	10	11.1	0.01	8.3	0.54	2.2	0.15
	20	10.3	0.07	7.9	0.54	2.65	0.20
	30	10.2	0.13	8.3	0.54	3.1	0.26
cloroformo 2% etanol 10%	5	10	0	7.9	0.57	1.75	-
	10	9.6	0	7.9	0.57	1.91	0.13
	20	9.8	0.01	-	-	2.2	0.20
	30	9.6	0.03	7.9	0.59	2.2	0.23

T: Actividad total; E: Actividad extracelular

<sup>a</sup>:  $\mu$ moles de ONPG o sacarosa hidrolizados por minuto cada  $10^9$  células.

<sup>b</sup>: Absorbancia en el sobrenadante cada  $10^9$  células. Diferencia entre el valor medido y el valor de la muestra control a tiempo cero.

<sup>c</sup>: mg proteínas cada  $10^9$  células. Concentración celular  $8 \times 10^9$  células/ml en PPB-Mn.

Se estudió también la permeabilización con cloroformo y tolueno como una función de la concentración celular y la concentración de solvente. Las experiencias se realizaron con los solventes, solos y con el agregado de 10% de etanol. Las concentraciones celulares en mezcla fueron 3, 8 y  $15 \times 10^9$  células/ml. Todos los ensayos se realizaron a 37 °C, excepto aquellos con cloroformo/etanol, que se realizaron a 5 y 37 °C.

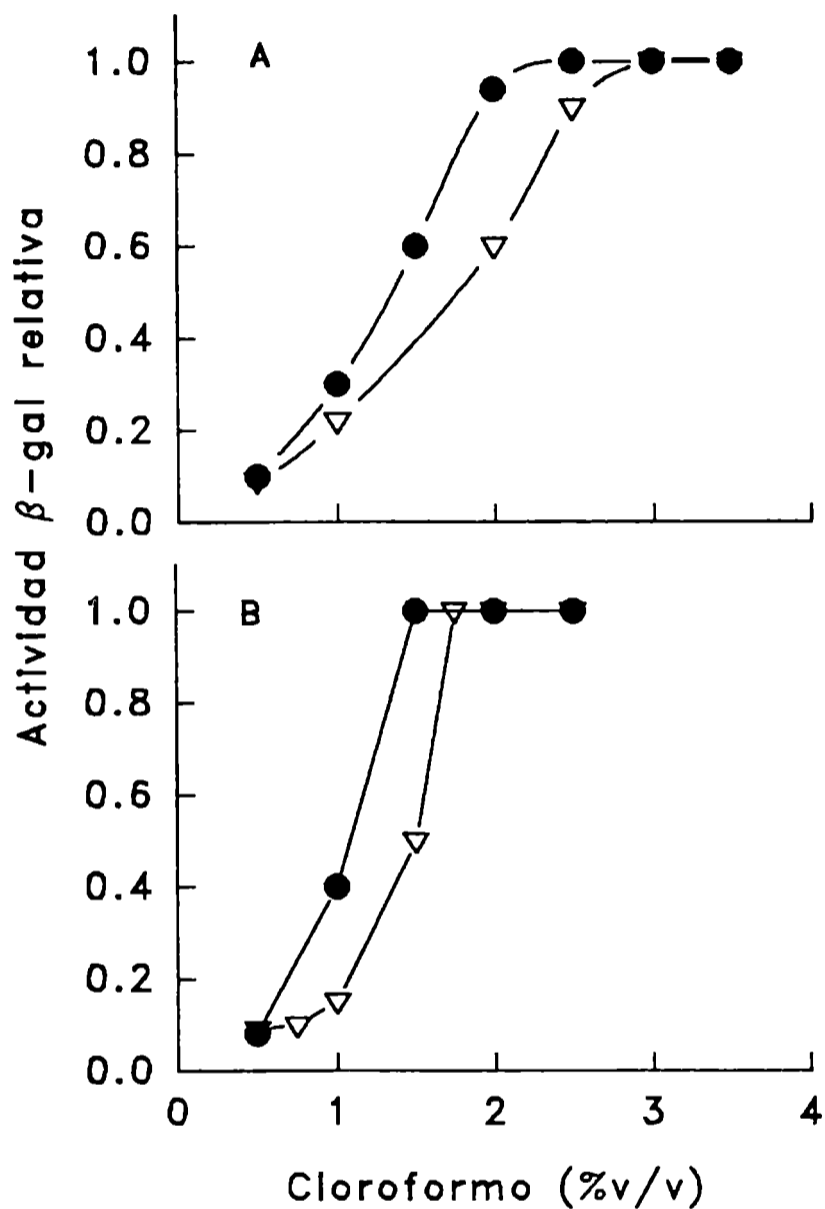
De acuerdo con resultados previos, se seleccionó un tiempo de incubación de 30 minutos para asegurar máxima efectividad del tratamiento. La actividad  $\beta$ -gal se expresó como actividad relativa, tomando como unidad el valor de actividad máxima obtenida. Los resultados de permeabilización con cloroformo se presentan en la Figura 2.1.

El grado de permeabilización se incrementó con el aumento de solvente, hasta una concentración crítica que corresponde al valor con el cual se alcanzó la máxima actividad. Este valor crítico aumenta con la concentración celular, y con la disminución de la temperatura de permeabilización. Teniendo en cuenta que el tiempo de incubación no es el factor limitante, los resultados mencionados indican que en aquellas suspensiones celulares donde no se alcanzó la máxima actividad enzimática, las células han sido permeabilizadas de un modo incompleto, debido a una insuficiente cantidad de solvente. Un comportamiento similar pudo observarse con los otros solventes. En la Figura 2.2 se muestran las cantidades mínimas de cloroformo o tolueno requeridas para alcanzar la máxima permeabilización a 37 °C. Puede verse que la concentración crítica se encuentra entre 1.5 y 3%, y que la presencia de etanol reduce estos valores a 0.75 y 2.5%. La desviación estándar relativa obtenida con células provenientes de tres cultivos en *batch* independientes fue de 15%.

---

**Figura 2.1.** Efecto de la concentración de cloroformo, concentración celular y temperatura sobre la permeabilización de células de *K. lactis*.

---



---

La permeabilización se llevó a cabo en PPB-Mn conteniendo 10% de etanol. El tiempo de tratamiento fue de 30 min. La actividad  $\beta$ -gal se expresa en forma relativa al valor máximo obtenido. **A:**  $15 \times 10^9$  células/ml; **B:**  $8 \times 10^9$  células/ml. ▽: 5 °C. ●: 37 °C.

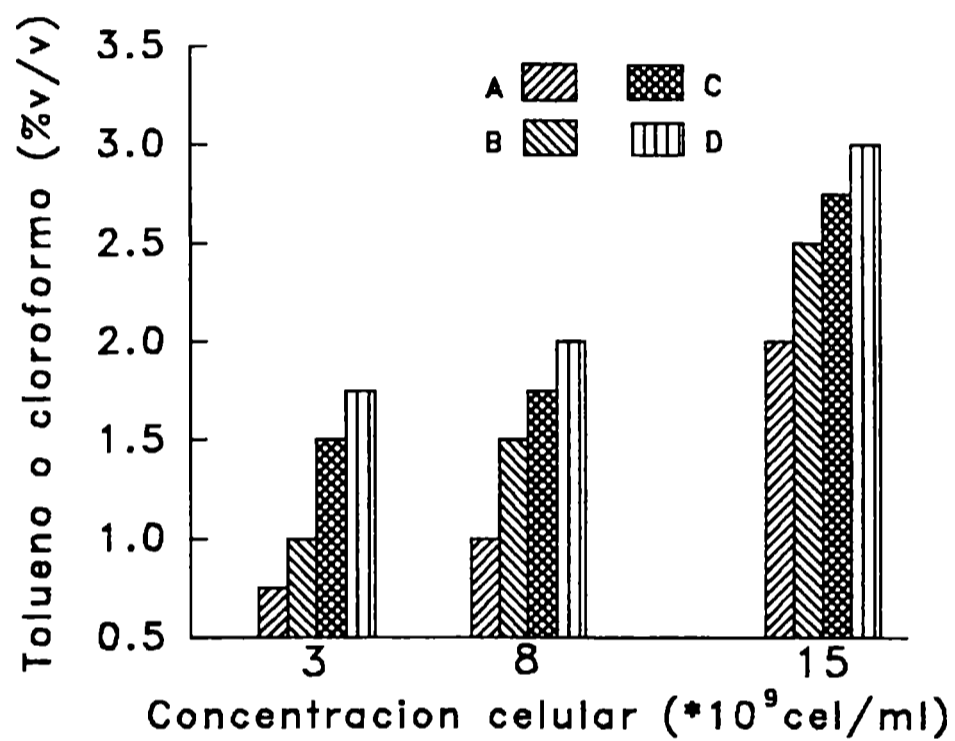
---



---

**Figura 2.2.** Concentraciones mínimas de cloroformo y tolueno requeridas para permeabilizar células de *K. lactis*.

---



---

La permeabilización se efectuó durante 30 min a 37 °C en PPB-Mn conteniendo diferentes concentraciones de cloroformo o tolueno. La ordenada representa la concentración mínima de solvente requerida para alcanzar la máxima actividad  $\beta$ -gal. **A:** Tolueno + etanol 10%; **B:** Cloroformo + etanol 10%; **C:** Tolueno; **D:** Cloroformo.

---

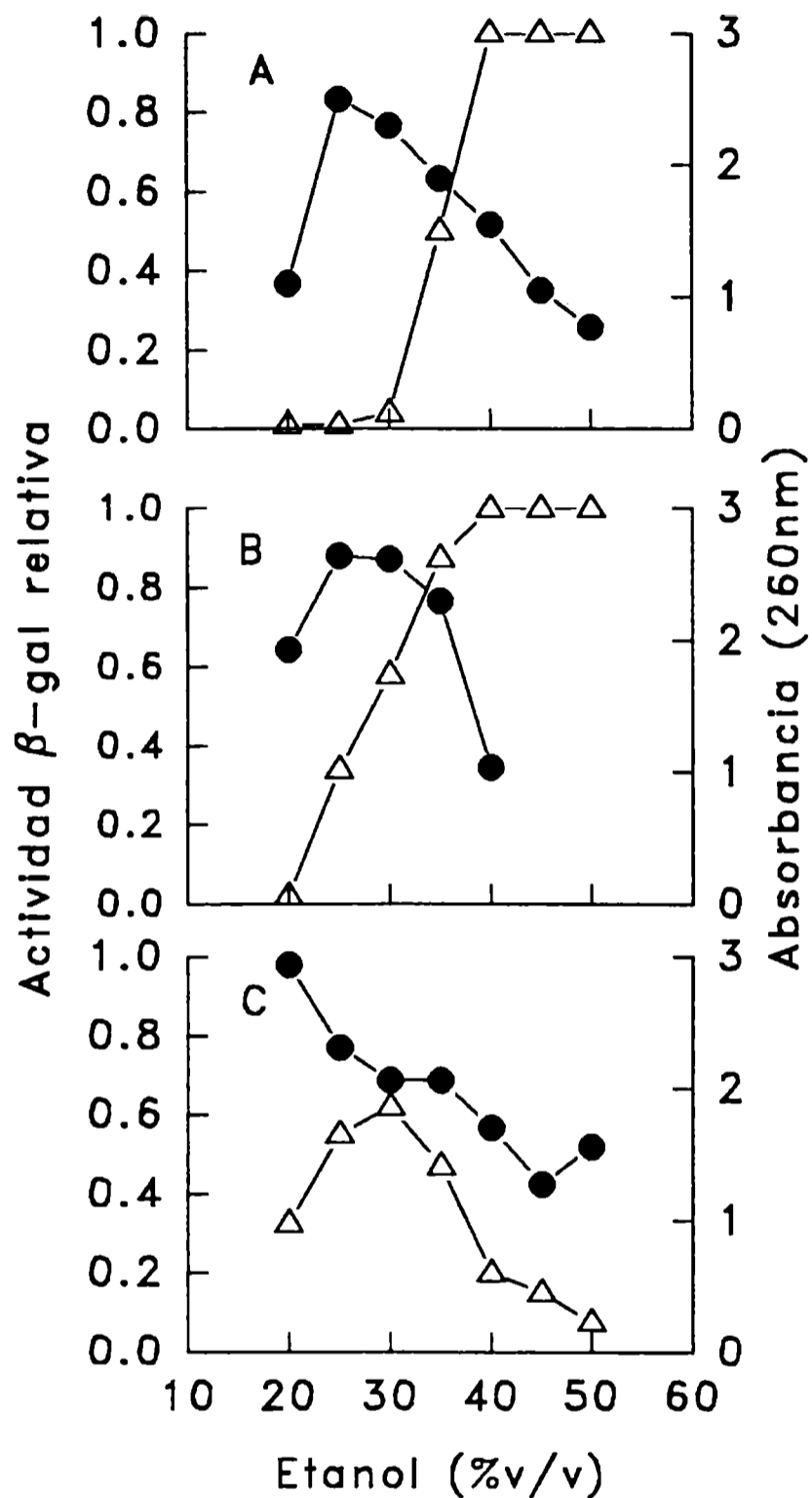
### 2.3.2. Estudios con etanol

Luego de los estudios con cloroformo y tolueno se estudió el comportamiento del etanol como único agente permeabilizante. Para ello se realizaron ensayos a varias temperaturas con un tiempo de incubación máximo de 45 minutos. La concentración celular se fijó en  $8 \times 10^9$  células/ml, y las concentraciones de etanol en la mezcla final variaron entre 20 y 50%. Los resultados obtenidos después de 15 minutos de incubación se muestran en la Figura 2.3. Tanto a 5 como a 30 °C el comportamiento del sistema, en relación a la concentración de etanol y la actividad  $\beta$ -gal, fue similar a aquel obtenido con cloroformo y tolueno. La actividad enzimática se incrementa a medida que aumenta la concentración de etanol en la mezcla de reacción. Si bien el tratamiento es favorecido por la temperatura (mayor permeabilización con menor concentración de solvente), la máxima actividad enzimática se alcanza con 40% de etanol tanto a 5 como a 30 °C.

A 5 °C, y en todo el intervalo de concentraciones de etanol ensayadas, no se observó disminución en la actividad enzimática durante los 45 minutos de incubación.

A 30 °C la inactivación fue evidente para concentraciones de etanol mayores que 40% y tiempos de incubación mayores que 15 minutos. Con concentraciones de etanol de 45 y 50% la actividad  $\beta$ -gal disminuyó 18 y 43%, respectivamente, luego de 45 minutos de tratamiento. A 37 °C la actividad máxima no se alcanzó, debido a la inactivación de la enzima. Sin embargo, es probable que, a esta temperatura, la permeabilización ocurra a concentraciones menores que 40%. En estos tratamientos no se detectó actividad  $\beta$ -gal extracelular, y la máxima actividad celular obtenida fue de 9.2 ONPG/ $10^9$  células, esta es similar a la actividad máxima obtenida en células permeabilizadas con tolueno o cloroformo. La absorbancia del medio en UV no pudo correlacionarse con la actividad  $\beta$ -gal relativa. Esto puede adjudicarse a una disminución en las solubilidades de los componentes celulares liberados, en particular proteínas, debido a las altas concentraciones de etanol.

**Figura 2.3.** Efecto de la concentración de etanol y de la temperatura sobre la permeabilización de *K. lactis*.



Las células fueron resuspendidas en agua desionizada conteniendo 0.1 mM de  $Mn^{+2}$  y 50 mM de  $K^{+}$ . La concentración celular fue de  $8 \times 10^9$  células/ml, y el tiempo de incubación de 15 minutos. ●: Absorbancia a 260 nm del medio extracelular/ $10^9$  células; Δ: Actividad β-gal relativa. A: 5 °C; B: 30 °C; C: 37 °C.

### 2.3.3. Efecto del tratamiento de permeabilización sobre la viabilidad celular

La permeabilización, evaluada como actividad  $\beta$ -gal relativa, se correlacionó con la pérdida de viabilidad de las células tratadas (Tabla 2.3). Debido a que las sensibilidades de los ensayos de tinción y de recuento en placa, son diferentes, se observaron discrepancias cuando los recuento de células viables fueron muy bajos.

**Tabla 2.3.** Efecto del tratamiento de permeabilización sobre la viabilidad celular.

Tipo de célula	Tratamiento	Tiempo (min)	Actividad $\beta$ -gal relativa	Viabilidad celular Células teñidas <sup>a</sup>	UFC <sup>b</sup>	
Frescas	no tratadas	0	0	0	96	
		30	0.018	0	nd	
		EtOH 10%	30	0.08	12	90
		EtOH 10%+Cl <sub>3</sub> CH 0.5%	30	0.20	23	70
		EtOH 10%+Cl <sub>3</sub> CH 2%	30	1	100	2.63 10 <sup>-5</sup>
		Cl <sub>3</sub> CH 2%	30	1	100	1.16 10 <sup>-4</sup>
		EtOH 40%	20	1	100	0*
		CTAB 0.2%	30	0.564	81	28
		DOCH 0.2%	30	0.143	24	65
		Triton X-100 0.2%	30	0	1.6	nd
Congelado y descongelado	no tratadas	0	0.47	53	46	
		30	0.54	54	42	
		EtOH 10%+Cl <sub>3</sub> CH 2%	30	1	100	0*

La permeabilización se efectuó a 37 °C excepto el ensayo con etanol 40% que se realizó a 5 °C. Los tratamientos con detergentes, se efectuaron a temperatura ambiente (22 °C). En todos los casos la concentración celular fue del orden de 8 x 10<sup>9</sup> células totales/ml. EtOH: Etanol, DOCH: Desoxicolato de sodio, CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio. <sup>a</sup>: Tinción con azul de metileno porcentaje de células teñidas (no viables). <sup>b</sup>: Recuento de viables relación (%) entre unidades formadoras de colonia (UFC) y el recuento total. Los valores de UFC son el promedio de tres determinaciones. \*: No se detectaron colonias en la muestra sin diluir. nd: No determinado.

Este es el caso de la permeabilización con cloroformo, donde, a pesar de observarse la totalidad de células teñidas, los recuentos en placa muestran que algunas células permanecen viables y pueden replicarse. Por otro lado, el uso de una alta concentración de etanol produjo la pérdida total de la viabilidad celular.

Los resultados con células congeladas fueron similares a aquellos obtenidos con células frescas, pero los resultados en la muestra control, en la cual no se agregó ningún solvente, indicaron que el tratamiento físico es capaz de causar algún grado de permeabilización. Esto es consistente con el efecto de crioinjuria que puede observarse en células microbianas (Heckley, 1978). En este caso se obtuvo la mitad de la actividad  $\beta$ -gal máxima y la viabilidad se redujo en la misma extensión.

Resulta interesante comparar estos resultados con la permeabilización mediante detergentes, la cual ha sido empleada recientemente para medir diferentes actividades enzimáticas en células de levadura intactas (Joshi y col., 1987; Gowda y col., 1991; Laouar y col., 1992). El uso de detergentes catiónicos, tal como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), o aniónicos como desoxicolato de sodio (DOCH), provocó una menor actividad enzimática cuando se la compara con el tratamiento con solventes, pero la disminución en la viabilidad celular indica que la permeabilización fue elevada, especialmente con CTAB. Las células tratadas con detergentes neutros, tal como Triton X-100, no muestran actividad enzimática, lo cual fue en este caso consistente con un bajo grado de permeabilización, evaluada por tinción y por recuento en placa.

## 2.4. DISCUSION

La incorporación de lactosa por células de *K. lactis* ocurre a través de un sistema de permeasas (Dickson y Barr, 1983; Boze y col., 1987). En este caso la actividad con ONPG no puede detectarse en la célula entera, lo que indicaría que este sistema de permeasas no es activo para el transporte de ONPG, o que el mismo ocurre a muy baja velocidad, de modo que la actividad no puede detectarse en los tiempos de ensayo establecidos. Sin embargo, se observó difusión pasiva de este sustrato en células de *K. bulgaricus* viables sin crecimiento (van Hugh y Decleire, 1985). Este comportamiento, diferente en relación a la permeabilidad de la membrana al ONPG, puede deberse a las diferentes cepas empleadas, a la edad celular, y/o a las condiciones de cultivo (Serrano y col., 1973; Murakami y col., 1980).

Los resultados experimentales demuestran que, si se seleccionan las condiciones apropiadas de tiempo de incubación, temperatura, concentración de células y concentración de solventes, se puede obtener una efectiva permeabilización, en relación con la actividad  $\beta$ -gal, usando cloroformo, tolueno, o etanol.

Las concentraciones de cloroformo o tolueno necesarias para permeabilizar está en el intervalo 0.75 a 3.5%. Estos valores son más altos que las solubilidades de los solventes en agua (0.07 ml de tolueno y 0.55 ml de cloroformo cada 100 ml de agua a 20 °C). Esto sugiere que la permeabilización ocurre fundamentalmente por contacto directo entre la fase solvente y la membrana, lo que afirma el concepto de que la efectividad del solvente se correlaciona directamente con el coeficiente de partición lípido-buffer y no con la solubilidad del mismo en la fase acuosa (Leao y van Uden, 1984; Zavoico y Kutchai, 1980). Los resultados con etanol son consistentes con este concepto, ya que a pesar de su alta solubilidad en agua, se requieren altas concentraciones de solvente para alcanzar una permeabilización efectiva.

La efectividad de cloroformo y tolueno aumenta con la presencia de bajas concentraciones de etanol en la mezcla de incubación (en este estudio, 10%), y con el aumento de la temperatura de permeabilización. El efecto sinérgico en ambos casos puede asociarse con un cambio en la fluidez de la membrana, que la hacen más accesible a la acción de otros solventes. Es llamativa la inefectividad

del tolueno a temperaturas bajas (5 °C), no obstante ser a otras temperaturas el solvente más efectivo de los estudiados, ya que se requieren menores concentraciones para alcanzar la máxima actividad  $\beta$ -gal. Las causas de este comportamiento no pueden ser fácilmente explicadas.

Las células permeabilizadas con etanol muestran la misma actividad  $\beta$ -gal que las células tratadas con tolueno o cloroformo. Sin embargo, la temperatura es un factor crítico en la permeabilización con este solvente, debido a que la enzima se inactiva con altas concentraciones de etanol. La concentración de solvente efectiva para permeabilizar entre 5 y 30 °C fue de 40%, siendo interesante señalar que este valor es el mínimo requerido para que el etanol manifieste propiedades bactericidas (Laurence y Block, 1978). En este sentido Salton (1963); observó que la máxima solubilización de componentes celulares de bajo peso molecular en microorganismos Gram (+) y levaduras (*S. cerevisiae*) ocurría cuando las células eran expuestas a concentraciones de 50% (v/v) de etanol, siendo requeridas concentraciones mayores (75%) con los Gram (-). Es evidente, de estos resultados, que la pérdida de viabilidad ocasionada por el etanol en un rango de concentraciones moderadas (30 - 50%) debe ser atribuída a un efecto permeabilizante mas que a una desnaturalización de proteínas, ya que como se evidencia la actividad  $\beta$ -gal permanece constante.

Por otra parte se puede ver que el grado de permeabilización se asocia con la disminución en la viabilidad celular. La relación entre ambos fenómenos está vinculada a la pérdida de compuestos de bajo peso molecular que ocurre cuando la membrana celular es dañada.

Como, en las condiciones ensayadas, la  $\beta$ -gal se mantuvo estable durante los tratamientos con solventes, la actividad  $\beta$ -gal relativa (tomando como unidad el máximo valor obtenido) se puede correlacionar directamente con el grado de permeabilización de la suspensión celular. En otras palabras, la actividad relativa es un índice de la fracción de células que fueron efectivamente permeabilizadas. Estos valores coinciden en general con el porcentaje de células viables estimado por el método de tinción con azul de metileno.

La correlación entre actividad  $\beta$ -gal y células teñidas se mantuvo también para células permeabilizadas por congelamiento y descongelamiento, pero no así para el tratamiento con detergente catiónico (CTAB); lo cual sugiere que la

actividad  $\beta$ -gal fue afectada por el tratamiento. Los ensayos con Triton X-100 y DOCH muestran una baja actividad  $\beta$ -gal, que fue consistente con un bajo grado de permeabilización, lo cual indica que el tratamiento fue en estos casos inefectivo.

Si bien estos resultados se obtuvieron con la cepa CBS 683 cultivada en batch hasta fase estacionaria, se efectuaron diferentes experiencias con otras cepas de *K. lactis* (por ejemplo NRRL 1118, CBS 2360, NRRL 1140), y con cepas de *K. fragilis* (NRRL 1109). En todos los casos se ensayaron dos condiciones de permeabilización. La concentración celular usada fue  $5 - 8 \times 10^9$  células/ml. Las condiciones ensayadas fueron: incubación 30 min a 37 °C con 10% de etanol y 2 - 2.5% cloroformo, e incubación 15 a 30 min a 5 °C con 40% de etanol. En todos los casos la permeabilización fue efectiva comparada con los datos de actividad  $\beta$ -gal obtenidos por desintegración mecánica de las células. Los resultados obtenidos pueden también extenderse a otras actividades enzimáticas; de todos modos, para cada enzima en particular se debe verificar si existe desactivación debida a los solventes o a las condiciones de reacción seleccionadas.



---

**CAPITULO 3**

**ESTABILIZACION DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA EN  
CELULAS PERMEABILIZADAS MEDIANTE  
TRATAMIENTO CON GLUTARALDEHIDO**

---

### 3.1. INTRODUCCION

La obtención de un biocatalizador basado en células no viables requiere, en general, de un tratamiento que establezca la actividad enzimática y preserve la integridad de la célula inactivada. Esto es debido a que la destrucción de la viabilidad produce un sistema inestable que conduce, con el tiempo, no solo a la solubilización de los componentes celulares, sino también a la desactivación del catalizador debida, por ejemplo, al ataque por proteasas endógenas o bien porque el medio extracelular es más desfavorable para la estabilidad enzimática. El proceso habitual de estabilización consiste en tratar a las células con reactivos bifuncionales capaces de unir covalentemente los diferentes componentes celulares, de modo tal de obtener una estructura "fija" que no permita la solubilización de la proteína de interés y que frene el proceso autolítico. Estos reactivos se conocen como agentes de entrecruzamiento o *cross-linking*, siendo el de uso más difundido el glutaraldehído (GA).

La difusión de este procedimiento queda evidenciada cuando se analizan los distintos métodos de inmovilización empleados en procesos industriales (Tabla 1.1). En la Tabla 3.1 se muestran ejemplos de reacciones catalizadas por células no viables tratadas con agentes bifuncionales, así como las condiciones empleadas en el tratamiento con el agente. Puede apreciarse que las condiciones de reacción como temperatura, concentración de reactivo ligante y tiempos de incubación difieren bastante en los diferentes tratamientos presentados.

Además de esta aplicación el glutaraldehído ha sido utilizado para insolubilizar enzimas previamente precipitadas con sales o solventes orgánicos, así se han preparado derivados insolubles de tripsina, carboxipeptidasa A, y papaina (Habeeb, 1967; Jansen y Olson, 1969), también se ha empleado para inmovilizar enzimas en diversos soportes (Goldstein y Manecke, 1976). Su uso en la estabilización de enzimas en células no viables puede considerarse un caso particular a su empleo más generalizado en la fijación de tejidos para microscopía electrónica.

La química de la reacción entre GA y proteínas no es sencilla. El GA reacciona fundamentalmente con los grupos aminos de las proteínas, tales como los presentes en residuos de lisina e hidroxilisina, aunque también presenta la

capacidad de unirse a grupos funcionales como sulfhidrilos e imidazol (Habeeb y Hiramoto, 1968; Hardy y col., 1976; Ukeda y col., 1986).

**Tabla 3.1.** Algunos ejemplos de enzimas estabilizadas en células mediante el uso de agentes ligantes.

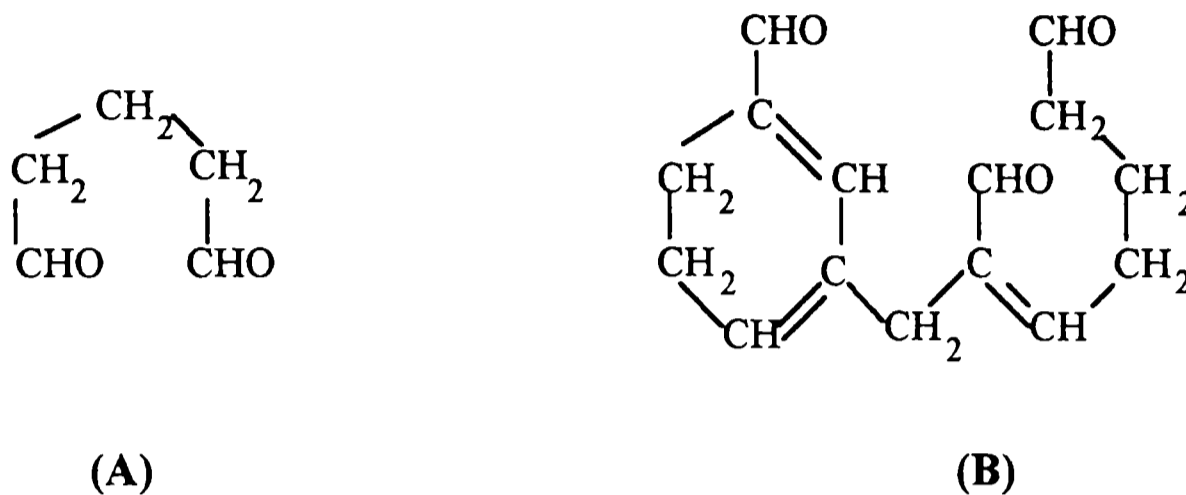
Reacción enzimática o producto	Microorganismo	Tratamiento de estabilización			Referencias
		Reactivos	Temp	Tiempo X	
Hidrólisis de inulina	<i>K. fragilis</i>	0.5% GA	23 °C	3.5 h	19 Workman y col., 1984
Hidrólisis de sacarosa	<i>S. cerevisiae</i>	1% Formaldehído 5% gelatina	-28 °C	4 h	5 Dhulster y col., 1983
		2% GA 2% PEI	23 °C	1 h	80 Hasal y col., 1992
Obtención de ácido 6-amino penicilánico	<i>E. coli</i>	1% GA	25 °C	1 h	15 Prabhune, 1992
Obtención de fructosa 1-6 difosfato	<i>S. carlsbergensis</i>	0.25% GA 1% albúmina	28 °C	nd	70 Bisso y Melelli, 1986
Hidrólisis de lactosa	<i>K. lactis</i>	0.4% GA	4 °C	15 min	1.7 Champluvier y col., 1989

X: Concentración celular (g/l), GA: Glutaraldehído, PEI: Polietilenimina, nd: No suministrado.

Las soluciones de glutaraldehído están compuestas por una mezcla de monoglutaraldehído libre y diversos productos de polimerización (Korn y col., 1972). Las soluciones acuosas de monoglutaraldehído polimerizan lentamente mediante condensación aldólica formándose estructuras  $\alpha,\beta$  insaturadas (Figura 3.1), el grado de polimerización puede obtenerse midiendo las absorbancias a 233 y 285 nm, ya que el monoglutaraldehído absorbe fuertemente a 285 nm, este pico de absorción es provocado por el enlace C=O, con un coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ):  $4.2 \times 10^{-2} \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y el polímero presenta un pico de absorción

adicional a 233 nm con un  $\epsilon$ :  $18.6 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Este pico de absorción adicional es debido al doble enlace C=C (Margel y Rembaum, 1980; Ukeda y col., 1986).

**Figura 3.1.** Estructuras presentes en una solución de glutaraldehído.



(A): Monoglutaraldehído; (B): Polímero de condensación; adaptado de Richards y Knowles (1968).

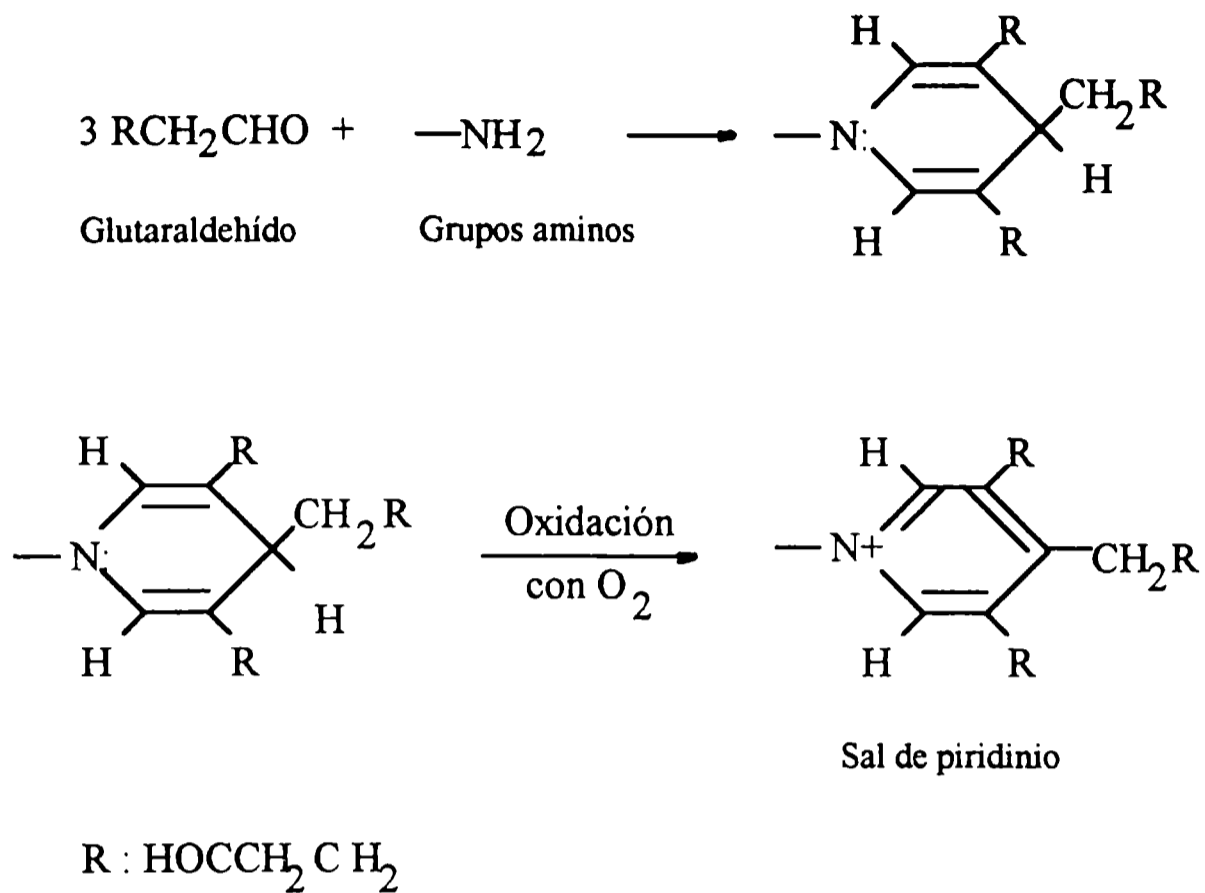
Existe cierta controversia acerca de la identidad de la especie química interviniente en la reacción con los grupos aminos de proteínas. El trabajo de Richards y Knowles (1968) sugiere que la especie reactiva es el polímero de condensación y que el grupo amino formaría un compuesto de adición al doble enlace del compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$  insaturado. Sin embargo, trabajos posteriores indican que la especie reactiva es el glutaraldehído libre y no el polímero de condensación (Korn y col., 1972; Hardy y col., 1976). El mecanismo de reacción propuesto por Hardy y col. (1976) indica que, aunque la reacción entre el aldehído y el grupo amino es simple y comenzaría con la formación de una base de Schiff, condensaciones posteriores con otras moléculas de aldehído formarían dihidropiridinas que se oxidan luego (consumiendo oxígeno) a sales de piridinio. Estas sales de piridinio (cromóforos) generan el color característico amarronado que se observa en las soluciones después de la reacción. Condensaciones posteriores del cromóforo con otras moléculas de glutaraldehído y residuos de lisina dan lugar a la formación de una estructura polimérica, siendo ésta el verdadero producto del entrecruzamiento. En la Figura 3.2 puede verse el mecanismo de reacción propuesto. La estructura así formada explicaría las propiedades de los productos de reacción entre GA y proteínas,

como por ejemplo su fuerte estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura, lo que no es observable en una simple base de Schiff. La desaparición de grupos aminos y su reemplazo por el grupo fuertemente básico dado por el sistema piridinio cuaternario, hacen que el cromóforo formado sea susceptible a ataque por nucleófilos, tales como borohidruros, hidróxidos y bisulfito de sodio.

Debido a su complejidad es difícil plantear una estequiometría para la reacción global. Ukeda y col. (1986) proponen una relación de 2 moles de glutaraldehído por mol de grupo amino, aunque un trabajo posterior de los mismos autores menciona una relación de 3 moles de glutaraldehído por mol de grupo amino (Ukeda y col., 1991). La misma estequiometría es propuesta por Hardy y col. (1976), usando como modelo la reacción entre glutaraldehído y  $\alpha$ -N-acetil-lisina. Korn y col. (1972) plantean en cambio una relación de 4 moles de glutaraldehído por mol de lisina e hidroxilisina. Habeeb y Hiramoto (1968) usan una relación de 5 moles de glutaraldehído por mol de amino para la insolubilización de seroalbúmina bovina.

Muy poco se ha descrito acerca de la velocidad con que transcurre la reacción. A temperatura ambiente parece ser rápida. Por ejemplo la carboxipeptidasa A se insolubiliza totalmente luego de una hora de incubación en presencia de 1% de GA. (Richards y Knowles, 1968). Habeeb y Hiramoto (1968) presentan datos acerca de la disminución de grupos amino y sulfhidrilo libres durante el tratamiento de distintos polipéptidos con glutaraldehído a temperatura ambiente. Los datos indican que la reacción de los grupos amino terminales,  $\epsilon$ -amino y sulfhidrilo se completa en 30 minutos. En el caso de proteínas se verifica una disminución del 80% de los grupos amino libres en el mismo tiempo de reacción. Los datos de la Tabla 3.1 indican que la estabilización puede lograrse en tiempos de reacción que oscilan entre 15 minutos y 4 hs. Hardy y col. (1976) observaron que la reacción posterior de oxidación puede demorar hasta siete días en completarse. Sin embargo el efecto de esta reacción sobre la estabilidad del sistema no ha sido establecido.

**Figura 3.2.** Mecanismo de reacción entre glutaraldehído y grupos aminos.



Adaptado de Ukeda y col. (1991)

Considerando el tipo de reacción entre el GA y las proteínas es evidente que la misma puede provocar también la desactivación de la enzima. En este sentido, muy poco ha sido publicado acerca de la influencia que las condiciones de proceso tienen sobre la reacción entre GA y proteínas y el efecto en el producto final.

En relación a la  $\beta$ -gal de levaduras, existen pocas referencias bibliográficas sobre el uso del GA en la estabilización de la enzima en células permeabilizadas. Weckström y col. (1980) observaron una marcada disminución de la actividad  $\beta$ -gal en células de *K. lactis* tratadas con el agente ligante. En un trabajo más reciente Champluvier y col. (1988b) obtienen rendimientos del 85% luego del tratamiento, y una disminución del 40 - 45% en la actividad luego de incubar las células durante 22 h a 30 °C. Con excepción de estos antecedentes no existe otra información disponible.

En el presente Capítulo se presentan los resultados obtenidos en relación al uso de GA como agente ligante para estabilizar y confinar la  $\beta$ -gal en células permeabilizadas de *K. lactis*.

## 3.2. MATERIALES Y METODOS

### 3.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

El estudio se realizó con la cepa de *K. lactis* NRRL 1118, ya que la misma permitió obtener una alta actividad  $\beta$ -gal en cultivos continuo limitado en carbono (Inchaurrondo y col., 1994).

El mantenimiento de la cepa fue el mismo que el descrito en el capítulo anterior.

La composición del medio sintético usado en continuo fue (en g/l): lactosa 25;  $\text{CINH}_4$ , 5;  $\text{NaPO}_4\text{H}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 3;  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.3; KCl, 1.6;  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.2;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 y ácido fólico, 1.5 mg; solución *stock* de vitaminas, 1.5 ml, solución *stock* de micronutrientes, 1 ml. La solución de lactosa y los fosfatos se esterilizaron en autoclave, por separado, mientras que la solución de vitaminas se esterilizó por filtración. La solución *stock* de vitaminas se mantuvo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso; su composición fue la siguiente (g/l): pantotenato de calcio, 4; niacina, 12; piridoxina-HCl 1; tiamina-HCl, 2; ácido p-aminobenzoico, 1; biotina, 0.06; inositol, 70. La solución *stock* de microelementos usada fue la siguiente (g/l):  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5;  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 3;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.75;  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.15; ácido cítrico, 50;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.65;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 0.1; IK, 0.1.

Para el desarrollo de la fermentación se tomaron células del cultivo *stock* las que se repicaron en medio de mantenimiento. Luego de incubar 72 h, el desarrollo se utilizó para inocular un erlenmeyer de un litro, con baffles, conteniendo 100 ml del medio sintético. El valor del pH inicial fue 4.7. El cultivo se incubó en agitador rotatorio a 200 rpm, durante 10 - 12 h luego de lo cual se empleó para inocular un fermentador (1601 Ultroferm LKB) conteniendo dos litros de medio de cultivo. Después del crecimiento inicial en batch, el

cultivo continuo se mantuvo a una velocidad de dilución de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , agregando medio fresco mediante una bomba peristáltica. El control del pH ( $4.7 \pm 0.1$ ) se realizó usando NaOH 0.8 N. La agitación se mantuvo en 600 rpm y el caudal de aire 70 l/h ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 101 kPa). El crecimiento fue limitado en carbono y estrictamente aeróbico. En todos los casos los cultivos se efectuaron a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . El rendimiento celular fue de alrededor de 0.49 g de biomasa/g lactosa y la actividad  $\beta$ -gal  $6.9 \pm 0.35$  ONPG/mg de biomasa. Una unidad ONPG (condición de ensayo estándar, Sección 2.2.6.1.) corresponde aproximadamente a  $0.90 \pm 0.05$  unidades, medidas en las condiciones descritas por Dickson y col. (1979). Por lo tanto un miligramo de proteína  $\beta$ -gal corresponde a 154 unidades ONPG. El contenido de proteína en la biomasa fue  $46 \pm 2\%$ , representando la  $\beta$ -gal el 10 - 12% de la proteína total de la célula. Un miligramo de biomasa seca corresponde a  $2 \pm 0.2 \times 10^8$  células.

Para la obtención de biomasa, el efluente del fermentador se recolectó durante 2 a 4 h en un frasco sumergido en baño de hielo. Las células se centrifugaron (3 000g, 10 min), se lavaron dos veces con agua destilada fría y se congelaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . No se observó disminución de la actividad enzimática al menos durante un año de almacenamiento .

### **3.2.2 Reactivos y soluciones**

El glutaraldehído empleado (solución al 25% estabilizada para microscopía electrónica) fue de Merck. La concentración de aldehído medida por el método de titulación mercurimétrica indica una concentración de glutaraldehído 9.7 N ó 2.43 M. La solución contenía menos de 0.4% de aldehído en forma de polímero, lo que se evaluó midiendo la absorbancia a 233 nm. La hexametildiamina (HMDA) fue Sigma. Los demás reactivos fueron de grado analítico. Los buffers empleados fueron PPB-Mn 20 y PPB-Mn 50 (20 o 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ajustado a pH 6.6 con  $\text{ClH}$ , conteniendo 0.1 mM de  $\text{MnCl}_2$ ).



### **3.2.3 Permeabilización y tratamiento con glutaraldehído**

Para el tratamiento de permeabilización la biomasa se descongeló a temperatura ambiente y luego se resuspendió en PPB-Mn 50 a una concentración aproximada de 80 g/l ( $4 \times 10^{10}$  células/ml). Luego se adicionó etanol (10%) y cloroformo (2.5%) y la suspensión se incubó entre 15 y 30 min a 37 °C. Una vez permeabilizadas, las células fueron centrifugadas a 5 °C, (3 000g, 10 minutos), lavadas una vez con igual volumen de buffer frío y mantenidas a 5 °C hasta su uso.

El tratamiento con glutaraldehído fue realizado agregando un volumen de solución de GA (preparada en buffer PPB-Mn 50) a nueve volúmenes de la suspensión de células permeabilizadas. La suspensión se mantuvo a la temperatura seleccionada con agitación continua.

Para la determinación de la actividad  $\beta$ -gal durante el tratamiento con GA, la suspensión celular fue diluida 100 - 200 veces en PPB-Mn 50 frío, y la actividad residual se midió por el método de ONPG. Para los estudios de estabilidad, las células tratadas se lavaron dos veces con buffer y se resuspendieron en PPB-Mn 50 conteniendo 0.15 - 0.2% de metilparabeno como bacteriostático. La concentración celular en estos ensayos fue de 15 - 20 g/l ( $3 - 4 \times 10^9$  células/ml).

### **3.2.4. Determinaciones analíticas**

La actividad  $\beta$ -gal usando como sustrato ONPG se determinó de acuerdo al método descrito en la Sección 2.2.6.1. En este caso el sustrato se preparó en PPB-Mn 20.

La concentración de glutaraldehído se determinó por la técnica de oxidación mercurimétrica (Ruch y Johnson; 1956). En las mezcla de reacción con células el reactivo se valoró en el sobrenadante que se obtuvo luego de centrifugar 0.5 ml de la suspensión (14 000g, 15 seg en microcentrífuga). El sobrenadante se congeló a -20 °C hasta la determinación.

Los grupos amino libres se evaluaron con TNBS de acuerdo al procedimiento descrito por Adler-Nissen (1979). La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col. (1951).

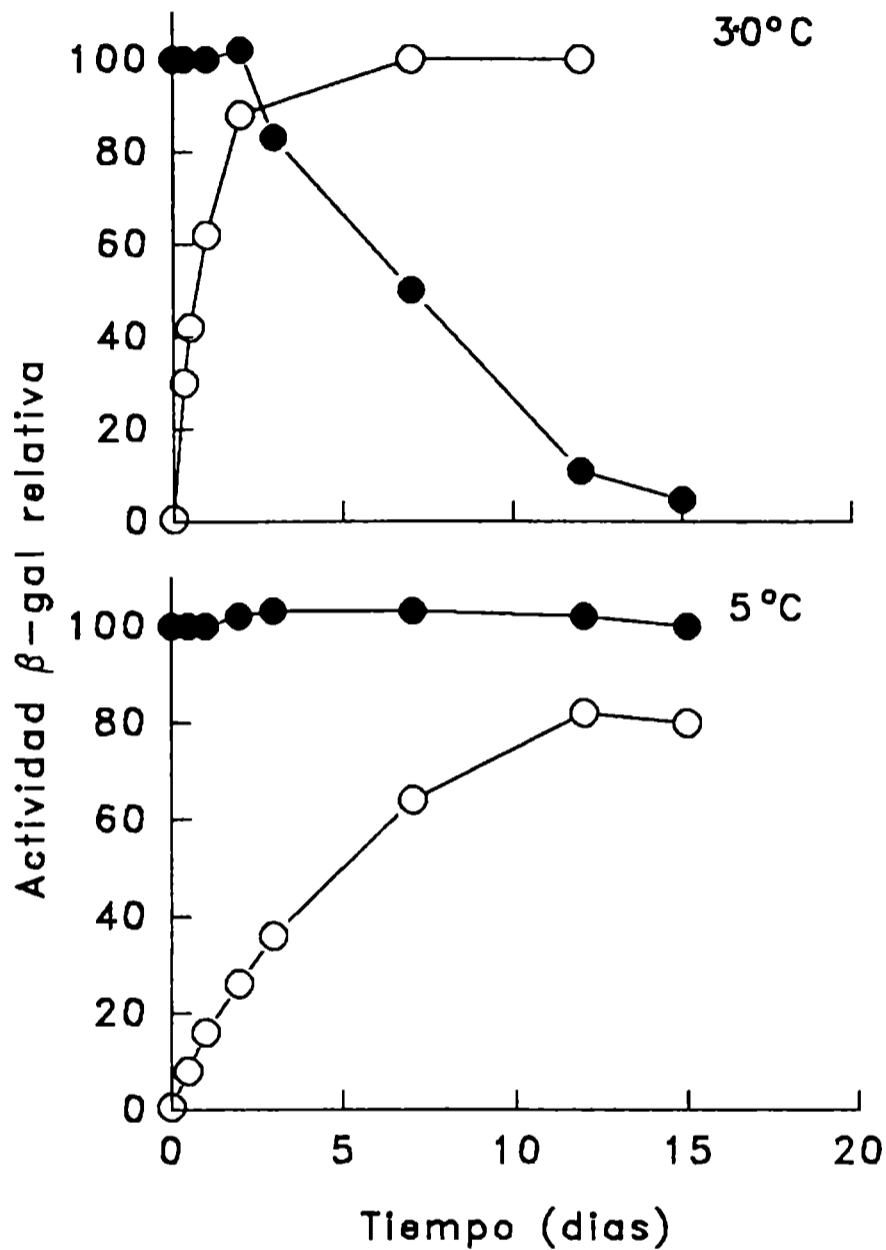
### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Estabilidad de $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas

Como fuera mencionado en el capítulo anterior, una vez que la célula ha sido permeabilizada, los diferentes componentes intracelulares, entre ellos las proteínas, comienzan a difundir al medio extracelular. Para evaluar esta situación se realizó un estudio sobre el proceso de "solubilización" de la  $\beta$ -gal y la estabilidad de la enzima en el sistema de células permeabilizadas. Este conocimiento es útil para evaluar posteriormente la efectividad del tratamiento con el agente ligante. Para tal fin, se realizaron experiencias en las cuales se incubaron suspensiones de células permeabilizadas en buffer a dos temperaturas (5 y 30 °C). Con el objeto de evitar la contaminación microbiana se empleó metilparabeno (0.15 - 0.2%) que demostró no afectar la actividad de la enzima. Las suspensiones se incubaron en forma estática homogeneizándolas cada 24 hs. Los resultados se presentan en la Figura 3.3. En la misma puede verse que la  $\beta$ -gal difunde al medio extracelular, siendo la velocidad de liberación mucho menor a 5 °C. A esta temperatura el 80% de la actividad  $\beta$ -gal está presente en el sobrenadante luego de 15 días de incubación y la actividad total permanece constante.

A 30 °C la solubilización de  $\beta$ -gal ocurrió dentro de las 48 h de incubación, observándose luego de dicho período una continua disminución de la actividad enzimática, que desaparece casi en su totalidad a los 15 días de incubación. La inactivación no es de origen térmico ya que, a esta temperatura y en el buffer utilizado, la enzima es estable en el período de incubación seleccionado (Voget y col., 1994). Un factor de inestabilidad puede ser la actividad proteolítica endógena que se evidencia en el proceso de autólisis. En levaduras este fenómeno es ampliamente conocido (Hough y Maddox, 1970; Breddam y Beenfeldt, 1991). Esto fue parcialmente confirmado ya que a 30 °C se observó un incremento de la concentración de grupos aminos libres en el medio extracelular (los valores medidos a las 24 hs y a los 7 días de incubación fueron 21 mM y 42 mM respectivamente), lo que no sucedió a 5 °C. Este resultado es consistente con el hecho de que la actividad proteolítica disminuye marcadamente a bajas temperaturas.

**Figura 3.3.** Actividad y localización de  $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas e incubadas en buffer a 5 y 30 °C.



Las células permeabilizadas se incubaron en PPB-Mn 50 mM conteniendo 0.15-0.2% de metilparabeno. Concentración celular:  $4 \times 10^9$  células/ml. La incubación se realizó en forma estática durante 15 días. Se homogeneizó cada 24 horas. ●: Actividad  $\beta$ -gal total, relativa al valor inicial. ○: Actividad  $\beta$ -gal en sobrenadante, relativa al correspondiente valor total.

En una experiencia posterior la suspensión celular se incubó 24 h a 30 °C, luego de lo cual se centrifugó. El sobrenadante (extracto), conteniendo el 60 - 70% de la  $\beta$ -gal, se incubó 7 días a 5 y 30 °C. El comportamiento del sistema fue similar al observado cuando se incubó la suspensión. Se puede inferir entonces que uno de los factores que causan la pérdida de actividad  $\beta$ -gal se solubiliza conjuntamente con la enzima.

Cabe por otra parte destacar que experiencias realizadas con suspensiones incubadas con agitación constante (200 rpm) mostraron un aumento en la velocidad de liberación de  $\beta$ -gal a ambas temperaturas del orden de 20 y 30%.

### **3.3.2. Efecto de las condiciones del tratamiento en la estabilización y confinamiento de $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas**

El tratamiento con glutaraldehído de las células permeabilizadas fue estudiado con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

- Estabilizar la actividad enzimática dentro de la célula.
- Obtener una mínima desactivación del catalizador.

Estos aspectos fueron estudiados en función de las diferentes condiciones de reacción. Para minimizar la pérdida de actividad debido a la liberación de  $\beta$ -gal, el paquete celular fue mantenido en baño de hielo, por un período no mayor de dos horas, entre la permeabilización y el tratamiento con el agente ligante. La estabilidad del sistema tratado se evaluó midiendo la actividad total y extracelular de  $\beta$ -gal en suspensiones incubadas 15 días a 30 °C. En estos ensayos se incluyó un testigo con células no tratadas para confirmar la inestabilidad del sistema permeabilizado.

#### **3.3.2.1. Efecto de la temperatura**

En una primera serie de experiencias se incubaron, a distintas temperaturas, células permeabilizadas, cuya concentración fue aproximadamente 50 g/l, con una concentración de GA fija. El pH seleccionado para la reacción

fue 6.6 debido a que a este pH la enzima presenta alta estabilidad, y al hecho que la velocidad de reacción entre GA y proteínas es máxima a pH cercanos a 7 (Habeeb y Hiramoto, 1968; Goldstein y Manecke, 1976). Para seleccionar la concentración de glutaraldehído se consideró inicialmente la relación GA/amino usadas con proteínas en solución (Habeeb y Hiramoto, 1968; Ellar y col., 1971; Workman y Day 1984). Los valores empleados indican una relación de concentración GA/aminos del orden de 4/1 a 10/1, que es del mismo orden o mayor que la determinada por la estequiometría de la reacción. Generalmente, para las concentraciones de proteínas utilizadas, los valores de GA son del orden de 0.5% (50 mM). Por lo tanto, para la concentración celular seleccionada, y teniendo en cuenta el contenido de lisina descrito en la bibliografía para *K. fragilis* (*K. marxianus* var. *marxianus*),  $8.62 \pm 1.69$  gr de lisina/100 gr de proteína (Reed y Pepler, 1973), la concentración de grupos amino en la mezcla de reacción sería del orden de 13 mM. Por lo tanto la concentración de glutaraldehído requerida sería de, al menos, 40 mM en la mezcla de reacción. Sin embargo en este caso la enzima no se encuentra dispersa en el medio de reacción, sino que está confinada dentro del espacio celular, que es donde efectivamente ocurrirá la reacción. Si se considera que la célula tiene un 35% de materia seca, una densidad de  $1 \text{ g/cm}^3$ , y que la proteína está homogéneamente distribuida en la célula, entonces la concentración de grupos amino disponibles en la matriz celular sería del orden de 90 mM. Surge del dato calculado que, para obtener una alta relación GA/amino en el interior celular, se requeriría una concentración elevada de GA en el medio de reacción. En este sentido, debido al tamaño celular y a la alta difusividad del GA, puede suponerse que, si bien el GA se adiciona a la solución, este difundirá rápidamente dentro de la célula. Dicho de otro modo, se asume que la reacción entre GA y proteínas estará controlada por la velocidad de reacción y no por la difusión del reactivo. Estudios preliminares realizados a temperatura ambiente con concentraciones de GA del orden de 250 mM, mostraron una desactivación prácticamente instantánea de la enzima. Debido a ello el valor inicial seleccionado fue del orden de 0.5% que es el comúnmente usado para la estabilización de proteínas en solución.

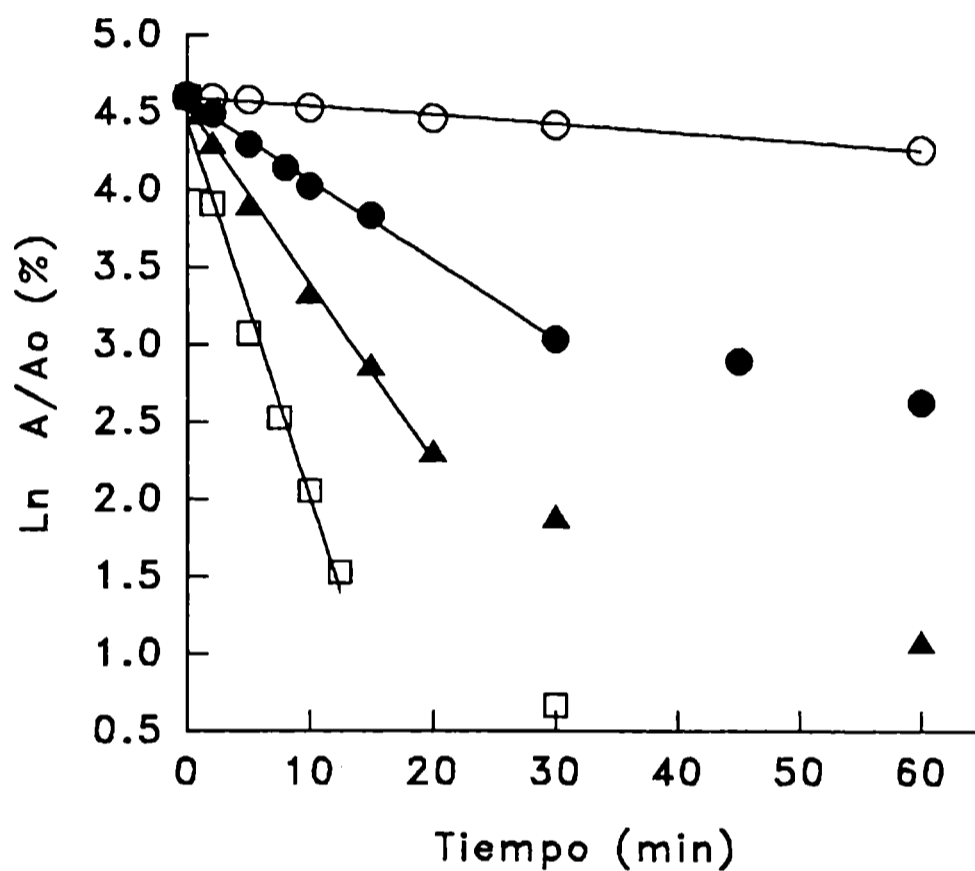
En la Figura 3.4 se muestra la evolución de la actividad  $\beta$ -gal con el tiempo de incubación a diferentes temperaturas, para la concentración de GA inicialmente seleccionada. Puede observarse una disminución de la actividad  $\beta$ -gal a todas las temperaturas ensayadas, la cual sigue en su mayor parte una cinética de primer orden respecto a la concentración de enzima. Las constantes

cinéticas de la reacción de desactivación mostraron una dependencia del tipo Arrhenius con la temperatura, lo que confirma que la difusión del GA no es la etapa controlante de la reacción. El valor de la energía de activación para la desactivación mediada por GA fue de 16.7 kcal/mol. La disminución exponencial de la actividad  $\beta$ -gal sugiere una pérdida efectiva de catalizador por inactivación química, mas que una disminución de la actividad debida a modificaciones de las propiedades cinéticas de la enzima o a la aparición de problemas difusionales durante la medida de actividad. Esto fue en parte confirmado determinando el efecto de la concentración de ONPG sobre la velocidad de reacción. Para este estudio se usaron células que fueron incubadas 8 - 10 minutos a temperatura ambiente con el agente ligante, que mostraron una disminución del 37 - 40% en la actividad de la enzima. La representación de Eadie-Hofstee resultó lineal en todo el intervalo de concentraciones de sustrato ensayado (1 a 50 mM de ONPG), lo que indica que la velocidad de hidrólisis está controlada por la velocidad de la reacción enzimática y que no existe control difusional. De estos mismos datos se calculó un valor de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de  $3.7 \pm 0.6$  mM y un valor de  $V_{max}$  de  $74.7 \pm 9 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de ONPG/min  $10^9$  células.

Los parámetros obtenidos con células permeabilizadas sin tratamiento con glutaraldehído fueron  $K_m$ :  $3.3 \pm 0.41$  mM y  $V_{max}$ :  $129.2 \pm 0.01$   $\mu$ moles de ONPG/min  $10^9$  células. El valor de  $K_m$  para las células tratadas es del mismo orden que el estimado por Champluvier y col. (1988b) en estudios realizados con la cepa CBS 683 ( $K_m$ :  $4.2 \pm 0.1$  mM).

No hay antecedentes bibliográficos referidos al consumo de GA durante la reacción con proteínas, y en la mayoría de los estudios realizados con proteínas en solución se analiza la disminución de grupos amino y sulfhidrilo. Para el tratamiento de células con GA, es difícil medir los grupos amino residuales, ya que la matriz celular es un medio no soluble. Por lo tanto, para analizar la extensión de la reacción entre las proteínas celulares y el GA, se midió la concentración de GA residual en la mezcla de reacción.

**Figura 3.4.** Efecto de la temperatura y tiempo de reacción sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el tratamiento de células permeabilizadas con glutaraldehído.



Las células permeabilizadas se resuspendieron en PPB-Mn 50 mM. La concentración celular fue: 50 g/l ( $10^{10}$  células/ml). A: Actividad a tiempo t;  $A_0$ : Actividad inicial. La concentración inicial de glutaraldehído en mezcla de reacción fue:  $43.4 \pm 3.1$  mM. Temperatura de incubación ○: 0 °C, ●: temperatura ambiente (22 °C), ▲: 30 °C, □: 37 °C.



En la Tabla 3.2 se muestran los valores determinados para ensayos realizados bajo distintas condiciones de incubación.

**Tabla 3.2.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa y concentración residual de glutaraldehído en mezclas de reacción para tratamientos realizados a diferentes temperaturas.

Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación (min)	Actividad $\beta$ -gal <sup>a</sup>	Concentración de GA (mM) <sup>b</sup>
0	0	100	43.4
	30	83.7	nd
	60	72	39.3
22 (ambiente)	30	22.7	36.4
30	30	6.5	42.4
37	30	1.95	35.9
Control (0 - 37 °C)	60	100	0

<sup>a</sup>: Actividad  $\beta$ -gal medida después del tratamiento con GA, valores relativos a la muestra control (34.9 ONPG/10<sup>9</sup> células). <sup>b</sup>: Concentración de GA residual luego del tratamiento. Los valores representan el promedio de tres determinaciones. Control: suspensión de células permeabilizadas sin tratamiento con GA. nd: No determinado.

De acuerdo a las condiciones utilizadas para la determinación de glutaraldehído por el método de oxidación mercurimétrica, el error estándar en la determinación es alrededor de 2 mM de GA. Por lo tanto las diferencias entre el valor inicial adicionado y el residual en las distintas muestras no puede determinarse como significativas. Más aún, incubaciones prolongadas de las mezclas no modificaron sustancialmente la concentración residual de GA. Es

evidente que el consumo de reactivo es reducido, en relación al inicialmente esperado por la estequiometría de la reacción, y no es posible establecer una relación entre la concentración residual de GA y la disminución de la actividad  $\beta$ -gal.

Por otro lado queda por establecer el efecto del tratamiento sobre la retención y estabilidad de  $\beta$ -gal. Esto fue evaluado incubando las células tratadas durante 15 días a 30 °C. En la Tabla 3.3. se muestran los resultados obtenidos. Puede apreciarse que el tratamiento con GA logró efectivamente confinar la actividad de la enzima en la célula permeabilizada. Además, dicha actividad se mantiene estable.

Los datos sugieren que existe un mínimo grado de reacción que permite retener y preservar la enzima dentro de la célula inactivada, pero la misma genera una pérdida de actividad del orden de 15 a 20%. La velocidad con que se logra dicho efecto depende de la temperatura. Así para 2 - 5 minutos de tratamiento a temperatura ambiente, se logra el mismo efecto estabilizante que incubando la mezcla durante 30 a 60 minutos a 0 °C.

La solubilización de la  $\beta$ -gal en aquellas muestras que fueron incubadas a 0 °C por tiempos menores que 30 minutos permite inferir que el tratamiento con GA fue insuficiente. En las mismas puede observarse también una pérdida progresiva de la actividad enzimática. En este sentido el comportamiento es similar al observado cuando se incuban las células permeabilizadas sin tratamiento. Sin embargo la desactivación es progresivamente menor a medida que se incrementa el tiempo de incubación, lo que está indicando que la reacción inhibe rápidamente el proceso que conduce a la desactivación enzimática, el cual, como se mencionó anteriormente, estaría mediado por proteólisis.

### **3.3.2.2. Efecto de la concentración de glutaraldehído**

El efecto del tratamiento con agentes ligantes se realizó, en el ensayo anterior, con una concentración de GA fija. A continuación de este estudio se determinó el posible efecto de la concentración del reactivo sobre el proceso de estabilización.

**Tabla 3.3.** Efecto de la temperatura y el tiempo de incubación con glutaraldehído sobre la retención y la estabilidad de  $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas.

Condiciones de tratamiento con GA		Actividad $\beta$ -gal		
Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (min)	Inicial <sup>a</sup>	Residual <sup>b</sup>	
		T	T	E(%)
0	2	98.5	20	50
	5	97.2	85	51.3
	10	94.4	91	17.0
	20	91.8	98	1.87
	30	83.7	100	0.3
	60	72.0	100	0
Ambiente (22 °C)	2	89	100	0.5
	5	72.9	100	0
	8	62.8	100	0
	10	55.9	100	0
30	1	87.7	100	0
	5	49.0	100	0
Control	0	100	4.2	100

<sup>a</sup>: Actividad inicial total (T) en la suspensión después del tratamiento con GA; valores relativos a la muestra control (34.9 ONPG/10<sup>9</sup> células). Tratamiento con GA: Concentración celular 50 g/l (10<sup>10</sup> células/ml) en PPB-Mn 50, concentración inicial de GA 43.2 ± 3.1 mM.

<sup>b</sup>: Ensayo de estabilidad. T: Actividad total después de 15 días de incubación a 30 °C, valores relativos a la actividad inicial respectiva. E: Actividad extracelular, expresado como porcentaje de la actividad total. La concentración celular fue 20 g/l en PPB-Mn 50 conteniendo 0.15% de metilparabeno. Control: Suspensión de células permeabilizadas sin tratamiento con GA.

El ensayo se realizó a 0 °C (60 minutos de incubación) y a temperatura ambiente (30 minutos de incubación). La concentración celular fue la misma que en el ensayo anterior (50 g/l) y el intervalo de concentraciones de GA estudiado varió, según la temperatura, entre 5 y 300 mM.

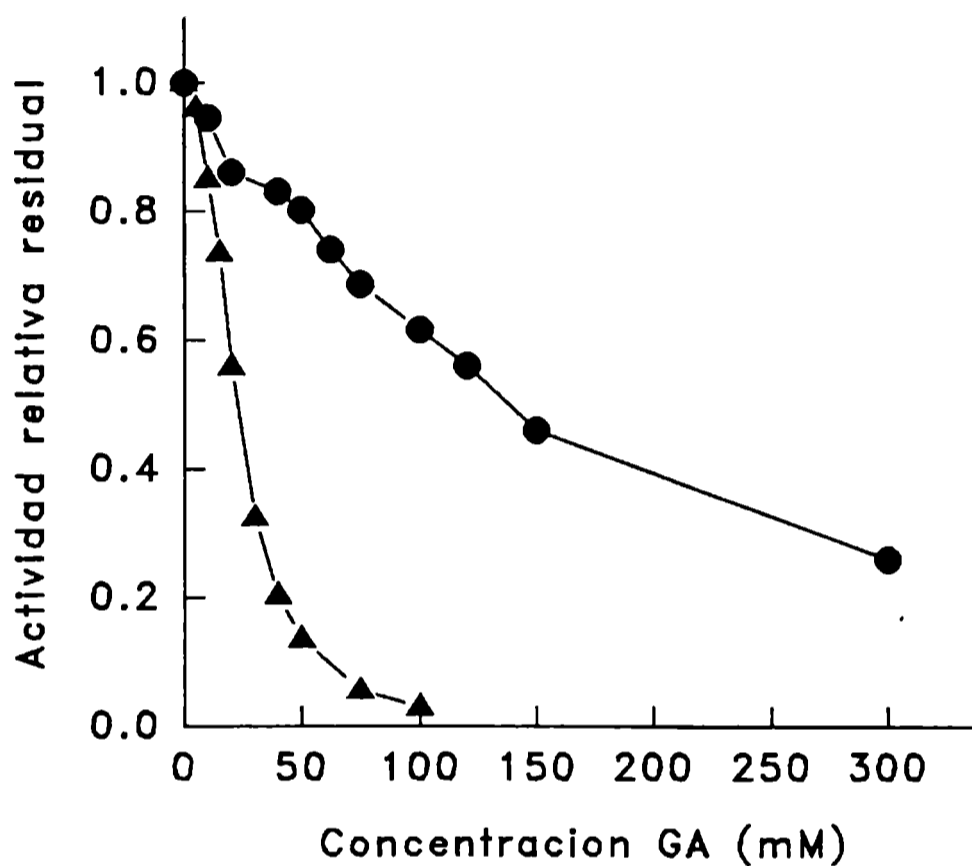
En la Figura 3.5 se representa la actividad  $\beta$ -gal obtenida luego de incubar las células con diferentes concentraciones del reactivo ligante. Los valores de GA mostrados en el gráfico corresponden a los valores teóricos inicialmente adicionados. Los resultados indican un incremento de la desactivación del catalizador a medida que aumenta la concentración del reactivo ligante para todo el rango de concentraciones estudiadas. La relación entre la concentración de reactivo ligante y la desactivación es prácticamente lineal en el intervalo de concentraciones de GA entre 40 y 120 mM, cuando las células se incubaron a 0 °C. El mismo comportamiento se observa cuando las células son incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con concentraciones de GA entre 10 y 25 mM.

En la Tabla 3.4 se representan los datos de estabilidad del sistema evaluado luego de 15 días de incubación a 30 °C. El comportamiento es similar al observado en el ensayo anterior. La mínima concentración de glutaraldehído requerida para retener y estabilizar la enzima luego de incubar una hora a 0 °C fue de alrededor de 40 a 60 mM, mientras que a temperatura ambiente (22 - 23 °C), y un tiempo de reacción de 30 min, el efecto se obtiene con una concentración de GA de alrededor de 10 - 15 mM. La pérdida de actividad  $\beta$ -gal para estas condiciones de reacción es de aproximadamente 20 - 25 %. Los resultados obtenidos en numerosas experiencias efectuadas en forma independiente mostraron una variación relativa de la actividad residual, luego del tratamiento con GA, del orden del 15 - 20 %

---

**Figura 3.5.** Efecto de la concentración de glutaraldehído sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el tratamiento de células permeabilizadas a 0 °C y temperatura ambiente.

---



---

Las células permeabilizadas se incubaron en PPB-Mn 50. La concentración celular fue de 50 g/l ( $10^{10}$  células/ml), y el tiempo de incubación 1 h (0 °C) o 30 min (temperatura ambiente). La concentración de GA es la inicial en la mezcla de reacción. ●: 0 °C. ▲: Temperatura ambiente (22 °C). Los valores representan el promedio de tres medidas independientes, con un coeficiente de variación de 15 a 20%.

---

**Tabla 3.4.** Efecto de la concentración de glutaraldehído sobre la retención y estabilidad de  $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas.

Condiciones de tratamiento con GA		Actividad $\beta$ -gal		
Temperatura (°C)	Concentración de GA (mM)	Inicial <sup>a</sup>	Residual <sup>b</sup>	
		T	T	E (%)
0	15	92.7	65	59.8
	25	86	87	19.2
	40	83	100	3
	50	80	100	0.27
	62.5	74	100	0
	75	68.7	100	0
	100	61.6	100	0
Ambiente (22°C)	5	96	62	47
	10	85	90	4.2
	15	73.6	96	0.5
	20	54	100	0.2
	30	27	100	0
	40	20.4	100	0
	50	13.6	100	0
Control	0	100	5	100

<sup>a</sup>: Actividad inicial total (T) en la suspensión después del tratamiento con GA, valores relativos a la muestra control (34.9 ONPG/10<sup>9</sup> células). Tratamiento con GA: Concentración celular 50 g/l en PPB-Mn 50. El tiempo de tratamiento a 0 °C fue de 1 h, y a temperatura ambiente de 30 min.

<sup>b</sup>: Ensayo de estabilidad: T: Actividad total después de incubar 15 días a 30 °C, valores relativos a la actividad inicial respectiva. E: Actividad extracelular, expresada como porcentaje de la actividad total. La concentración celular fue: 20 g/l en PPB-Mn 50 conteniendo 0.15% de metilparabeno. Control: Células permeabilizadas sin tratamiento con GA.

### 3.3.2.3. Efecto de la concentración celular

Desde el punto de vista de la productividad del proceso de estabilización es conveniente que el mismo sea realizado con la mayor concentración celular posible. Pudo observarse que el empleo de concentraciones celulares mayores que 100 g/l producían una considerable aglomeración celular. Este fenómeno puede ser interesante desde el punto de vista del diseño de un método de inmovilización. Para evitar la heterogeneidad del sistema, este ensayo se limitó a concentraciones de células de hasta 100 g/l. En esta experiencia las células se incubaron a 0 °C durante una hora, con una concentración de GA de 50 mM. Los resultados se muestran en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Efecto de la concentración celular durante el tratamiento con glutaraldehído sobre la retención y la estabilidad de  $\beta$ -galactosidasa en células permeabilizadas.

Tratamiento	Actividad $\beta$ -gal		
	Inicial <sup>a</sup> (ONPG/10 <sup>9</sup> )	Residual <sup>b</sup>	
Concentración celular (g/l)		T	E(%)
25	32.07	100	0.66
50	31.9	100	0.40
100	30.4	100	2.1
Control	37.7	4.2	100

<sup>a</sup>: Actividad inicial total después del tratamiento con GA. Tratamiento con GA: Concentración inicial de GA 50  $\pm$  2 mM; tiempo de incubación 1 h a 0 °C. Las células se resuspendieron en PPB-Mn 50.

<sup>b</sup>: Ensayo de estabilidad. T: Actividad total después de 15 días de incubación a 30 °C, valores relativos a la actividad inicial respectiva. E: Actividad extracelular, expresada como porcentaje de la actividad total. La concentración celular fue 20 g/l en PPB-Mn 50, conteniendo 0.15% de metilparabeno. Control: Células permeabilizadas sin tratamiento con GA.

A partir de los datos mostrados anteriormente, se concluye que el tratamiento es efectivo aún con concentraciones celulares de hasta 100 g/l.

#### **3.3.2.4. Estabilidad de las células tratadas en almacenamiento**

Sobre la base de los resultados anteriores se trataron células permeabilizadas con glutaraldehído en condiciones que resultaron óptimas para estabilizar la enzima en la célula permeabilizada. Si bien es posible combinar temperatura, tiempo y concentración de GA, se seleccionó el tratamiento en frío (0 °C). La concentración de GA usada fue 50 mM y la concentración celular 50 - 80 g/l. El tiempo de incubación fue 1 h. Luego del tratamiento las células se lavaron con buffer PPB-Mn 50 y se resuspendieron en el mismo buffer, conteniendo 0.15% de metilparabeno, para obtener una concentración celular de 20 g/l.

Esta suspensión celular se mantuvo sin pérdida de actividad al menos durante seis meses de almacenamiento a 5 °C, no observándose liberación de  $\beta$ -gal al medio extracelular.



### 3.4. DISCUSION

Una vez que la célula ha sido permeabilizada, la  $\beta$ -gal comienza a difundir hacia el medio extracelular. Este proceso de solubilización sería deseable si el objetivo fuera, por ejemplo, la purificación de la enzima. Sin embargo, como el fin es retener la enzima dentro de la estructura celular, la solubilización de la  $\beta$ -gal es indeseable. La incubación prolongada, particularmente a 30 °C, pone a su vez en evidencia el proceso autodegradativo que conduce a la desactivación de la enzima. El proceso de desactivación no es simultáneo al de la solubilización de la enzima y ocurre en una fase posterior. Por lo tanto, para retener la enzima y frenar su desactivación, es necesario someter a la célula permeabilizada a tratamientos de estabilización. Los resultados obtenidos demuestran que esto es factible tratando a las células permeabilizadas con glutaraldehído.

Si bien el sistema aparece como más complejo de interpretar en relación a la inmovilización de una enzima purificada, el fenómeno buscado es el mismo o sea, fijar la enzima a un soporte, en este caso la matriz celular, siendo además necesario en este caso evitar la desintegración de dicha matriz inhibiendo el proceso autodegradativo. La localización citoplasmática de la  $\beta$ -gal hace que la enzima se encuentre en un medio con alta concentración de proteínas, las cuales además de otros componentes celulares servirán como elementos estructurales para la reacción de entrecruzamiento provocada por el GA. La concentración citoplasmática de proteínas puede estimarse en 100 - 150 g/l, de las cuales entre el 12 - 15% corresponde a la  $\beta$ -galactosidasa.

Las condiciones óptimas del tratamiento con GA serán aquellas que permitan estabilizar el sistema con la menor pérdida de actividad. Tal como se mencionó en la Introducción es de esperar que el uso del reactivo ligante produzca un efecto negativo sobre la actividad del catalizador. La disminución de actividad puede ser explicada por cambios conformacionales que pueden afectar la estructura global de la proteína o por la aparición de impedimentos estéricos que no permiten al sustrato alcanzar el sitio activo de la enzima. Este último aspecto es difícil de separar de los problemas difusionales que puede ocasionar, por ejemplo, el entrapamiento en matrices porosas. Otra causa posible de disminución de la actividad es la inactivación del catalizador cuando la reacción afecta el sitio activo de la enzima.

El tratamiento con GA de células permeabilizadas provoca una pérdida de actividad  $\beta$ -gal aún durante la incubación a bajas temperaturas. Esta pérdida de actividad no es atribuible a restricciones a la libre difusión de los sustratos provocadas por el tratamiento con GA. Los datos cinéticos de actividad  $\beta$ -gal dan una correlación lineal cuando se analiza la ecuación de Michaelis-Menten según Eadie-Hofstee. Esto muestra la ausencia de limitaciones difusionales durante las medidas de actividad que, de existir, causarían una desviación de la linealidad en el gráfico, obteniéndose curvas sigmoideas, siendo el efecto más pronunciado para bajas concentraciones de sustrato (Goldstein y Manecke, 1976). Por otro lado el valor de la constante de afinidad de la célula estabilizada coincide con el valor hallado para células sin tratamiento presentando las células tratadas con GA una disminución real de la velocidad máxima de reacción. Cabe destacar que la medida de actividad se realiza con una concentración de ONPG de 1.22 mM lo que hace muy sensible la determinación de la actividad en condiciones estándar a cambios en el valor de la constante de afinidad. Estos resultados sugieren que la causa de la disminución de actividad es la pérdida efectiva del catalizador lo que de algún modo es consistente con la caída exponencial de la actividad  $\beta$ -gal. Este tipo de inactivación de primer orden respecto a la concentración de enzima es habitual en procesos de inactivación química que afectan el sitio activo. De acuerdo a Richmond y Gray (1981), el sitio activo de la enzima contiene un grupo sulfhidrilo y un grupo imidazol. Estos grupos al igual que los aminos libres son capaces de reaccionar con el GA (Habeeb y Hiramoto, 1968), lo que originaría la pérdida de actividad observada. Sin embargo no puede descartarse que la pérdida de actividad sea causada además por modificaciones más generales de la molécula de  $\beta$ -gal, a consecuencia de las reacciones de entrecruzamiento.

Para confirmar esta hipótesis se realizaron experiencias en las cuales células estabilizadas se incubaron con soluciones de hexametildiamina (HMDA), para incrementar la concentración de grupos amino en el interior de la matriz celular, luego de lo cual se realizó un segundo tratamiento con GA. Se incluyó una muestra conteniendo lactosa para determinar si la misma promovía alguna protección. Los resultados se presentan en la Tabla 3.6.

**Tabla 3.6.** Efecto del tratamiento con aminos y glutaraldehído en la actividad  $\beta$ -galactosidasa de células permeabilizadas.

Condiciones de tratamiento		Actividad $\beta$ -gal residual <sup>a</sup>		
Concentración de HMDA (mM)	Concentración de GA (mM)	Incubación con GA (h)		
		Inicial	1	2
0	0	100	100	100
0	50	100	82	75.7
13	50	100	63	34
13*	50	100	66.6	45

Una suspensión de células estabilizadas con GA ( $3.25 \times 10^9$  células/ml) se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en PPB-Mn 50, o en buffer conteniendo 13 mM de hexametildiamina (HMDA). Las células se separaron por centrifugación y se resuspendieron en buffer conteniendo 50 mM de GA incubándose durante 1 y 2 h a 0 °C.

<sup>a</sup>: Actividad residual relativa al valor inicial del testigo (sin adición de HMDA y GA).

\*: Una vez adicionada la HMDA, el agregado de GA se realizó en presencia de lactosa (5%).

Se puede observar que la actividad  $\beta$ -gal no fue afectada durante la incubación con HMDA (el porcentaje de la actividad inicial es igual en todos los casos). Este efecto fue independiente del tiempo de incubación de las células con el reactivo (3 - 30 min a temperatura ambiente). Sin embargo la presencia de HMDA incrementa la velocidad de desactivación de  $\beta$ -gal en la posterior incubación con GA. Si se considera que la HMDA no tiene un efecto negativo por si misma y que no afecta la reactividad del GA con el centro activo de la enzima, la pérdida de actividad adicional que se observa en presencia del donador de grupos amino (25%) podría atribuirse a un aumento del entrecruzamiento que afectaría de un modo no específico la estructura de la  $\beta$ -gal. Esto no sucede cuando se adiciona HMDA a la célula estabilizada, por lo que la capacidad

reactiva residual del GA unido es despreciable. Por otra parte, el efecto protector de la lactosa indica que existe reacción con el centro activo.

La cuantificación de la reacción entre el GA y las proteínas celulares es un problema complejo. La reacción se pone directamente en evidencia a través de la pérdida de actividad  $\beta$ -gal. Las determinaciones analíticas del glutaraldehído residual indican que la mayor parte del reactivo queda sin reaccionar, sugiriendo que solo una fracción pequeña de los grupos aminos ha participado en la reacción. Sin embargo, es evidente que a pesar de ello, el sistema puede ser estabilizado, esto es retener la actividad  $\beta$ -gal y bloquear la autodegradación celular. Ambos aspectos se encuentran de algún modo asociados ya que la solubilización de la enzima, debido a un tratamiento insuficiente, está acompañada de una pérdida parcial de la actividad, lo que de algún modo muestra que el efecto estabilizante del GA está vinculado en parte con la capacidad de inhibir el proceso autolítico que se dispara como consecuencia de la pérdida de viabilidad celular. La condición óptima de tratamiento provoca una pérdida de actividad del orden del 20%, atribuible a inactivación del catalizador. Esta condición óptima puede obtenerse mediante diferentes condiciones de tratamiento esto es combinando temperatura, concentración de GA y tiempo de reacción. Un exceso de reacción causado, por ejemplo, por altas concentraciones de GA, o favorecido por un aumento de la temperatura de tratamiento, conduce a la inactivación total de la enzima.

---

**CAPITULO 4**

**ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO ESTABILIZANTE  
DEL GLUTARALDEHIDO**

---

## 4.1. INTRODUCCION

En el Capítulo 2 se estudió el proceso de permeabilización celular con el fin de obtener células no viables con actividad  $\beta$ -gal. En el Capítulo 3 se establecieron condiciones para el tratamiento con glutaraldehído con el fin de estabilizar la actividad enzimática en la célula permeabilizada.

Este Capítulo tiene como objetivo analizar el estado final de las células una vez permeabilizadas, como así también el estado final de las mismas luego del tratamiento de estabilización. Esto contribuiría a aclarar los fenómenos que ocurren en dichos procesos y explicar las propiedades de los distintos sistemas.

En este sentido se estudió con mayor detalle la inestabilidad del sistema celular permeabilizado, analizando la liberación de proteínas localizadas en diferentes compartimientos celulares, como también el desarrollo del proceso autolítico.

Para buscar un modelo que explique la estabilización de la enzima y de la estructura general de la célula por el reactivo ligante, se analizó la inhibición del proceso autolítico en general y se investigó la función de la pared celular en el fenómeno de "retención" de la actividad enzimática. Se efectuaron diferentes estudios para poner en evidencia ciertas propiedades del sistema celular como la sensibilidad a los esfuerzos de corte, la susceptibilidad a la acción proteolítica exógena, etc. El objetivo final del estudio es establecer un modelo de acción del agente ligante, como un conocimiento básico para desarrollar y predecir las propiedades de un sistema enzimático inmovilizado, basado en el uso de células no viables.

## **4.2. MATERIALES Y METODOS**

### **4.2.1. Microorganismo**

El microorganismo, las condiciones de cultivo y el procesamiento de la biomasa son los descritos en la Sección 3.2.1. Los ensayos con *S. cerevisiae* se efectuaron utilizando levadura de panificación comercial (Calsa S.A.). La muestra utilizada contenía 27 - 30% de materia seca y 2.63% de nitrógeno en base húmeda. El recuento de levaduras en el producto fue aproximadamente  $1.5 \times 10^{10}$  células/g húmedo. La levadura se lavó dos veces con PPB 50 usando para ello 5 ml de buffer/g de levadura húmeda.

### **4.2.2. Reactivos y soluciones**

Hemoglobina bovina en polvo, Azocoll, N-carboxibenzoxi-fenilalanina-L-leucina (N-CBZ-Phe-Leu), L-leucina-p-nitroanilida, ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfónico (TNBS), tripsina de páncreas bovino, Lyticase de *Arthrobacter luteus* (400 - 10 000 U/mg de proteína), L-leucina, Sephadex G-200 y azul dextrano 2000 fueron Sigma. Otros reactivos empleados fueron: proteasa neutra de *Bacillus* (Novo Ind.) y  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck). Los demás reactivos fueron de grado analítico.

Los buffer empleados se indican en cada caso particular y fueron siempre preparados con agua desionizada.

### **4.2.3. Permeabilización celular y tratamiento con glutaraldehído**

Para ambas levaduras se utilizaron los procedimientos descritos en la Sección 3.2.3 y 3.2.4.

#### **4.2.4. Obtención de extractos libres de células**

Los extractos celulares fueron obtenidos mediante ruptura mecánica de las células con bolillas de vidrio. Para ello las células en cantidad equivalente a 1 g de levadura húmeda se resuspendieron con 1 mililitro de PPB-Mn 50, y se mezclaron con 2 ml de bolillas de vidrio (450 - 500  $\mu\text{m}$ , Thomas Scientific). La mezcla se enfrió en baño de hielo y luego se sometió a ciclos de 30 segundos de agitación intensa en un agitador de tubos. La operación se realizó 6 a 8 veces hasta obtener una fracción de células rotas mayor a 90%. La ruptura se determinó por observación microscópica. La muestra fue enfriada entre cada ciclo. Luego del tratamiento se adicionaron 2 ml de PPB-Mn 50, alcanzándose así una concentración de sólidos celulares equivalente a aproximadamente 40 - 50 g/l (17 - 20 g/l de proteína total). Las bolillas se dejaron decantar, el homogeneizado se separó mediante pipeta y centrifugó a 5 °C (3 000g, 10 min). Luego el sobrenadante obtenido se centrifugó (20 000g, 20 min). En estas condiciones sedimenta el 20 - 30% de la proteína celular. Una alternativa rápida de separación se obtuvo centrifugando la muestra en microcentrífuga (14 000g, 2 min). La concentración de proteína en el extracto obtenido fue similar con ambos procedimientos. El sobrenadante se conservó a 5 °C en presencia de 0.02% de azida de sodio por un período no mayor a 48 h.

#### **4.2.5. Determinación de actividades enzimáticas**

##### **4.2.5.1. Determinación de la actividad $\beta$ -gal e invertasa**

La actividad  $\beta$ -galactosidasa e invertasa se determinaron con ONPG y sacarosa como sustratos de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 2.2.6.

La cepa cultivada en continuo presentó una actividad  $\beta$ -gal de  $6.9 \pm 0.35$  ONPG/mg ( $34.5 \pm 2$  ONPG/ $10^9$  células) y la actividad invertasa fue  $2.86 \pm 0.39$  U/mg ( $14.3 \pm 2$  U/ $10^9$  células).



#### **4.2.5.2. Determinación de la actividad proteinasa A (PrA)**

Se utilizó el procedimiento descrito por Saheki y Holzer (1974). Como sustrato se usó hemoglobina desnaturalizada, cuyo pH fue ajustado con ácido láctico a 3.7. La desnaturalización se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Sarath y col. (1989). Para la determinación se incubaron 0.4 ml de hemoglobina desnaturalizada (concentración 1.2%) con 0.1 ml del extracto durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo mediante el agregado de 0.5 ml de ácido tricloroacético al 10%. Los péptidos solubles se determinaron con el reactivo de Folin usando tirosina como patrón. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce una cantidad de péptidos solubles determinados en la mezcla final con TCA equivalente a 1 µg de tirosina en 30 minutos.

#### **4.2.5.3. Determinación de la actividad proteinasa B (PrB)**

La actividad se evaluó empleando Azocoll como sustrato de acuerdo a la metodología empleada por Saheki y Holzer (1974). El sustrato se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7 conteniendo 0.02% de azida de sodio para obtener una concentración de 0.5%. Para efectuar la medida se incubaron 0.4 ml del sustrato con 0.1 ml del extracto durante 2 a 3 h a 37 °C, luego de lo cual la reacción se detuvo mediante la adición de 0.5 ml de TCA al 10%. La muestra se centrifugó en una microcentrífuga (14 000g, 3 min), y la absorbancia del sobrenadante se midió a 520 nm. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por hora en la mezcla de reacción luego del agregado del TCA.

#### **4.2.5.4. Determinación de la actividad carboxipeptidasa Y**

La actividad se evaluó utilizando N-CBZ-phe-Leu como sustrato (Hayashi y col. 1973). El sustrato se preparó en metanol (25 mM), y se conservó a 5 °C hasta su uso. Previo a la determinación se diluyó en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 6.75 para obtener una concentración de sustrato de 3.5 mM. La reacción se llevó a cabo incubando 0.1 ml de sustrato con 0.01 ml del extracto enzimático durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo adicionando 0.9 ml de reactivo ninhidrina (preparado diluyendo 1 volumen de reactivo con 8 volúmenes de

buffer citrato de sodio 0.5 M pH 5), y calentando la solución inmediatamente durante 15 minutos a 100 °C. Luego de enfriar la solución se adicionaron 3 ml de buffer citrato 0.5 M pH 5, y se midió la absorbancia a 570 nm. Como patrón se empleó L-leucina (1.5 mM). Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que hidroliza un  $\mu\text{mol}$  de sustrato/min.

#### **4.2.5.5. Determinación de la actividad aminopeptidasa (Ap)**

Se usó el método descrito por Nowak y Tsai (1988), usando como sustrato Leucina-*p*-nitroanilida. El sustrato se disolvió en dimetilformamida (20 mM) y se conservó a 5 °C. Previo a la determinación, el sustrato, se diluyó en buffer Tris-HCl, pH 7.2 para obtener una concentración 1mM. La medida de actividad se realizó incubando 0.5 ml de sustrato con 0.05 ml de extracto, durante 15 - 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de buffer citrato-fosfato (1 M, pH 2.2) conteniendo 1 mM de *o*-fenantrolina. Se determinó la absorbancia a 405 nm. La hidrólisis se estimó usando el valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ :  $9620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### **4.2.5.6. Determinación de la actividad fumarato hidratasa**

Se usó el método descrito por Bergmeyer y col. (1974), usando como sustrato L-malato. El sustrato se disolvió en PPB 100 mM, pH 7.4 para obtener una concentración en mezcla de 50 mM. La medida de actividad se efectuó incubando 1.5 ml de sustrato con 0.5 - 10  $\mu\text{l}$  de muestra enzimática y se determinó la absorbancia a 240 nm. La concentración del fumarato producido se estimó usando el valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ :  $2440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de fumarato por minuto.

#### **4.2.6. Autólisis de células de *K. lactis* y *S. cerevisiae***

Las células permeabilizadas y las células estabilizadas con glutaraldehído se resuspendieron en buffer fosfato de potasio 0.05 M, pH 6.6 conteniendo 0.1% de metilparabeno para obtener una concentración aproximada de 1 - 5 g de

nitrógeno total/l de suspensión. El pH de las suspensiones se ajustó a 4.8 - 5.0 con ácido acético, luego de lo cual se incubaron a 30 °C durante 24 h (Etapa I). Luego de dicho período, el pH de las suspensiones fue reajustado a 5.0 y la autólisis se aceleró incubando las suspensiones a 45 °C por igual período de tiempo (Etapa II). Luego del período de incubación las células se centrifugaron (5 000 g, 10 min) y el sobrenadante se congeló para su posterior análisis. La autólisis fue evaluada determinando nitrógeno total, nitrógeno amínico y carbohidratos solubles luego de la incubación.

#### **4.2.7. Hidrólisis de la pared celular mediante enzimas líticas**

La degradación de la pared celular de células permeabilizadas y células estabilizadas con glutaraldehído se llevó a cabo con Lyticase Sigma (*Arthrobacter luteus*). Para el ensayo las células fueron resuspendidas en PPB 50 pH 7, a una concentración aproximada de 4 g/l ( $8 \times 10^8$  células/ml). El complejo Lyticase (10 000 U) se disolvió con 2 ml de agua desionizada y se adicionaron a la suspensión celular en una concentración equivalente a 200 U/ml.

#### **4.2.8. Otras determinaciones analíticas**

La evaluación de nitrógeno total se realizó por el método de Kjeldahl, y el nitrógeno amínico por la técnica de TNBS (Adler-Nissen, 1979). Los carbohidratos fueron analizados por el método del fenol-sulfúrico (Herbert y col., 1971). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951).

#### **4.2.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo a Laemmli (1970). La concentración del gel de *stacking* fue de 3% y la del gel de corrida, 7%. Se sembraron alrededor de 20 µg de proteína y se reveló con Coomassie Blue.

#### **4.2.10. Microscopías electrónicas**

Las células fueron fijadas con glutaraldehído 2%, durante 20 min y luego postfijadas con tetróxido de osmio durante 20 min a 5 °C y posteriormente deshidratadas con etanol en sucesivos recambios (50 - 95%). Todas las operaciones se efectuaron a 5 °C. Finalmente fueron incluidas en resina epoxi (Poli-bed 812). Se cortaron bloques de 80 nm de espesor y estos fueron coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol 1200 EX.II, con una aceleración de 80 kV.

#### **4.2.11. Cromatografía de tamiz molecular**

El perfil de elución de  $\beta$ -galactosidasa e invertasa en una columna de tamiz molecular se realizó en una columna 0.8 x 25 cm rellena con Sephadex G-200 equilibrada con PPB-Mn 50. El análisis cromatográfico se efectuó en un extracto celular incubado con glutaraldehído y en un extracto control sin tratamiento. El extracto celular se obtuvo como se indica en la Sección 4.2.4., en presencia de 1 mM de PMSF. Un mililitro del extracto se incubó con glutaraldehído (50 mM) durante 1 hora a 5 °C. Luego de este período de incubación, se adicionaron 100  $\mu$ l de una solución de NaHSO<sub>3</sub> (equivalente al 80% del glutaraldehído adicionado), para eliminar el glutaraldehído residual, y el extracto se centrifugó (20 000g, 20 min). La muestra control (sin tratamiento con GA) fue procesada de igual modo, exceptuando la adición de NaHSO<sub>3</sub>. Para la cromatografía se tomaron 0.25 ml del sobrenadante y se mezcló con 0.25 ml de una solución al 1% de azul dextrano 2 000, y se sembraron en la columna. La muestra fue eluída con PPB-Mn 50 conteniendo 0.02% de azida de sodio. El caudal fue de aproximadamente 0.17 ml/min. Se recogieron fracciones de 0.5 ml/tubo en las que se determinó actividad  $\beta$ -gal, actividad invertasa y absorbancia a 650 nm, esta última para medir la elución del azul dextrano.

## **4.3. RESULTADOS**

### **4.3.1. Liberación de diversas actividades enzimáticas de células permeabilizadas**

En el Capítulo anterior (Sección 3.3.1.) se determinó que las células permeabilizadas constituyen un sistema inestable. Esto se manifiesta por una progresiva solubilización de la  $\beta$ -gal en el medio extracelular y su posterior desactivación, proceso probablemente mediado por proteólisis. Resulta interesante determinar qué ocurre con la liberación de otras enzimas localizadas en compartimientos celulares diferentes al de la  $\beta$ -gal (citosólica) como son: invertasa (localizada en pared o espacio periplasmático), carboxipeptidasa Y (localizada en vacuola), y fumarasa (localizada en mitocondrias).

La liberación de estas actividades enzimáticas se evaluó en células permeabilizadas incubadas en buffer, en el momento en que la  $\beta$ -gal presenta su máxima solubilización. Los resultados se comparan con los valores de actividad determinados en extractos obtenidos mediante homogeneización de las células con bolillas de vidrio, que es el método comúnmente usado para la extracción de estas enzimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1. De su análisis puede observarse que existe una liberación diferencial o selectiva de las proteínas. Así, cuando la  $\beta$ -gal alcanza la solubilización máxima, la actividad de la carboxipeptidasa vacuolar solubilizada es del 50% y la liberación de invertasa alcanza solamente un 7%. La fumarasa se solubiliza, pero su actividad disminuye marcadamente en las células permeabilizadas. Esta disminución de la actividad puede deberse a la inactivación de la enzima durante la permeabilización y/o posterior incubación en buffer. La ruptura mecánica solubiliza el 75% de la proteína total, mientras que en la incubación de células permeabilizadas sólo se solubiliza el 25%.

Desde el punto de vista de la obtención de  $\beta$ -gal, la incubación de células permeabilizadas es una estrategia de purificación interesante debido a que la misma permite obtener, en una sola etapa, un extracto con un 50% de pureza y con un rendimiento mayor que 90%. La liberación simultánea de fumarasa y carboxipeptidasa Y con la  $\beta$ -gal, aunque con cinéticas diferentes, demuestra que las mitocondrias y los compartimientos vacuolares han sido afectados por la permeabilización y sus contenidos son liberados también al medio extracelular.

**TABLA 4.1.** Liberación de diferentes actividades enzimáticas mediante ruptura mecánica e incubación de células permeabilizadas.

Tratamiento			Actividad							
Extracción	Fracción	Proteína (g/l)	β-gal		Invertasa		Cp Y		Fumarasa	
			T	A	T	A	T	A	T	A
RM	Extracto	11.26	250	22.2	103	9.15	0.31	0.028	14	1.24
	Residuo	3.7	0		0		nd		nd	
IP	Extracto	2.86	223	78	8.7	3.04	0.17	0.06	0.093	0.032
	Residuo	8.78	nd		119		0.19		1.94	

Células permeabilizadas se resuspendieron en PPB-Mn 50 conteniendo 0.02% de azida de sodio a una concentración aproximada de 30 g/l y se incubaron con agitación durante 7 h a 30 °C. La actividad en el residuo se evaluó luego del lavado con buffer en frío y posterior homogeneización con bolillas de vidrio. RM: Ruptura mecánica. Las células descongeladas se resuspendieron en PPB-Mn 50 y fueron homogeneizadas por ruptura mecánica con bolillas de vidrio, de acuerdo a lo descrito en la Sección 4.2.4. La actividad en el residuo se evaluó luego de dos lavados con buffer. IP: Incubación de células permeabilizadas. Nota: Luego de la permeabilización y los lavados se pierde el 8 -10% de la proteína total. Cp Y: Carboxipeptidasa Y. T: Actividad total (U/ml). A: Actividad específica (U/mg de proteína). nd: No determinado

Esto explica la inducción del proceso autolítico debido al tratamiento con solventes y la consiguiente proteólisis, lo que justifica en parte los resultados discutidos en la Sección 3.3.1.

Por otra parte la retención de la invertasa confirma el concepto antes mencionado de que la pared celular no es afectada por la permeabilización. Por lo tanto puede considerarse que la solubilización de las enzimas intracelulares ocurre por difusión a través de la pared esencialmente inalterada. Esto es consistente con el hecho que la pared intacta de levaduras es permeable a proteínas globulares de hasta 400 kDa (radio de Stokes 5.8 nm) (Nobel y col., 1989). La  $\beta$ -gal purificada de la cepa NRRL 1140 es una proteína de 270 kDa, compuesta por dos subunidades de 135 kDa (Dickson y col., 1979). Esto fue confirmado para esta cepa mediante técnicas de SDS-PAGE efectuadas con extractos celulares obtenidos con muestras provenientes de cultivos continuos ( $D: 0.1 \text{ h}^{-1}$ ), limitados por glucosa, lactato y lactosa. De acuerdo a las medidas de actividad el nivel no inducido de  $\beta$ -gal en lactato es 25 veces superior al obtenido en células crecidas en glucosa, y en presencia del inductor (lactosa) la actividad  $\beta$ -gal es 250 veces superior. Los geles de SDS-PAGE revelan una banda característica de peso molecular estimado en 136 kDa, y cuya intensidad es directamente proporcional a las actividades de los extractos. Esto confirma el tamaño y estructura de la  $\beta$ -gal (Figura 4.1).

#### **4.3.2. Efecto del tratamiento de permeabilización y estabilización con glutaraldehído en el proceso autolítico**

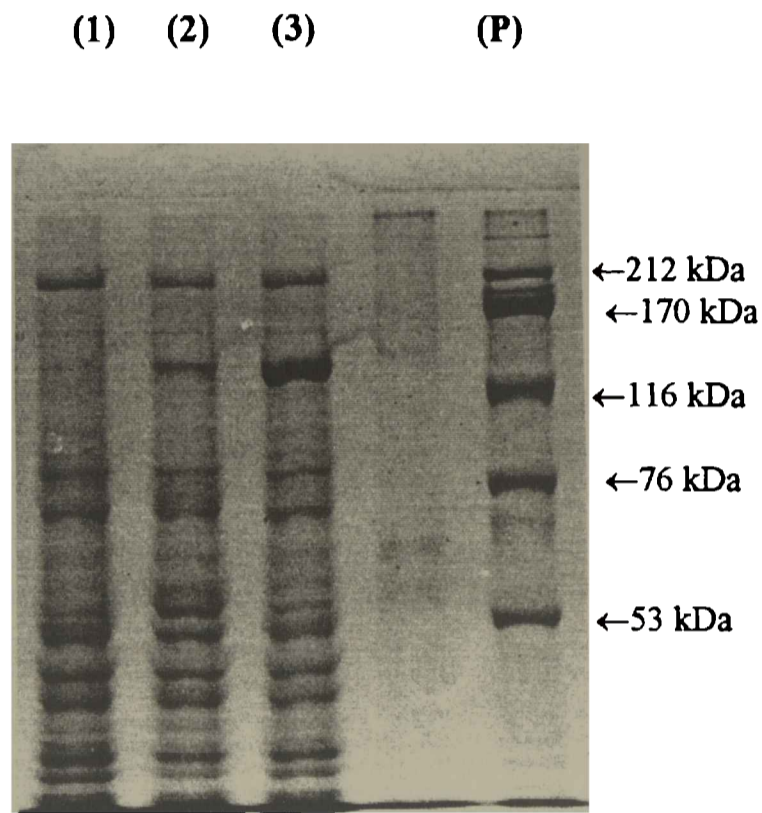
En la Sección 3.4 se menciona que la estabilización de la actividad  $\beta$ -gal en las células permeabilizadas mediante el tratamiento con GA obedecería principalmente a la inhibición del proceso autolítico.

En esta sección se analiza con más detalle dicho proceso y su inhibición. Además de los ensayos con *K. lactis*, se incluyen estudios con la levadura de panificación (*S. cerevisiae*), ya que la misma es ampliamente conocida por su potencial autolítico.

---

**Figura 4.1.** SDS-PAGE de extractos celulares de *K. lactis* NRRL 1118 crecida en sistema continuo limitado en carbono.

---



---

Muestras cultivadas a  $D: 0.1 \text{ h}^{-1}$  en: (1) glucosa, (2) lactato y (3) lactosa. La actividad específica en los extractos fue: 0.091, 2.23 y 22.5 ONPG/mg de proteína respectivamente. (P): Patrones de peso molecular.

---



Para una mejor caracterización del potencial autolítico de ambas levaduras se evaluó primeramente el nivel de proteasas presentes en ambas cepas. Algunos datos bibliográficos indican que *K. lactis* tiene un sistema proteolítico similar al de *S. cerevisiae* (Grieve y col., 1983).

Tal como se menciona en la Introducción, el análisis del sistema proteolítico endógeno en levaduras es complejo, debido fundamentalmente al gran número de actividades descritas y, además, por la diversidad de condiciones de ensayo necesarias para su análisis (Achstetter y col., 1984; Heinemeyer y col., 1991; Hilt y Wolf, 1992). Las proteasas vacuolares de baja especificidad serían las responsables de la proteólisis durante el proceso autodegradativo.

Slaughter y Nomura (1992) estudiaron el efecto del pH en la degradación proteolítica de extractos celulares en una cepa de *S. cerevisiae*, encontrando valores óptimos en el rango de 5.0 - 6.0. Estos autores postulan además que la endoproteinasa PrB y las aminopeptidasas metalo-dependientes son las principales enzimas relacionadas con la degradación inespecífica de las proteínas en las condiciones de la autólisis. Existiría además una significativa participación del sistema proteosómico citosólico. Sin embargo, esta última hipótesis no parece del todo convincente, ya que el pH óptimo del sistema ubiquitina dependiente es alrededor de 8.0 - 8.5.

El pH óptimo en la zona ácida (5.0 - 6.0) está relacionado con la activación del sistema proteolítico, ya que la disrupción de las vacuolas pone en contacto a las enzimas con inhibidores específicos localizados en el citoplasma. La incubación a pH ácido promueve la digestión enzimática de dichos inhibidores y la activación de las proteasas. Este efecto ha sido descrito para PrA, PrB y CpY (Schewencke, 1981; Breddam y Brenfeldt, 1991). Este proceso de activación ha sido empleado en diferentes levaduras tales como *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. pombe* e incluso *K. lactis* (Grieve y col., 1983; Suárez-Rendueles y col., 1991)

En base a estas consideraciones la actividad de las principales proteasas vacuolares se determinó en extractos frescos y en extractos que fueron incubados a pH 5.0, durante 24 h, a temperatura ambiente. Los resultados se detallan en la Tabla 4.2.

Puede observarse que la actividad de las proteasas es similar en ambas levaduras, y que la actividad PrA, PrB y CpY se incrementa durante la incubación a pH ácido; en cambio la incubación afecta la actividad aminopeptidasa. Sobre la base de estos datos es de esperar que ambas levaduras manifiesten un poder autolítico similar.

**Tabla 4.2.** Actividades proteolíticas en extractos celulares de *K. lactis* y *S. cerevisiae*.

Levadura	Extracto	Proteína (g/l)	Actividad específica (U/mg proteína)			
			PrA	PrB	CpY	Ap
<i>S. cerevisiae</i>	Fresco	12	0.16	$1.66 \times 10^{-4}$	0.058	$5.2 \times 10^{-3}$
	Activado	-	0.29	0.003	0.088	$2.8 \times 10^{-3}$
<i>K. lactis</i>	Fresco	8.3	0.36	$4.8 \times 10^{-4}$	0.022	$5.2 \times 10^{-3}$
	Activado	-	nd	$7.5 \times 10^{-4}$	0.052	$2.75 \times 10^{-3}$

Los extractos fueron obtenidos por homogeneización con bolillas de vidrio de acuerdo a lo descrito en la Sección 4.2.4. En este caso las células fueron resuspendidas en PPB 0.1M, pH 7. Las actividades proteolíticas se determinaron como se indica en la Sección 4.2.5.

Fresco: Determinaciones efectuadas luego de obtenido el extracto.

Activado: Determinaciones efectuadas luego de ajustar el pH del extracto a 5.0 (con ácido acético) e incubar 24 h a temperatura ambiente. nd: No determinado.

El ensayo de autólisis se realizó en dos etapas. Las suspensiones celulares fueron mantenidas a 30 °C, durante 24 h, para permitir la digestión de los inhibidores, y luego la autólisis se aceleró incubando las suspensiones a 45 °C (Hough y Maddox, 1970). El pH del proceso fue de alrededor de 5.0. La evaluación de la autólisis se realizó determinando en el sobrenadante el nitrógeno total, el nitrógeno amínico, y la concentración de carbohidratos solubles. Estos tres parámetros constituyen buenos indicadores del proceso autolítico. Los resultados obtenidos con células permeabilizadas y células estabilizadas con GA se presentan en la Tabla 4.3.

Durante la degradación de los inhibidores la autólisis comienza a ponerse en evidencia en las células permeabilizadas mientras que está muy deprimida en las suspensiones de células tratadas con GA. Estos fenómenos se observan tanto en células de *K. lactis* como de *S. cerevisiae*.

La posterior incubación a 45 °C incrementa la liberación de nitrógeno en las células permeabilizadas, particularmente en *S. cerevisiae* donde se solubiliza el 75% del nitrógeno total, mientras que en *K. lactis* el nitrógeno soluble representa 42% del total. La proteólisis se pone de manifiesto en ambas levaduras representando el nitrógeno amínico alrededor del 40% del nitrógeno soluble. En las células tratadas con GA es evidente que la proteólisis ha sido bloqueada o inhibida.

Otro indicador del proceso autolítico es la solubilización de los carbohidratos celulares. Los mismos pueden provenir de la hidrólisis de ácidos nucleicos, de material de reserva o de la degradación de la pared celular.

El proceso es notorio en las células permeabilizadas donde la solubilización de carbohidratos alcanza el 50% de los carbohidratos totales de la célula. La solubilización fue menor para ambas especies cuando son sometidas a tratamiento con GA. Sin embargo, en *K. lactis* la fracción de carbohidratos solubles alcanzó el 12%. Este resultado sugiere que si bien el tratamiento con GA frena la proteólisis, el mismo parece tener un efecto menor sobre las enzimas que intervienen en el proceso degradativo de la pared.

Una alternativa para comprobar la autólisis de la pared en las células estabilizadas, es medir la solubilización de la invertasa. En las muestras autolizadas los valores totales de actividad fueron muy bajos, lo que puede ser atribuido a las condiciones de incubación. Por lo tanto la experiencia se realizó bajo condiciones iguales a las usadas en la evaluación de la estabilidad de  $\beta$ -gal en células tratadas con glutaraldehído (Sección 3.3.2.). Un método empleado para inducir la solubilización de la invertasa consiste en tratar a las células con reactivos tales como  $\beta$ -mercaptoetanol o ditioneitol. La acción de estos compuestos estaría relacionada con su capacidad para reducir los puentes disulfuro necesarios para mantener la integridad de la pared (Sección 1.4.2.).

**Tabla 4.3.** Autólisis de células de *K. lactis* y *S. cerevisiae*.

**ETAPA I.** Incubación a pH 5, 24 h a 30 °C.

Levadura	Tratamiento	N total		N amínico
		T	S	S
<i>S. cerevisiae</i>	P	0.97	14.7	34.2
	GA	3.69	--	--
<i>K. lactis</i>	P	1.25	29	33.5
	GA	4.87	--	--

**ETAPA II.** Incubación a pH 5, 24 h a 45 °C.

Levadura	Tratamiento	N total		N amínico	C	
		T	S	S	T	S
<i>S. cerevisiae</i>	P	1.1	74	36.1	4.13	54.7
	GA	3.66	3.5	1.7	14.2	3.2
<i>K. lactis</i>	P	1.2	42	46.5	4.82	49.3
	GA	4.87	1.7	0.25	17.7	11.8

El contenido original de nitrógeno de *K. lactis* y *S. cerevisiae* fue de 0.425 y 1.75 mgN/10<sup>9</sup> células respectivamente (corresponde aproximadamente a un 8.0 - 8.5% en base seca. Alrededor del 15 al 25% se pierde durante el tratamiento de permeabilización). El contenido original de carbohidratos en *K. lactis* y *S. cerevisiae* fue de 1.55 y 5.7 mg/10<sup>9</sup> células respectivamente (alrededor del 10% se pierde durante la permeabilización).

P: Células permeabilizadas. Concentración celular: *K. lactis* 3.61 x 10<sup>9</sup>, *S. cerevisiae* 8.2 x 10<sup>8</sup> células/ml. GA: Células tratadas con GA. Concentración celular: *K. lactis* 1.4 x 10<sup>10</sup>, *S. cerevisiae* 3.18 x 10<sup>9</sup> células/ml. T: Concentración de nitrógeno (N) o carbohidratos (C) totales en la suspensión (g/l). S: Nitrógeno o carbohidratos totales solubles (% del total de la suspensión). N amínico: % del nitrógeno total soluble. --: Despreciable.

El tratamiento con este reactivo podría poner en evidencia alguna propiedad diferencial entre la pared de células permeabilizadas y la de células estabilizadas con glutaraldehído. Por lo tanto esta experiencia incluyó la incubación de células permeabilizadas y células estabilizadas con GA que previamente fueron tratadas con  $\beta$ -mercaptoetanol en las condiciones descritas por Nobel y col. (1989). Además de la actividad invertasa se evaluó la solubilización de  $\beta$ -gal, como un parámetro de la estabilidad del sistema. Los resultados se presentan en la Tabla 4.4.

Como era de esperar la  $\beta$ -gal se solubiliza totalmente en las células permeabilizadas y posteriormente se desactiva. La invertasa se solubiliza más lentamente pero la actividad total se mantiene constante, indicando una mayor estabilidad de esta glicoproteína frente al proceso autolítico.

En las células tratadas con GA la  $\beta$ -gal no se solubiliza, pero si lo hace la invertasa, aunque más lentamente que en las células permeabilizadas. Esto indica que la autohidrólisis de la pared celular no es totalmente inhibida por el reactivo ligante. En ambos tipos de células el tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol no mostró efecto alguno sobre la liberación de las enzimas o sobre su estabilidad. Cabe destacar que a diferencia de la  $\beta$ -gal, el tratamiento con GA no desactiva en forma significativa la actividad invertasa (la pérdida de actividad es luego del tratamiento 5 - 10%).

Una conclusión importante que surge de estos resultados es que la ausencia de solubilización de la  $\beta$ -gal de las células estabilizadas no debería ser interpretada como un simple fenómeno de retención mediado por la pared celular, ya que dicha propiedad no parece depender de la integridad de esta estructura celular.

De todos modos la liberación de invertasa no puede ser considerada como un parámetro suficiente para evaluar el grado de integridad de la pared, ya que la solubilización de la enzima podría estar causada por la degradación de la capa externa de la pared (mananoproteínas), quedando inalterada la capa interna (glucanos). Charpentier y col. (1986) observaron, luego de la autólisis de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* crecidas en medio sintético, una disminución del 50% en el espesor de la pared, debida principalmente a la pérdida de aminoácidos y azúcares provenientes de la capa periférica de mananoproteínas. Así la capa interna de glucanos menos degradada podría ejercer un efecto tamiz, reteniendo

**Tabla 4.4.** Actividad y localización de  $\beta$ -galactosidasa e invertasa durante la incubación en buffer de células permeabilizadas y células tratadas con GA.

**I. Células permeabilizadas**

Incubación (h)	Actividad							
	$\beta$ -gal <sup>a</sup>				Invertasa <sup>b</sup>			
	SH(+)		SH(-)		SH(+)		SH(-)	
T	E	T	E	T	E	T	E	
0	61.1	0.2	65.4	0.4	27	0	29	0
24	62.9	92	57.7	93	24	28.6	23.5	26.6
48	46	100	50.3	98	25.3	64	25	60

**II. Células tratadas con glutaraldehído**

Incubación (h)	Actividad							
	$\beta$ -gal <sup>a</sup>				Invertasa <sup>b</sup>			
	SH(+)		SH(-)		SH(+)		SH(-)	
T	E	T	E	T	E	T	E	
0	53.8	0.78	60	0.2	25	0	26.2	0
24	56.9	1.3	57	1.6	30.4	18.4	24	21.8
48	60	1.18	61	1.5	30.6	28.7	31.4	23

Las células fueron incubadas en PPB-Mn 50 a 30 °C. La concentración celular fue alrededor de 10 g/l. SH(+): Células tratadas con  $\beta$ -mercaptoetanol (50 mM) durante 30 min a 5 °C. Luego del tratamiento las células fueron lavadas con PPB-Mn 50 y resuspendidas en el mismo buffer.

SH(-): Células sin tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol. <sup>a</sup>: Actividad  $\beta$ -gal (ONPG/ml). <sup>b</sup>: Actividad invertasa (U/ml). T: Actividad total en la suspensión. E: Actividad extracelular (% de la actividad total).

la  $\beta$ -gal y otras proteínas, que son ahora incapaces de difundir hacia el exterior por formar parte de estructuras de alto peso molecular, que se han producido por la reacción de entrecruzamiento.

#### **4.3.3. Relación entre la integridad de la pared y la solubilización de $\beta$ -galactosidasa**

Para poder determinar efectivamente la influencia de la pared celular en el fenómeno de "retención" de la  $\beta$ -gal, las células se sometieron a la acción de enzimas líticas de pared, para asegurar una remoción completa de dicha estructura celular. Se usó para ello el preparado comercial Lyticase, derivado de *Arthrobacter luteus* que mostró ser efectivo en *S. cerevisiae* y *Candida albicans* (Catley, 1988).

El sistema de enzimas líticas de *Arthrobacter luteus* consiste en glucanasas y proteasas que tienen afinidad por la pared de levaduras (Lohr, 1988). La glucanasa no es activa sobre la pared intacta de levaduras, la que está compuesta por una capa exterior de mananos y proteínas y una interior de glucanos. De tal modo, en la pared intacta, los glucanos no están accesibles a la enzima. Por lo tanto los preparados de enzimas líticas deben contener proteasas líticas capaces de degradar la capa externa de mananoproteínas. La liberación de proteínas de la estructura externa permite que los glucanos queden expuestos y sean susceptibles al ataque por glucanasas (Hunter y Asenjo, 1988).

Durante la incubación con enzimas líticas se determinó la liberación de  $\beta$ -gal, invertasa, proteínas y carbohidratos de células tratadas y no tratadas con GA. En la composición química de la levadura los carbohidratos representan entre el 30 - 45% del peso seco (excluyendo levaduras que acumulan carbohidratos o lípidos), de los cuales el 40 - 50% se localizan en la pared celular (Charpentier y col., 1986; Hunter y Asenjo, 1987). Por lo tanto la solubilización de los carbohidratos es un parámetro adecuado para determinar si hay degradación de la pared celular. En la Figura 4.2 se presentan resultados de la liberación de proteínas y carbohidratos.

Como puede verse, la cinética de liberación de carbohidratos en ambos tipos de células es similar, y en 20 minutos la solubilización es elevada, (85% para células estabilizadas y 95% para células permeabilizadas), indicando una

digestión casi total de la pared celular. En las muestras control (sin enzimas líticas) la solubilización es prácticamente inexistente.

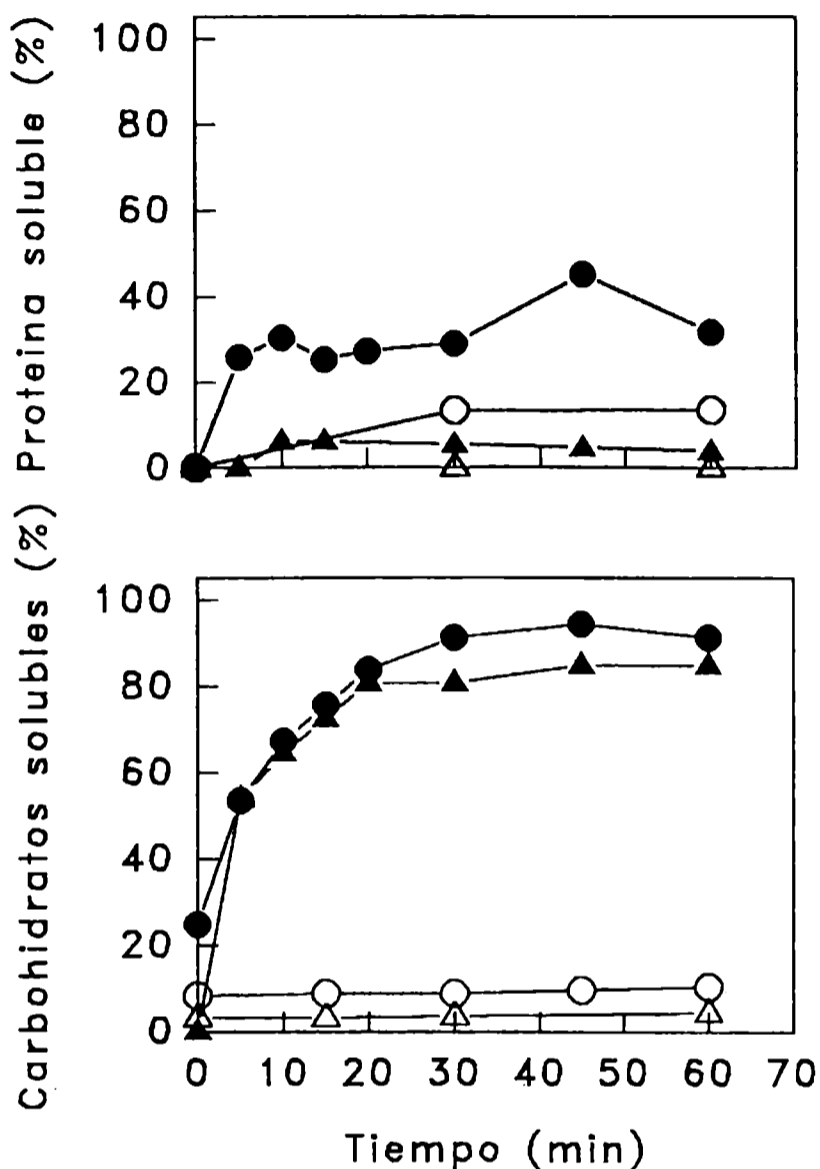
La liberación de proteínas en las células tratadas con GA es muy baja. Luego de una hora de incubación se solubiliza alrededor del 6% de la proteína total. En células permeabilizadas se alcanza la máxima concentración de proteína soluble en 10 minutos de incubación, la cual corresponde aproximadamente al 45% de la proteína total. En las muestras control se observa una solubilización progresiva de proteínas en las células no estabilizadas, mientras que es inexistente en las células tratadas con GA.

La liberación de  $\beta$ -gal e invertasa se detalla en la Figura 4.3. La invertasa se solubiliza como consecuencia de la destrucción de la pared. En células tratadas con GA la cinética de liberación es mas lenta que en las células sin tratamiento; esto podría ser atribuido a una aumento del tamaño de la proteína provocado por las reacciones de entrecruzamiento con glutaraldehído, lo que dificultaría la liberación de la enzima a través de los poros que se irían formando durante la degradación de la pared. Otro factor a tener en cuenta es que al cabo de una hora sólo el 64% de la actividad invertasa se encuentra soluble en el sobrenadante, lo cual indica que una fracción de la enzima ha quedado ligada a componentes capaces de sedimentar durante la centrifugación (14 000g, 2 min).

En relación a la cinética de liberación de  $\beta$ -gal, la solubilización de la enzima es total y ocurre rápidamente en la célula permeabilizada (5 - 10 min de incubación). Esto demuestra que la pared desempeña un papel fundamental en la cinética de liberación de las proteínas de las células permeabilizadas. Mas aún el mismo fenómeno se observa cuando las células se incubaron en presencia de un estabilizador osmótico (PPB-Mn 50 conteniendo 1 M de sorbitol), lo que es una comprobación de que la membrana plasmática está completamente desorganizada. Por su parte, en las células tratadas con GA la liberación es muy baja y, luego de una hora de incubación, solamente el 3.3% de la actividad  $\beta$ -gal total está presente en el sobrenadante. Es evidente que el GA ha producido una estructura insoluble que involucra las proteínas, entre ellas la  $\beta$ -gal, y esta propiedad no depende de que el sistema se halle confinado dentro del espacio originalmente determinado por la pared celular. En este sentido el sistema no es asemejable a lo que ocurre en una microencapsulación, donde la solubilización de los componentes en el medio externo depende de la integridad de la membrana (equivalente a la pared).



**Figura 4.2.** Liberación de proteína y carbohidratos de células permeabilizadas y células tratadas con glutaraldehído durante el tratamiento con enzimas líticas.



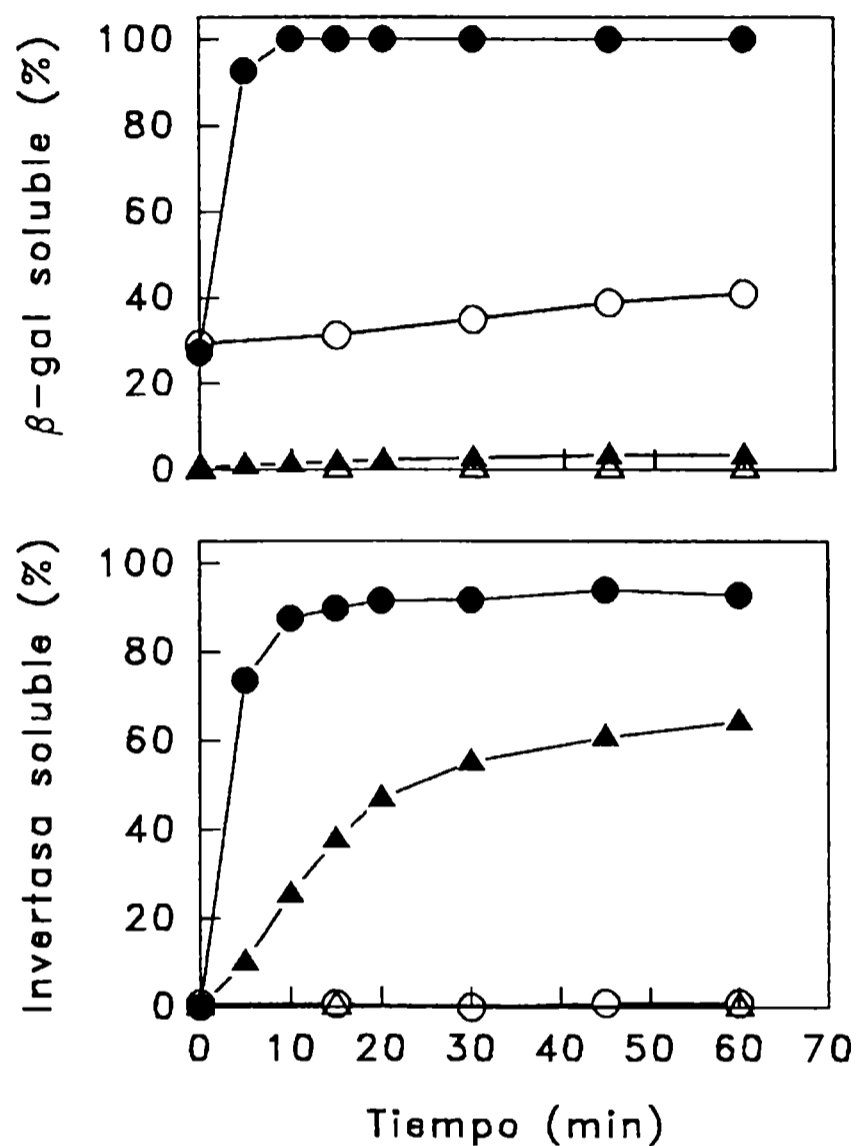
El tratamiento con enzimas líticas se efectuó a 30 °C, incubando una suspensión celular ( $7 - 8 \times 10^8$  células/ml), en PPB 50, pH 7, con Lyticase (200 U/ml). Los carbohidratos y las proteínas solubles se midieron en el sobrenadante obtenido luego de centrifugar a 14 000g, 2 min en microcentrifuga. En las muestras tratadas con enzimas líticas los valores de carbohidratos fueron corregidos descontando el valor aportado por la enzima (equivalente a 0.1 g de glucosa/l).

Células permeabilizadas: Carbohidratos totales: 1.34 mg/ml, proteína total: 1.55 mg/ml.

Células tratadas con GA: Carbohidratos totales: 1.23 mg/ml, proteína total: 1.3 mg/ml.

●: Células permeabilizadas tratadas con enzimas líticas. ○: Células permeabilizadas sin tratamiento con GA. ▲: Células estabilizadas con GA tratadas con enzimas líticas. Δ: Células estabilizadas con GA sin tratamiento.

**Figura 4.3.** Liberación de  $\beta$ -galactosidasa e invertasa de células permeabilizadas y células estabilizadas durante el tratamiento con enzimas líticas.



Condiciones de ensayo similares a las descritas en la Figura 4.2. La actividad  $\beta$ -gal e invertasa se mantuvo constante durante la incubación en todas las muestras ensayadas. Células permeabilizadas: Actividad  $\beta$ -gal total: 25.6 ONPG/ml, actividad invertasa total: 10.81 IAU/ml. Células tratadas con GA: Actividad  $\beta$ -gal total: 21.3 ONPG/ml, actividad invertasa total: 11.32 IAU/ml. ●: Células permeabilizadas tratadas con enzimas líticas. ○: Células permeabilizadas sin tratamiento con GA. ▲: Células estabilizadas con GA tratadas con enzimas líticas. Δ: Células estabilizadas con GA sin tratamiento.

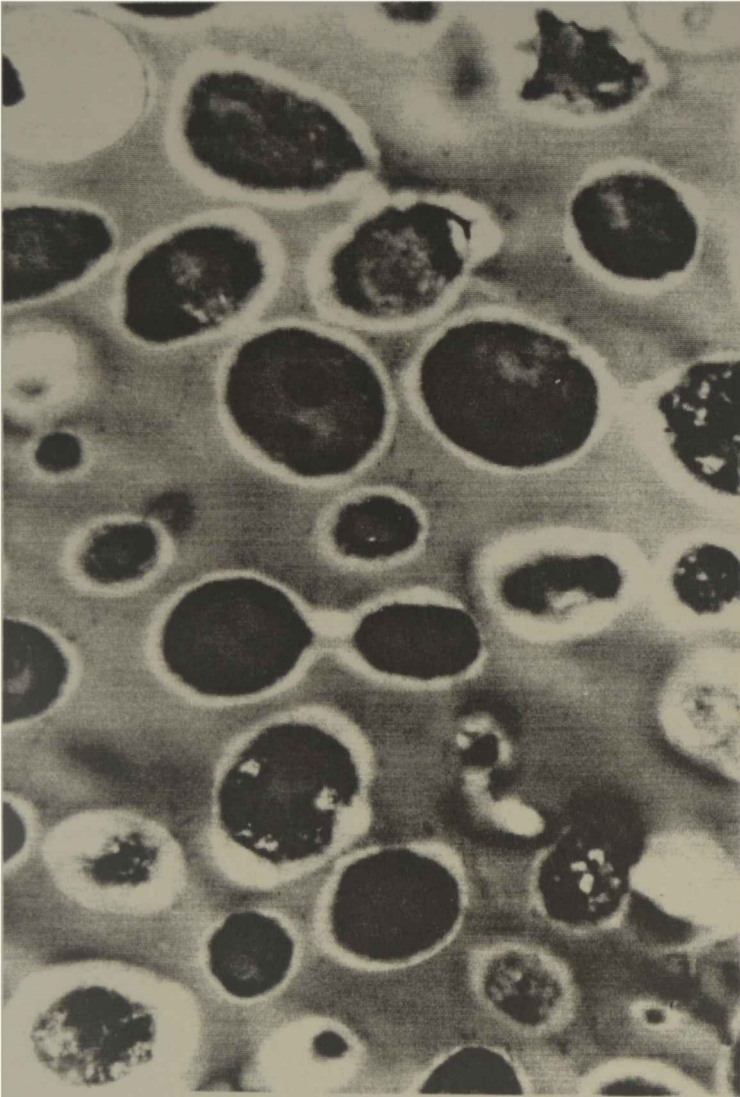
Las microscopías electrónicas confirman este modelo estructural. Las células permeabilizadas muestran una estructura que no se diferencia de una célula normal (Figuras 4.4.A y B.), mientras que las células permeabilizadas que han sido sometidas a tratamiento con enzimas líticas presentan una estructura celular desorganizada, y que en muchos casos ha desaparecido totalmente (Figura 4.4.C.). En las células sometidas a tratamiento con glutaraldehído, y que fueron tratadas con enzimas líticas, la pared ha desaparecido, y es posible observar una estructura definida que puede considerarse un "pseudo protoplasto" y que es la matriz insoluble generada por el GA (Figura 4.4.D.).

Por otra parte el hecho de que no existan grandes diferencias en la susceptibilidad de la pared de células tratadas y no tratadas con GA al tratamiento con enzimas líticas, es un indicio de que la pared ha sido poco modificada por el tratamiento de estabilización.

---

**Figura 4.4.A. y B.** Microscopías electrónicas de células sin tratamiento y células permeabilizadas.

---



**(A)**



**(B)**

---

Las microscopías electrónicas de transmisión se realizaron como se indica en la Sección 4.2.10.

**(A)** Células sin tratamiento cultivadas en sistema continuo  $D: .0.1 \text{ h}^{-1}$ . Aumento: 6900x.

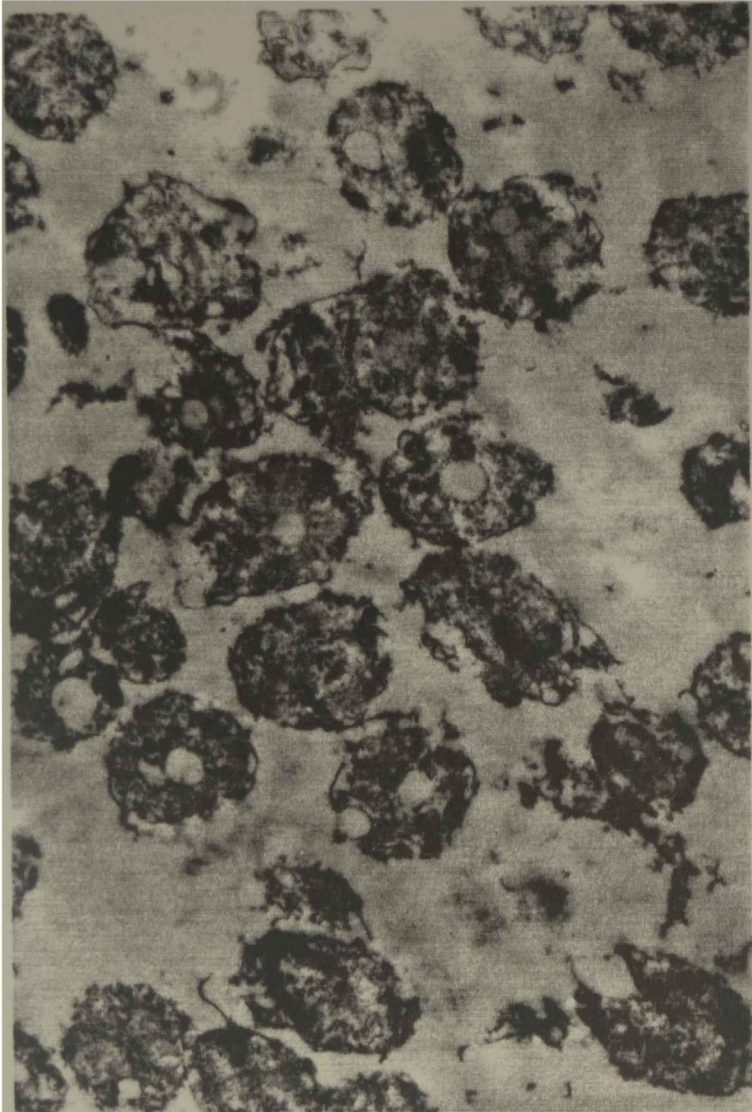
**(B)** Células permeabilizadas. Aumento: 7300x.

---

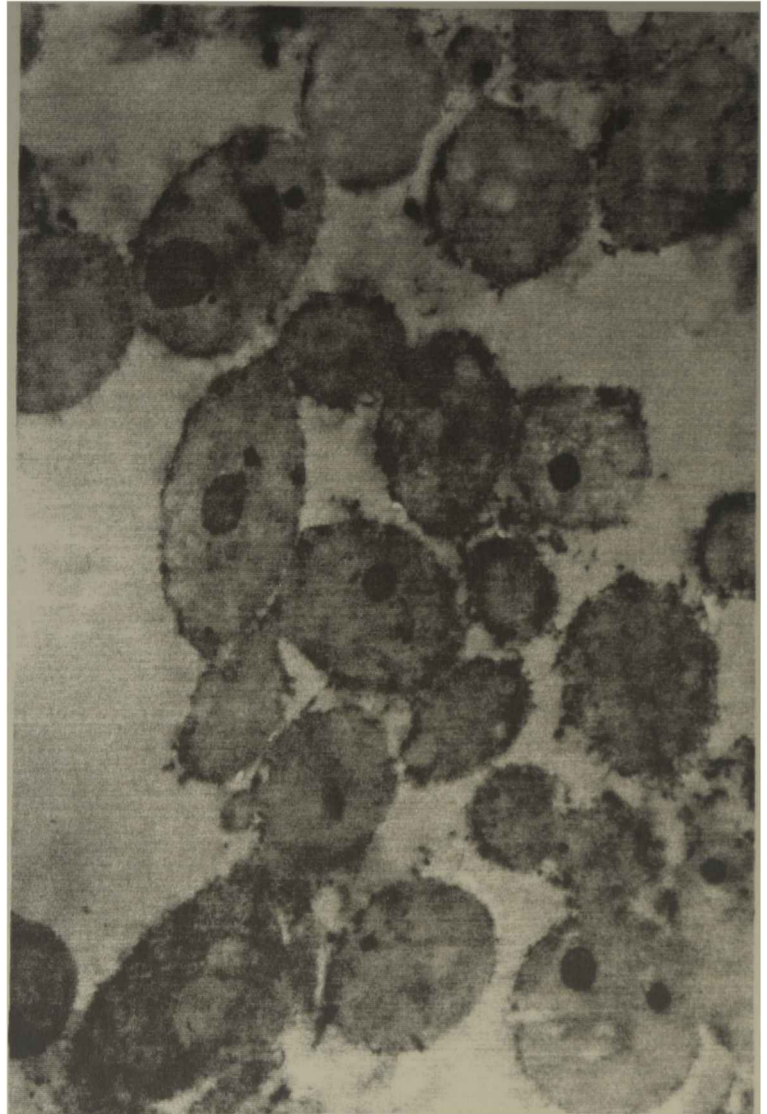
---

**Figura 4.4.C. y D.** Microscopías electrónicas de células permeabilizadas y células estabilizadas con glutaraldehído, tratadas con enzimas líticas de pared.

---



**(C)**



**(D)**

---

El tratamiento con enzimas líticas se realizó como se indica en la Sección 3.2.3.

**(C)** Células permeabilizadas tratadas con enzimas líticas. Aumento: 8250 $\times$ .

**(D)** Células tratadas con glutaraldehído y posteriormente con enzimas líticas. Aumento: 7590 $\times$ .

---

#### **4.3.4. Relación entre la integridad celular durante el tratamiento con GA y el efecto de insolubilización**

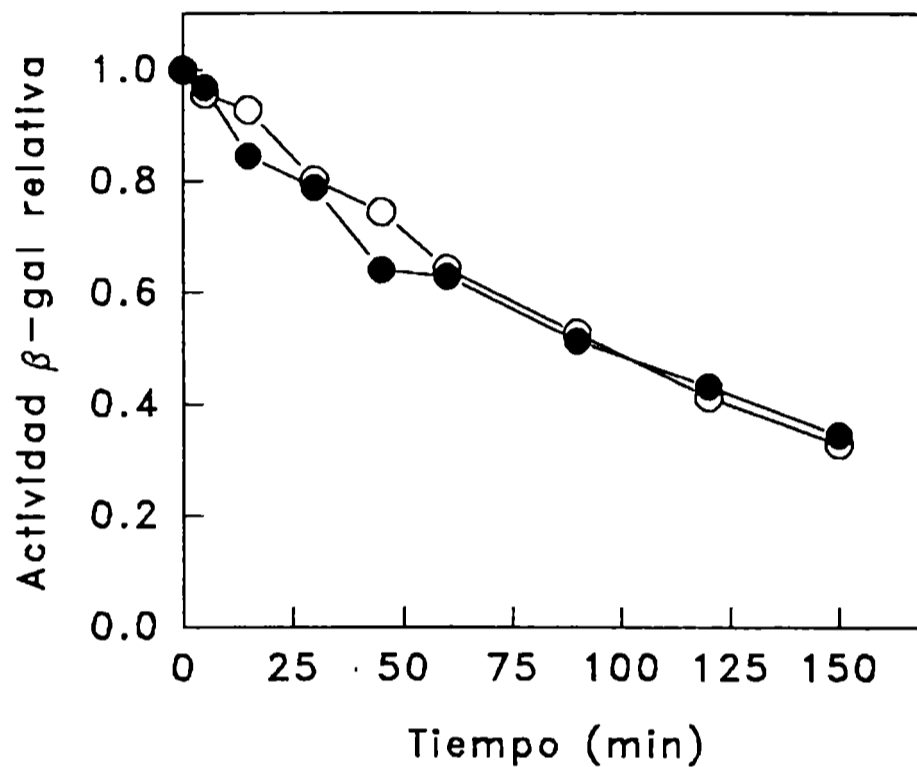
Para determinar qué función cumple la integridad celular durante el tratamiento con GA en las propiedades del sistema, se realizó una experiencia en la cual el tratamiento con el reactivo ligante se llevó a cabo con un homogeneizado celular y en un extracto derivado del mismo. El homogeneizado se obtuvo por ruptura mecánica de las células con bolillas de vidrio. La concentración de sólidos totales del homogeneizado fue equivalente a 60 g/l de levadura seca. Una fracción de dicho homogeneizado fue centrifugada, obteniéndose así un extracto celular sin sólidos en suspensión.

La incubación del homogeneizado y el extracto se efectuó con 50 mM de GA durante 2 horas a 0 °C. La evolución de la actividad  $\beta$ -gal durante la incubación se muestra en la Figura 4.5. Puede verse que, en ambos sistemas, ocurre una pérdida de actividad, más rápida que la observada en células enteras. Para evaluar si el tratamiento provocó modificaciones en la solubilidad de la enzima, las muestras, luego de 2 horas de incubación, fueron centrifugadas en frío (20 000g, 20 min). El análisis de la actividad se realizó tomando una muestra de sobrenadante que se diluyó en buffer. El resto de la muestra inmediatamente se homogeneizó y se diluyó en la misma proporción para medir la actividad total. Los resultados indican que, a pesar de la pérdida de actividad (parámetro indicador de la reacción entre el GA y la enzima), la  $\beta$ -gal en el extracto y en el homogeneizado permanece soluble (Tabla 4.5). Cabe preguntar si el tratamiento con GA genera algún tipo de entrecruzamiento entre las proteínas del extracto o del homogeneizado. Para ello se realizó una cromatografía de exclusión molecular de los extractos tratados con GA, con el fin de visualizar cambios en el peso molecular de la proteína. En esta experiencia el extracto se incubó a 0 °C durante 1 hora, con 50 mM de GA. La muestra fue tratada con  $\text{SO}_3\text{HNa}$  para eliminar el GA residual. El relleno empleado (Sephadex G-200) excluye moléculas de peso molecular mayor que 600 kDa, con lo que pueden detectarse cambios en el peso molecular de  $\beta$ -gal.

---

**Figura 4.5.** Evolución de la actividad  $\beta$ -gal de un extracto y un homogeneizado celular durante el tratamiento con glutaraldehído.

---



---

El homogeneizado fue obtenido por ruptura mecánica con bolillas de vidrio de acuerdo a lo descrito en la Sección 4.2.4. El extracto fue obtenido por centrifugación (20 000g, 20 min) del homogeneizado. Tratamiento con glutaraldehído: ambas muestras se incubaron con 50 mM de GA, a 0 °C. ○: Actividad  $\beta$ -gal relativa en el homogeneizado. Concentración total de proteína: 28 g/l. Actividad inicial 406 ONPG/ml. ●: Actividad  $\beta$ -gal relativa en el extracto. Concentración de proteína: 20 g/l. Actividad inicial 404 ONPG/ml.

---

**Tabla 4.5.** Solubilidad de la actividad  $\beta$ -gal en un extracto y un homogeneizado celular tratados con glutaraldehído.

Tratamiento	Fracción	Actividad (ONPG/ml)
H	T	136
	S	131
E	T	133
	S	144

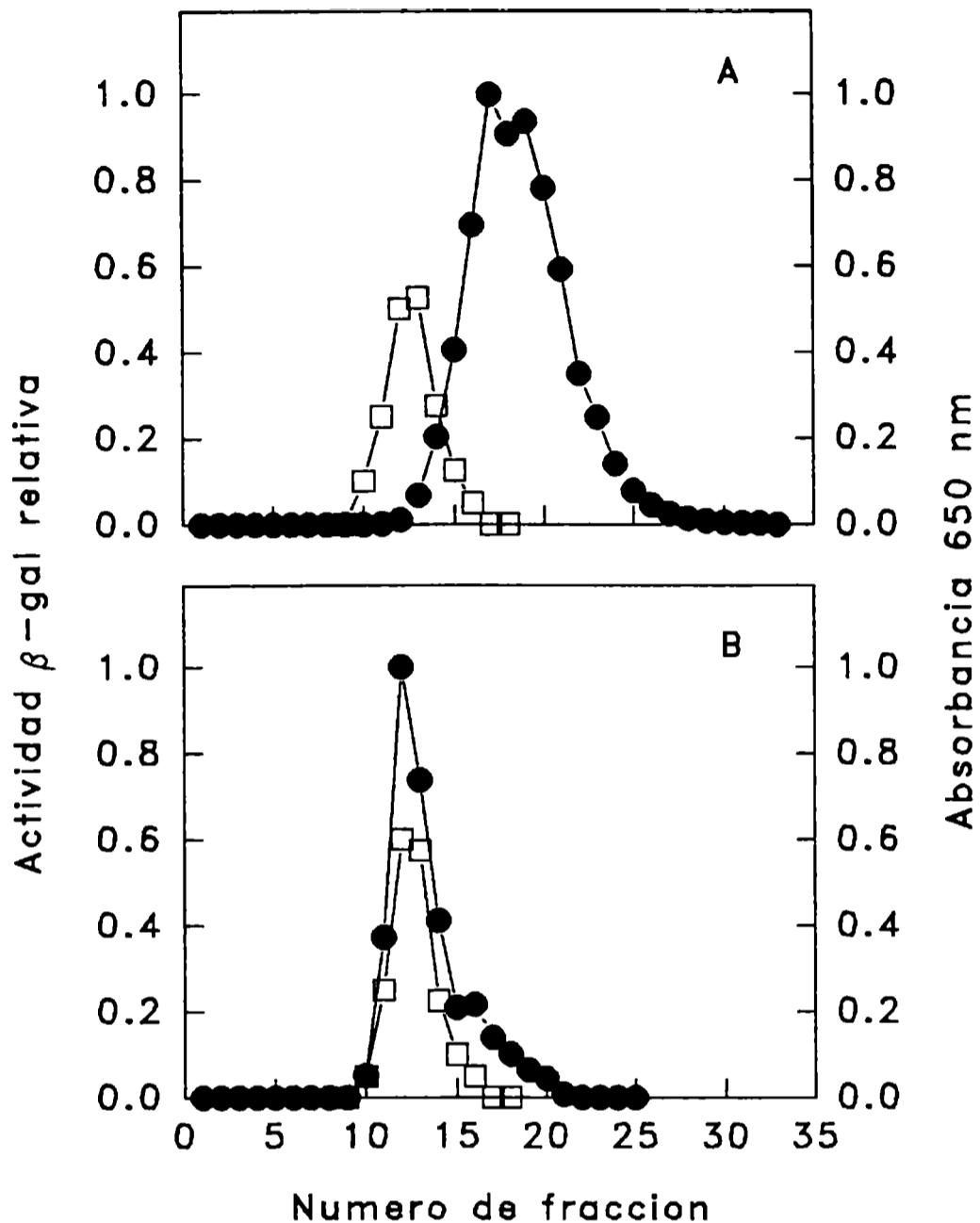
Las condiciones de ensayo se describen en la Figura 4.5. H: Homogeneizado. E: Extracto. T: Actividad total. S: Actividad en el sobrenadante después de centrifugar (20 000g, 20 min).

Las muestras fueron centrifugadas (20 000g, 20 min), y el sobrenadante fue sembrado en la columna junto con azul dextrano 2 000, empleado como marcador, que eluye en el volumen excluido. Las curvas de elución se presentan en la Figura 4.6. Como puede verse, el extracto sometido a tratamiento con GA presenta un máximo de actividad  $\beta$ -gal que eluye conjuntamente con el dextrano en la fracción excluida; mientras que en el extracto no tratado la enzima tiene un tiempo de elución mayor. Puede concluirse entonces que la enzima participa del entrecruzamiento, generando conglomerados proteicos de alto peso molecular. Sin embargo el tipo de producto formado por el entrecruzamiento no presenta la propiedad de ser insoluble. La formación de conglomerados insolubles ocurre cuando la reacción con GA se realiza con la célula entera.

La alta concentración de proteínas y la presencia de otros componentes o estructuras de la matriz celular pueden ser los requisitos para que la reacción de entrecruzamiento genere un producto insoluble. Un fenómeno similar se observa con proteínas puras. La formación de productos insolubles requiere de proteínas cristalizadas o de una previa precipitación de la enzima en solución, con sales o solventes, lo que de algún modo incrementa la concentración efectiva de proteínas en el medio de reacción (Habeeb, 1967; Habeeb y Hiramoto, 1968; Jansen y col., 1969).



**Figura 4.6.** Perfil de elución de  $\beta$ -galactosidasa en cromatografía de permeación por geles de muestras de extractos celulares.



La columna usada fue de 0.8 x 25 cm, rellena con Sephadex G-200. Se eluyó con PPB-Mn 50 conteniendo 0.02% de azida de sodio, a un caudal aproximado de 0.17 ml/min, las fracciones recolectadas fueron de 0.5 ml. **A:** Extracto celular obtenido por ruptura mecánica con bolillas de vidrio y posterior centrifugación (20 000g, 20 min). **B:** Sobrenadante de un extracto celular tratado con 50 mM de GA durante 1 hora a 0 °C; luego de la incubación, se adicionó 40 mM de SO<sub>3</sub>HNa y se centrifugó 20 000g, 20 min. En todos los casos se sembraron en la columna 0.5 ml de muestra conteniendo 0.25 ml de extracto y 0.25 ml de extracto y 0.25 ml de una solución (1%) de azul dextrano 2 000. ●: Actividad  $\beta$ -gal relativa a la máxima. □: Absorbancia a 650nm (azul dextrano).

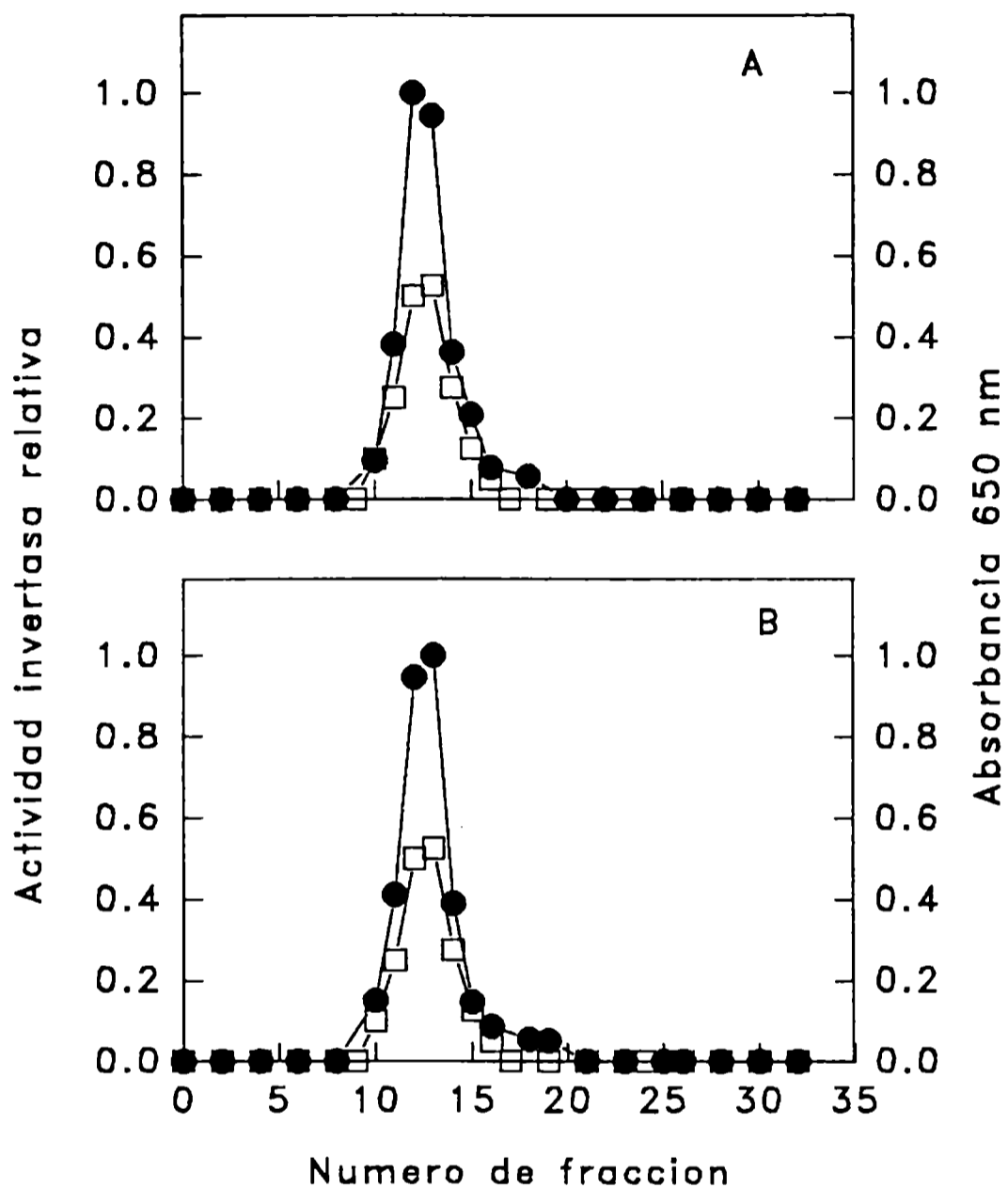
Un análisis similar se realizó con invertasa (Figura 4.7.). Sin embargo, en este caso no pueden extraerse conclusiones ya que el perfil de elución de ambos extractos fue similar. Esto indica que la enzima periplasmática tiene un peso molecular mínimo de 600 kDa. Los resultados son coincidentes con lo descrito para la enzima de *S. cerevisiae* cuyo peso molecular se estimó en 590 kDa (Nobel y col., 1989).

#### **4.3.5. Susceptibilidad de las células estabilizadas a los esfuerzos de corte**

La ruptura celular con bolillas de vidrio es un método ampliamente usado para liberar proteínas intracelulares. En este caso la desintegración celular permitió liberar la  $\beta$ -gal al medio extracelular, sin afectar su actividad, y con un rendimiento mayor al 95%. Sin embargo cuando el mismo tratamiento se realizó a células estabilizadas con GA, se evidenció una progresiva pérdida de actividad con los ciclos de ruptura. Esto indica que el *cluster* de material celular formado por el glutaraldehído es sensible a los esfuerzos de corte, provocados durante la ruptura mecánica, propiedad que caracteriza a las estructuras de alto peso molecular (Merchuk, 1987).

Por otro lado cuando la suspensión homogeneizada fue centrifugada la actividad  $\beta$ -gal residual permaneció asociada a la fracción que sedimenta por centrifugación, y la concentración de proteína soluble fue muy reducida (< 0.5 g/l). Geles de electroforesis de los sobrenadantes obtenidos de muestras sometidas a 8 - 12 ciclos de ruptura mostraron ausencia total de proteínas en el gel de corrida, y solo pudo observarse una banda de proteínas que no ingresa en el gel se *stacking* (3%). Teniendo en cuenta que este retiene proteínas de peso molecular mayor que 500 kDa, es evidente que la homogeneización mecánica del sistema celular estabilizado no produce fragmentos solubles de bajo peso molecular.

**Figura 4.7.** Perfil de elución de invertasa en cromatografía de permeación por geles de muestras de extractos celulares.

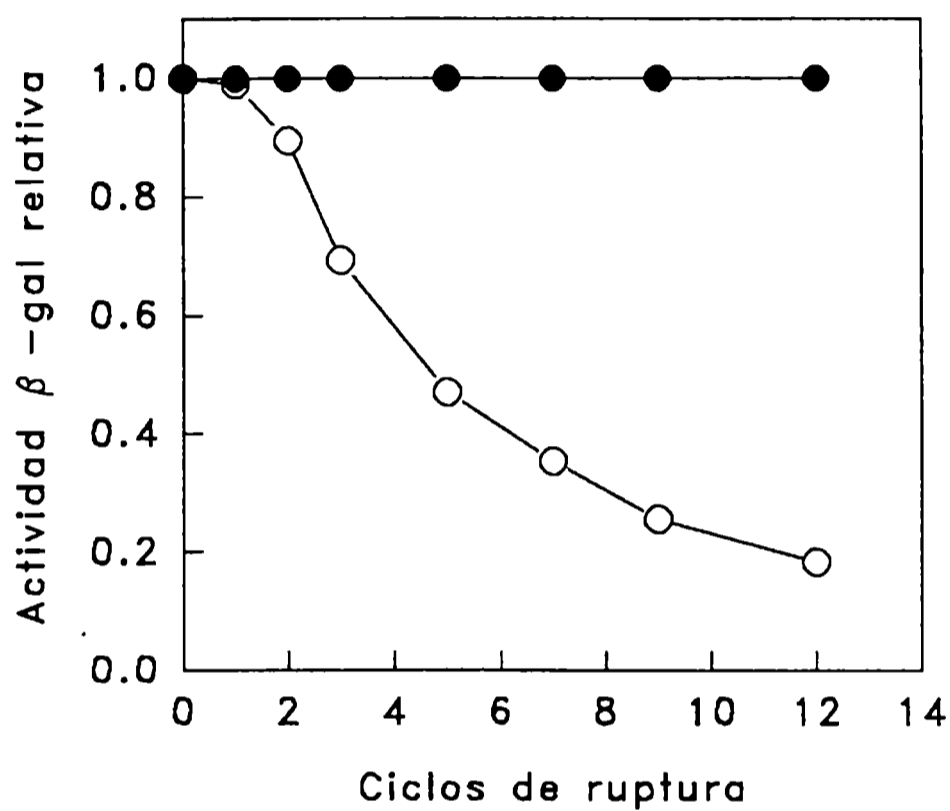


Las condiciones para la obtención de los extractos y elución en columna son las mismas que las expuestas en la Figura 4.6. **A:** Extracto celular sin tratamiento. **B:** Sobrenadante del extracto celular tratado con 50 mM de GA, 1 hora a 0 °C. ●: Actividad invertasa relativa a la máxima. □: Absorbancia a 650nm (azul dextrano).

---

**Figura 4.8.** Susceptibilidad de la  $\beta$ -galactosidasa a los esfuerzos de corte provocados durante la homogeneización celular.

---



---

La homogeneización celular se realizó agitando, en agitador para tubos (Vortex), un volumen de suspensión celular conteniendo  $1.5 \times 10^9$  células/ml con dos volúmenes de bolillas de vidrio ( $\phi$ : 0.45 - 0.52 mm). La agitación se realizó en ciclos de 30 seg enfriando la muestra a 0 °C entre cada ciclo. La actividad se midió usando ONPG como sustrato. ●: Actividad  $\beta$ -gal de células permeabilizadas (relativa al valor inicial). ○: Actividad  $\beta$ -gal de células estabilizadas (relativa al valor inicial).

---

#### 4.3.6. Susceptibilidad de la estructura estabilizada a la degradación proteolítica externa

Además del efecto que producen los esfuerzos de corte durante la ruptura mecánica, se estudió la susceptibilidad de las células estabilizadas a la acción de proteasas exógenas. Para ello una suspensión celular se incubó en presencia de proteasas tales como tripsina, una proteasa neutra de *Bacillus* (Neutrase) y un extracto activado de *S. cerevisiae*. Debido a la solubilización progresiva de la  $\beta$ -gal en las células permeabilizadas, y para evitar la heterogeneidad del sistema, ya que las proteasas actuarían sobre una fracción de sustrato soluble y otra fracción retenida en las células, se usó como control una suspensión celular en la cual toda la enzima se encontraba soluble en el medio extracelular. La actividad de las proteasas fue cuantificada empleando Azocoll como sustrato. La actividad de proteasas en mezcla de reacción fue equivalente a 0.02 - 0.03 U/ml. En el caso del extracto activado de *S. cerevisiae* la actividad fue 7 veces menor (0.0036 U/ml). Para detener la acción proteolítica luego de la incubación las muestras fueron tratadas con PMSF (tripsina) y *o*-fenantrolina (Neutrase), con concentraciones finales en mezcla de reacción de 1 y 10 mM, respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 4.6.

La incubación de las células con tripsina provoca la solubilización de la  $\beta$ -gal acompañada de una disminución en la actividad tanto en células permeabilizadas como en células estabilizadas. En esta última, incubaciones mas prolongadas (3 h), mostraron una pérdida de actividad del 62% y la fracción soluble fue el 41% de la actividad residual. La tripsina hidroliza enlaces en los que participa el grupo carboxilo de lisina o arginina. Probablemente los grupos aminos de estos residuos que no están comprometidos en enlaces con GA sean los susceptibles a la acción hidrolítica de la enzima. La posibilidad de una hidrólisis de los residuos que han intervenido en la reacción quedan aún por establecerse.

Por su parte, la proteasa neutra provoca una liberación de la enzima sin pérdida apreciable de actividad, mientras que el extracto activado de *S. cerevisiae* no tuvo efecto alguno sobre la actividad y liberación de  $\beta$ -gal lo que sería atribuible a su menor actividad proteolítica.

Resulta interesante observar que la velocidad de solubilización de la enzima, y su inactivación se incrementan cuando, previamente a la adición de

proteasas, las células son sometidas a la acción de enzimas líticas para degradar la pared. Por lo tanto, si bien las proteasas usadas son capaces de difundir a través de la pared celular, su eliminación facilita la acción proteolítica externa. Se puede observar también que el efecto proteolítico depende de la concentración de enzima (Tabla 4.7.).

**Tabla 4.6.** Susceptibilidad de células permeabilizadas y células estabilizadas a la acción de proteasas externas.

Tratamiento		Actividad $\beta$ -gal			
		P		GA	
		Inicial	F	Inicial	F
Tripsina	T	100	29.4	100	54.3
	S	94	nd	1.7	18.4
Neutrased	T	100	34	100	100
	S	94	nd	1.7	7.2
E	T	100	100	100	100
	S	94	94	1.7	3.2
Control	T	100	85	100	100
	S	94	100	1.92	1.7

En el ensayo la concentración celular empleada fue  $2.4 \times 10^9$  células/ml en buffer fosfato de sodio 0.1 M. Las concentraciones de tripsina y proteasa neutra en la mezcla de incubación fueron 10 mg/ml y 20 mg/ml respectivamente, que corresponde a 0.025 U/ml de actividad (Azocoll como sustrato). E: Extracto activado de *S. cerevisiae* (0.0036 U/ml). T: Actividad total relativa, S: Actividad soluble, porcentaje relativo a la actividad total correspondiente. P: Células permeabilizadas; GA: Células tratadas con GA. F: Actividad luego de 1 hora de incubación con proteasas a 37 °C. nd: No determinado. Control: Sin agregado de proteasas.

**Tabla 4.7.** Susceptibilidad de células estabilizadas, tratadas con enzimas líticas, a la acción de diferentes concentraciones de proteasas externas.

Tratamiento		Actividad $\beta$ -gal <sup>c</sup>	
Enzimas líticas <sup>a</sup>	Tripsina <sup>b</sup>	T	S
+	1	83.5	17
	10	54.3	23
--	10	65	18.4
Control	Control	100	1.7

Las condiciones son similares a las descritas en la Tabla 4.5. <sup>a</sup>: Incubación con enzimas líticas (200 U/ml), 30 min, 30 °C. <sup>b</sup>: Tripsina adicionada (mg/l) en mezcla de reacción. <sup>c</sup>: Actividad  $\beta$ -gal relativa al control luego de 1 hora de incubación a 37 °C. T: Actividad total relativa al valor inicial del control. S: Actividad soluble (14 000g, 2 min) % del valor total. --: Sin agregado de enzimas líticas. Control: Sin agregado de enzimas líticas ni proteasas.

De los resultados expuestos puede concluirse que la estructura generada por el glutaradehído no es refractaria a la acción proteolítica. El comportamiento del sistema podría compararse con lo que ocurre con ciertas proteínas insolubles, que se usan como sustratos de proteasas (por ejemplo: Azocoll).

#### 4.4. DISCUSION

En el presente Capítulo se analizaron las modificaciones que el proceso de permeabilización y el tratamiento con glutaraldehído producen en la estructura celular y que explican de algún modo las propiedades de ambos sistemas.

La permeabilización de levaduras, mediante solventes orgánicos, genera una célula no viable. A este proceso contribuye también el congelamiento y descongelamiento de la biomasa, lo que inevitablemente ocurre en razón de su conservación a -20 °C. El tratamiento no solo afecta a la membrana plasmática sino que además provoca la desorganización de las membranas internas. Por lo tanto cuando las células permeabilizadas se incuban en buffer, las proteínas de organelas tales como mitocondrias, vacuolas, etc. difunden al exterior conjuntamente con las proteínas del citosol, como la  $\beta$ -gal. Esta solubilización ocurre a través de la pared esencialmente intacta. Este proceso es selectivo, ya que solamente difunden proteínas de peso molecular de hasta 400 kDa, generando, para las proteínas extraídas, un extracto más purificado, comparado con el obtenido por ruptura mecánica. La difusión a través de la pared es un proceso rápido si se lo compara con la activación del proceso autolítico. Esta es la causa de que la actividad  $\beta$ -gal pueda recuperarse en su totalidad en el medio extracelular. Un aspecto importante a resaltar son las variaciones encontradas en el tiempo de solubilización de la enzima (3 - 24 h cuando se incuban las células permeabilizadas en buffer a 30 °C). Esto indica que además de los parámetros de incubación, la optimización de dicho proceso requeriría de un estudio más detallado del estado final de la membrana y pared celular en el momento de la incubación. Asimismo sería necesario determinar que efecto tienen la conservación de la biomasa y las cinéticas de congelamiento y descongelamiento sobre el comportamiento del sistema celular permeabilizado.

Luego de esta etapa inicial de solubilización se pone en evidencia el proceso autolítico que conduce a la degradación de las estructuras celulares. Un evento típico de este fenómeno es la proteólisis generalizada.

El tratamiento con glutaraldehído estabiliza el sistema de células permeabilizadas, lo que puede ser atribuido en gran medida a la inhibición del proceso autolítico endógeno. Esta inhibición puede deberse a diversas causas, tales como la fijación de enzimas, lo que imposibilita el acceso a sus sustratos, la inactivación de las proteasas, ya sea por inactivación química o por la formación



de complejos estables enzima-inhibidor. Esta última posibilidad es poco probable ya que los extractos frescos manifiestan una considerable actividad proteolítica antes de la activación a pH ácido, la que sería suficiente para provocar la proteólisis.

Resultó interesante poder determinar si las proteasas son de algún modo inactivadas por el tratamiento de estabilización. Para ello se tomó como base la medida de la actividad aminopeptidasa, ya que se efectúa con un sustrato de bajo peso molecular (L-leucina *p*-nitroanilida), que, al igual que el ONPG, es capaz de difundir hacia la enzima inmovilizada y poner en evidencia su actividad. Los resultados se presentan en la Tabla 4.8. Como puede observarse, la actividad aminopeptidasa se manifiesta en las células tratadas con GA, y es del mismo orden que la obtenida en un extracto celular.

---

**Tabla 4.8.** Actividad aminopeptidasa en diferentes sistemas enzimáticos.

---

Tratamiento	Actividad <sup>a</sup>
E	$9.38 \times 10^{-3}$
CP	$10^{-3}$
GA	$9.3 \times 10^{-3}$

---

<sup>a</sup>: Actividad aminopeptidasa (U/10<sup>9</sup> células). E: Extracto celular obtenido por ruptura mecánica de las células con bolillas de vidrio. CP: Células permeabilizadas. GA: Células tratadas con glutaraldehído.

---

Si se considera que el comportamiento de la aminopeptidasa es extrapolable a otras actividades proteolíticas, se puede concluir que, al igual que la  $\beta$ -gal, las proteasas han sido fijadas o inmovilizadas por el glutaraldehído, de modo que no pueden difundir libremente hacia los sustratos. Esta sería la causa principal de la inhibición del sistema autolítico endógeno.

Por otro lado la liberación de carbohidratos durante la autólisis y la liberación de invertasa durante la incubación en buffer de células estabilizadas, indican que el sistema autolítico de la pared es solo parcialmente inhibido por el tratamiento con GA. La presencia de glucanasas endógenas capaces de hidrolizar la pared de levaduras ha sido bien documentado. Farkas (1989) y Hien y Fleet (1983) describieron y caracterizaron diferentes  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glucanasas en *S. cerevisiae*, capaces de digerir la pared celular y observaron que el 30% de la actividad  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) glucanasa se localiza en la pared, mientras que la actividad restante se encuentra en el medio intracelular. Si se considera que las glucanasas citoplasmáticas son susceptibles de reaccionar con el GA y quedar fijadas (al igual que las proteasas) entonces la degradación de la pared estaría mediada por las glucanasas específicamente localizadas en dicha región, las que serían menos afectadas por el agente ligante.

La estabilización de la enzima requiere no solo preservar la actividad sino también evitar su liberación al medio extracelular. Podría pensarse que el tratamiento con GA disminuye de algún modo la porosidad de la pared y/o incrementa el tamaño de las proteínas citoplasmáticas, impidiendo así su difusión al exterior. Este comportamiento sería análogo a una microencapsulación. Sin embargo, el hecho de que la remoción total de la pared por digestión de la misma, mediante enzimas líticas exógenas, no implique la solubilización de la  $\beta$ -gal, indica que la retención de la enzima no es debido a un efecto "tamiz" mediado por la pared. La retención se debe en realidad a la formación de un conglomerado insoluble o pseudo protoplasto, cuya existencia es independiente de la presencia de la pared celular. Por otro lado, una fracción de la actividad invertasa queda ligada a esa estructura insoluble, lo que indica que una fracción de las proteínas de pared han participado aunque parcialmente de la reacción de entrecruzamiento. Las microscopías electrónicas confirman este modelo de reacción entre el GA y la célula permeabilizada. La formación del pseudo protoplasto depende de la integridad celular durante el tratamiento con GA. Al dispersar los componentes celulares en el medio por desintegración mecánica de las células, la reacción de entrecruzamiento ocurre, lo que fue confirmado por la cromatografía de exclusión molecular, pero es insuficiente para generar una estructura insoluble. Por lo tanto, la alta concentración de proteínas y las características estructurales de la matriz celular parecen ser condiciones necesarias para lograr la estructura insoluble. Como se había mencionado anteriormente el sistema autolítico de pared no es totalmente bloqueado por el glutaraldehído. Esta situación y el hecho de que gran parte de la actividad

invertasa sea capaz de solubilizarse es una prueba de que la reacción entre el GA y las proteínas periplasmáticas no tienen las mismas características que la reacción en el citoplasma. Si se considera a la levadura como una esfera cuyo espesor de pared es el 2 - 5% del diámetro total, entonces el volumen de la región periplasmática representa alrededor del 10% del volumen celular. A su vez el 10 - 20% de la proteína se localiza en dicha región (Charpentier y col., 1986; Hunter y Asenjo, 1987) de lo cual se puede estimar que la densidad de proteínas en esta región no debe diferir sustancialmente de la presente en la región citoplasmática. Se concluye entonces que la causa por la cual las proteínas de pared no se insolubilizan totalmente tendría relación con su organización o disposición mas que con la concentración efectiva en la región. El pseudo protoplasto presenta propiedades que caracterizan a estructuras de alto peso molecular, tal como la sensibilidad a los esfuerzos de corte. Dicha sensibilidad se pone en evidencia, por la pérdida de actividad  $\beta$ -gal, cuando el sistema es agitado en presencia de bolillas de vidrio.

Por otro lado el pseudo protoplasto es susceptible a la degradación proteolítica exógena que no solo solubiliza la enzima, sino que además provoca una pérdida de actividad. Este factor es importante de tener en cuenta ya que la contaminación bacteriana es común en los sistemas de enzimas inmovilizadas que operan con sustratos naturales, y precisamente una de las causas que provoca la desactivación de las enzimas, es la actividad proteolítica de los microorganismos contaminantes. Generalmente las proteasas extracelulares de origen microbiano tienen pesos moleculares bajos y pueden difundir a través de la pared celular y degradar la estructura insoluble. El hecho de que la acción proteolítica exógena sea efectiva es una prueba de que las propiedades de las proteínas han sido solo parcialmente modificadas por el reactivo ligante.

---

**CAPITULO 5**

**PROPIEDADES DEL BIOCATALIZADOR**

## 5.1. INTRODUCCION

El conocimiento de cómo y en qué extensión la estabilización de la  $\beta$ -gal en las células permeabilizadas afecta a factores tales como su actividad y estabilidad, es esencial para la aplicación adecuada de las células como biocatalizador. Estos factores determinan si el catalizador puede ser usado en sistema por lotes repetidamente, o en reactores continuos por largos períodos.

Los procesos de inmovilización producen diversos cambios en las propiedades de las enzimas, cuya magnitud es difícil de predecir. En general, la estabilidad térmica de las mismas aumenta respecto de aquella que presenta la enzima libre. Este aumento en la estabilidad térmica se atribuye a la formación de uniones enzima-soporte, que confieren a la proteína mayor rigidez, haciéndola más resistente a aquellos tratamientos que involucren un cambio en su estructura, tales como la desactivación térmica o química. Sin embargo, este comportamiento no es general y se ha observado que algunas enzimas inmovilizadas se desnaturalizan más rápido que en forma libre.

La modificación de las propiedades cinéticas al igual que la estabilidad, depende en gran medida del tipo de enzima y del método de inmovilización empleado. En muchas ocasiones las propiedades cinéticas se estudian con sustratos artificiales que, si bien facilitan la determinación experimental de la actividad enzimática, no reflejan el verdadero comportamiento del catalizador frente a los sustratos en que será aplicada la enzima. Tal es el caso de  $\beta$ -gal y del sustrato cromogénico ONPG. Las medidas de actividad con este sustrato resultan prácticas para evaluar la actividad residual después del tratamiento con GA o para cuantificar la pérdida de actividad debida a la desactivación de la enzima. Sin embargo, para evaluar las propiedades catalíticas se debe emplear lactosa, ya que este es el sustrato natural de la enzima.

En el presente Capítulo se describen algunas propiedades del producto celular estabilizado y se las compara con las propiedades de la enzima libre. Se analiza el proceso de hidrólisis y la distribución de los productos de reacción y se estudia la reutilización de las células tanto en soluciones buffer como en sustratos naturales.

## **5.2. MATERIALES Y METODOS**

### **5.2.1. Reactivos y soluciones**

Los azúcares lactosa, glucosa, galactosa y rafinosa fueron Sigma. El resto de los reactivos usados fueron de grado analítico. Las soluciones buffer empleadas fueron los siguientes: PPB 20, PPB-Mn 20, PPB-Mn 50 (Sección 3.2.2.) y NaPB-Mn 20 (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-ClH, pH 6.6 conteniendo 0.1 mM de MnCl<sub>2</sub>). En los ensayos de estabilidad térmica se empleó PPB-Mn 20 conteniendo 0.2 mM de Cl<sub>2</sub>Mn. Los ensayos de hidrólisis se realizaron usando leche descremada en polvo reconstituida con agua desionizada para obtener una concentración de lactosa de 139 mM. El reactivo desproteinizante usado para detener la hidrólisis en leche se preparó disolviendo 2.1 g de ZnCl<sub>2</sub> y 3.125 g de ácido fosfotúngstico en 20 ml de agua destilada.

La determinación enzimática de glucosa se llevó a cabo utilizando el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia enzimática Wiener).

### **5.2.2. Fuentes de enzima utilizadas**

El preparado celular estabilizado (PCE) se obtuvo, tal como se indicó en la Sección 3.2.3. Las células fueron conservadas a 5 °C en PPB-Mn 50 (conteniendo 0.2% de metilparabeno). La concentración celular de la suspensión fue de 4 x 10<sup>9</sup> células/ml y la actividad enzimática, de 250 - 300 LAUest/ml o 110 ONPG/ml (ver Sección 5.2.3.).

Cuando fue requerido un determinado volumen de la suspensión celular se centrifugó (3 000g, 10 min), se lavó 3 - 4 veces con buffer y se resuspendió en el buffer correspondiente a la concentración deseada.

Como fuente de enzima libre o soluble (ES) se empleó un extracto celular obtenido por ruptura mecánica de las células con bolillas de vidrio como se indica en la Sección 4.2.4. Al extracto se le adicionó 1 mM de PMSF y 10% de glicerol para inhibir parcialmente la acción proteolítica y para proteger la enzima durante el almacenamiento. La concentración de proteínas en el extracto fue de

14.2 g/l y la actividad 1 000 LAUest/ml o 381 ONPG/ml. El extracto se conservó a -20 °C y no se observó pérdida de actividad luego de descongelado.

### **5.2.3. Ensayos de actividad**

La actividad con ONPG se determinó como se indica en la Sección 2.2.6.1. La velocidad inicial de hidrólisis de lactosa se midió agregando 0.1 ml de suspensión de células o solución de enzimas a 2.4 ml de la solución de sustrato (leche o solución de lactosa en buffer, según corresponda). La muestra se incubó a la temperatura seleccionada y el tiempo de reacción se varió de acuerdo a la actividad enzimática. En todos los casos, el grado de hidrólisis de lactosa fue inferior al 5%. Las muestras de enzima se prepararon en el mismo buffer de reacción. Para las hidrólisis en leche las muestras se prepararon en PPB-Mn 20.

La reacción en buffer se detuvo calentando la muestra en agua a ebullición, durante 1 minuto. Cuando el sustrato empleado fue leche, la hidrólisis se detuvo agregando 1.2 ml de la mezcla de reacción a 0.3 ml de reactivo desproteinizante, la muestra se mantuvo, como mínimo, 15 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se centrifugó en microcentrífuga (14 000g, 2 minutos), reservando el sobrenadante para la determinación enzimática de glucosa. Como patrón se usó una solución de glucosa en buffer o en leche, procesadas del mismo modo.

Una unidad de actividad enzimática (LAU) corresponde a la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo.

Se referirá como unidad estándar de hidrólisis (LAUest) a la efectuada a 37 °C en solución de lactosa 139 mM, preparada en buffer PPB-Mn 20. La relación entre la actividad medida con lactosa y la medida con ONPG (LAUest/ONPG) es  $2.6 \pm 0.1$ .

## **5.2.4. Cinética de hidrólisis de lactosa**

### **5.2.4.1. Ensayos de hidrólisis**

El curso global de la reacción de hidrólisis se estudió en soluciones de lactosa y en leche. La reacción se efectuó en frascos de centrífuga de 150 ml de capacidad conteniendo 19 ml de sustrato y 1 ml del PCE o de la ES. La mezcla se incubó a la temperatura seleccionada con agitación constante. A los intervalos de tiempo seleccionados se tomaron muestras y la reacción se detuvo por los procedimientos antes descritos.

### **5.2.4.2. Determinación de los productos de hidrólisis**

La distribución de productos de hidrólisis se determinó por HPLC usando un equipo Beckman con detector de índice de refracción (156 Beckman). Se usó una columna para separación de carbohidratos (Aminex HPX-87C, BioRad), que fue operada a 80 °C, usando agua como fase móvil a un caudal de 0.5 ml por minuto. Para la cromatografía, las muestras de leche desproteinizadas se llevaron a pH 7.5 con NaOH y luego de incubarlas 30 min a temperatura ambiente se centrifugaron en microcentrífuga (14 000g, 2 min). El sobrenadante se diluyó con agua destilada y se filtró a través de una membrana de 0.2 µm. Las muestras provenientes de hidrólisis de soluciones de lactosa se desproteinizaron y clarificaron con el mismo procedimiento. Los trisacáridos se evaluaron usando rafinosa como patrón. En las condiciones de ensayo no es posible separar lactosa de otros disacáridos que pueden producirse como consecuencia de reacciones de transglucosidación tales como alolactosa o galactobiosa (Sección 1.3.) Por lo tanto los disacáridos se evalúan como lactosa. El reactivo desproteinizante no interfiere en la determinación de trisacáridos pero sí en la detección de oligosacáridos de orden superior.

### **5.2.4.3. Determinación de la conversión**

El grado de hidrólisis expresado como conversión (X) se calcula a partir de la glucosa formada, ya que se asume que este producto no interviene en las



reacciones secundarias de transglicosidación. El valor de X corresponde al cociente entre la concentración de glucosa para cada tiempo de reacción y la concentración máxima teórica. Esta última se estima a partir de la concentración inicial de lactosa. En leche la concentración inicial de lactosa se determinó por HPLC usando glucosa como patrón interno de referencia. Esto es posible pues la relación área/concentración es similar para ambos carbohidratos.

#### **5.2.5. Estudios de estabilidad**

El efecto de la temperatura, pH o entorno iónico en la estabilidad de la enzima se determinó midiendo la actividad residual luego de un tiempo de incubación prefijado. La concentración de enzima en la mezcla de incubación fue alrededor de 6 ONPG/ml. A intervalos de tiempo definidos se tomó una muestra y se la diluyó (generalmente 1:3) con PPB-Mn 50 frío. La actividad residual se evaluó por el método del ONPG.

## **5.3. RESULTADOS**

### **5.3.1. Estudios de estabilidad**

#### **5.3.1.1. Efecto de la temperatura**

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del PCE y ES, ambos preparados se incubaron 30 minutos a diferentes temperaturas, y se determinó la actividad residual. Los resultados obtenidos muestran una mayor estabilidad térmica del preparado celular (Figura 5.1).

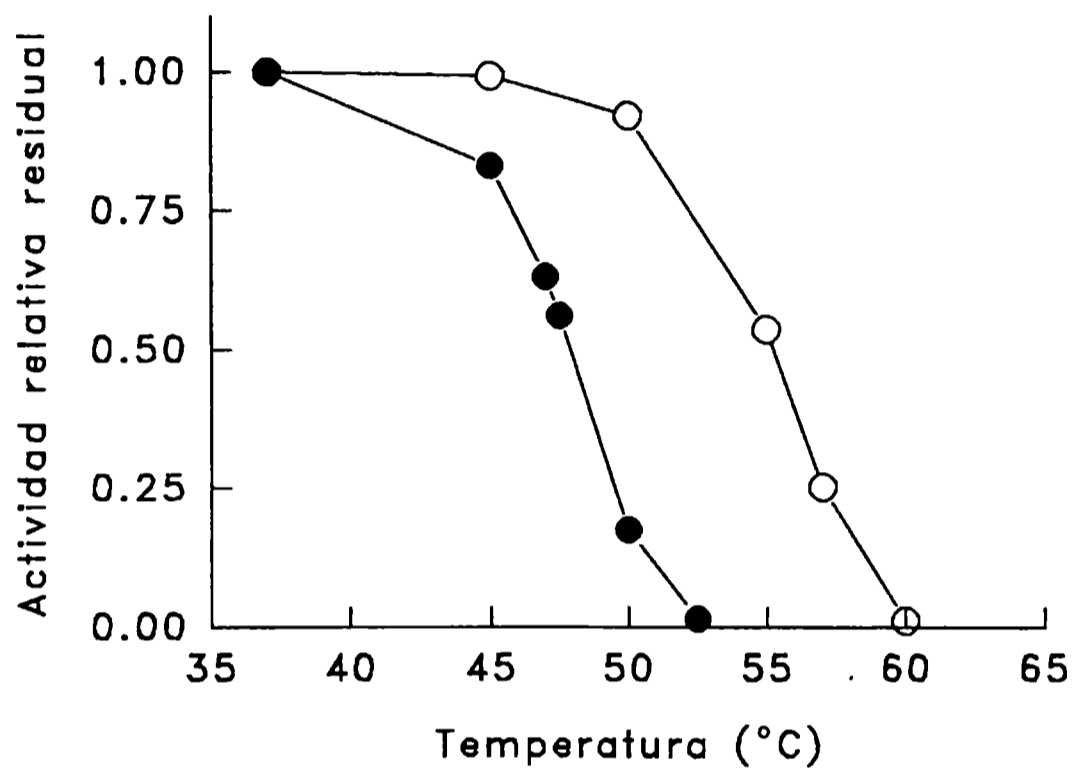
La cinética de desactivación térmica para el PCE, se realizó en el intervalo de temperaturas entre 52.5 y 60 °C. Para las temperaturas estudiadas la disminución de la actividad en el tiempo presenta una relación exponencial (Figura 5.2). Esto indica que la desactivación sigue una cinética de primer orden respecto de la concentración de enzima. Este comportamiento es similar al observado con la enzima libre. El mismo comportamiento fue observado también para las enzimas de origen fúngico y bacteriano (Peterson y col., 1989; Bakken y col., 1992).

Los parámetros cinéticos de la desactivación térmica se estimaron mediante linealización de la ecuación de Arrhenius. El valor de la energía de activación obtenido fue de  $85.81 \pm 2.14$  kcal/mol y el del  $\ln A$  (factor preexponencial):  $126.93 \pm 0.06$ .

---

**Figura 5.1.** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad  $\beta$ -galactosidasa.

---

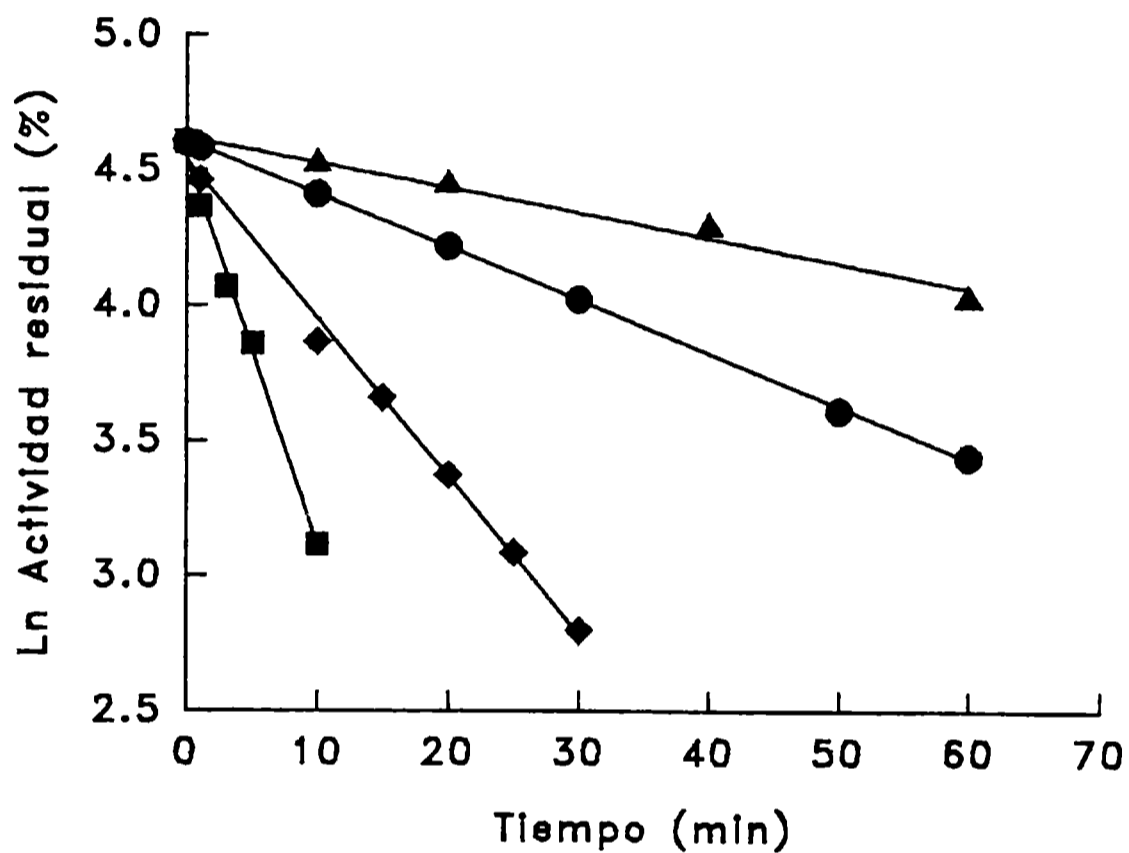


---

Condiciones de ensayo: incubación 30 minutos en PPB-Mn 20, (0.2 mM de  $Mn^{+2}$ ), pH 6.6. ○: PCE ( $2.2 \times 10^8$  células/ml), ●: ES (0.22 mg proteína/ml).

---

**Figura 5.2.** Cinética de desactivación térmica de  $\beta$ -galactosidasa (PCE).



Condiciones de ensayo: PCE  $2.2 \times 10^8$  células/ml en PPB-Mn 20 (0.2 mM de  $Mn^{2+}$ ), pH 6.6. ▲: 52.5 °C, ●: 55 °C, ◆: 57.5 °C, ■: 60 °C.

Estos valores indican que la estabilidad térmica del PCE se incrementa rápidamente con la disminución de la temperatura. Así la vida media del PCE a temperaturas menores que 40 °C es mayor que un año.

La estabilidad del PCE es del orden de la hallada para las células permeabilizadas, lo cual indica que el tratamiento con GA tiene poco efecto en la estabilidad de la enzima. La mayor estabilidad del preparado celular frente a la enzima libre es atribuible a las altas concentraciones de proteína y de otros componentes presentes en la matriz celular que protegen a la enzima de la desactivación térmica (Voget y col., 1994).

Ensayos de estabilidad realizados con distintas concentraciones celulares en el rango de  $10^8$  -  $2 \times 10^9$  células/ml (0.5 a 10 g/l), indican que la estabilidad del PCE es independiente de la concentración celular usada.

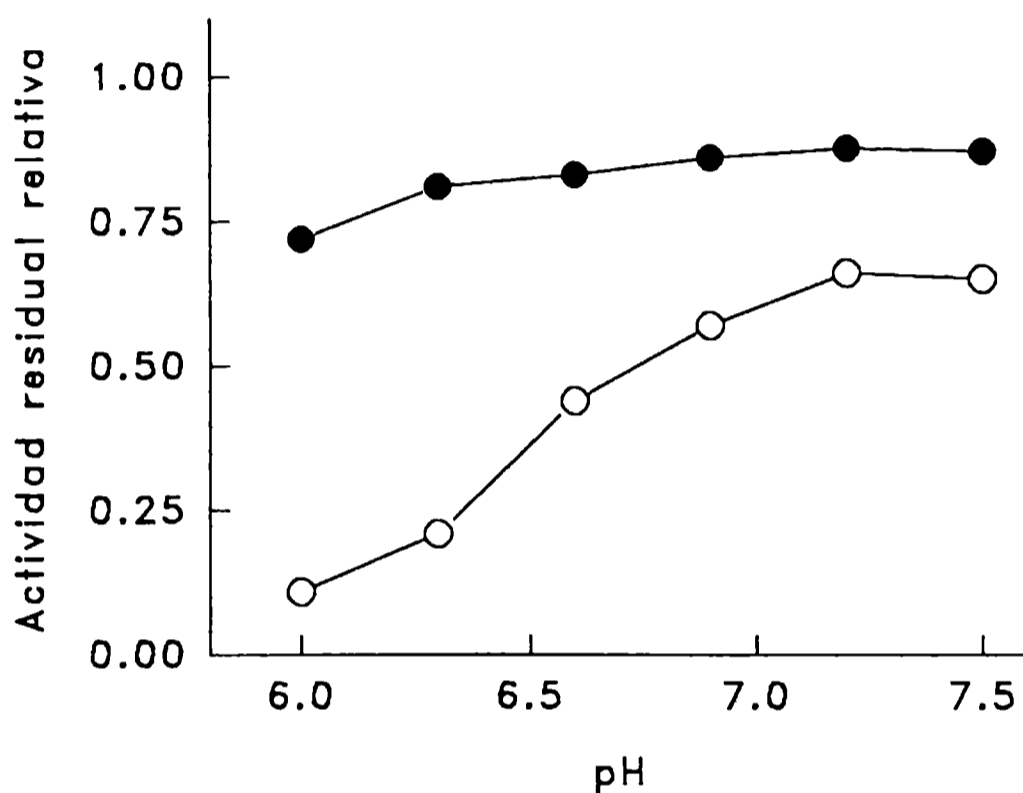
#### **5.3.1.2. Efecto del pH**

Para la determinación del efecto del pH sobre la estabilidad del biocatalizador, se midió la actividad residual luego de incubar el PCE a 55 °C, y a 45 °C, la ES. Estas temperaturas se seleccionaron debido a las diferencias de estabilidad esperables entre los dos sistemas. El tiempo de incubación se fijó, para los dos casos, en 30 minutos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.3. La máxima estabilidad del preparado celular se obtuvo a pH entre 6.9 y 7.5, asimismo puede verse que, a valores de pH menores que 6.5, el preparado celular presenta muy baja estabilidad. Por el contrario, la enzima libre es estable dentro del intervalo de pH estudiado. Las causas de estas diferencias no son claras.

---

**Figura 5.3.** Efecto del pH sobre la estabilidad  $\beta$ -galactosidasa.

---



---

Condiciones de ensayo: 30 minutos de incubación en PPB-Mn 20 (0.2 mM  $Mn^{2+}$ ), el pH se ajustó al valor deseado con HCl. La temperatura de ensayo fue: PCE 55 °C, ES 45 °C. ○: PCE ( $2.0 \times 10^8$  células/ml). ●: ES 0.36 mg de proteína/ml.

---

### 5.3.1.3. Efecto del entorno iónico

En la Tabla 5.1 se presentan resultados obtenidos sobre el efecto de diferentes cationes en la estabilidad del PCE. Los cationes  $Mn^{+2}$  y  $K^{+}$  confieren máxima estabilidad, siendo la concentración óptima en buffer de 0.2 mM y 100 mM respectivamente. Con sodio como único catión monovalente, la estabilidad de la enzima es muy reducida y en este caso, no depende de la concentración del catión. Los ensayos realizados con combinaciones sodio - potasio muestran que el sodio no interfiere sobre el mecanismo de estabilización de la enzima que es dependiente de potasio.

**Tabla 5.1.** Efecto del entorno iónico sobre la estabilidad  $\beta$ -galactosidasa del PCE.

Medio base de incubación	Cationes presentes	Concentración (mM)	Actividad residual <sup>a</sup> (%)
PPB-Mn	K/Mn	40/0.1	48.6
		40/0.2	55.8
		100/0.2	72.9
	K/Na/Mn	40/20/0.2	60.0
		40/40/0.2	52.0
NaPB-Mn	Na/Mn	40/0.2	1.3
		100/0.2	1.6

La concentración adicional de los cationes  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  o  $Mn^{+2}$  respecto al buffer (PPB-Mn 20, NaPB-Mn 20), se obtuvo adicionando KCl, NaCl y  $MnCl_2$ . <sup>a</sup>: Actividad residual relativa, luego de incubar 30 minutos a 55 °C. PCE:  $2 \times 10^8$  células/ml.

## 5.3.2. Estudios de actividad

### 5.3.2.1. Parámetros cinéticos para la hidrólisis de lactosa ( $V_{max}$ , $K_m$ ).

#### Efecto de la temperatura

La determinación de los parámetros cinéticos,  $V_{max}$  y  $K_m$ , a diferentes temperaturas, se realizó determinando el efecto de la concentración de sustrato en la velocidad inicial de hidrólisis. Los parámetros cinéticos se calcularon mediante un método de regresión de ajuste no lineal (Enzfitter, Elsevier-Biosoft, Inglaterra). Considerando la estabilidad térmica de la enzima, la temperatura máxima estudiada fue 45 °C. La energía de activación para  $V_{max}$  se determinó a partir de la ecuación de Arrhenius. Los valores obtenidos a 5, 37 y 45 °C, para el PCE y la ES se presentan en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Parámetros cinéticos para la hidrólisis de lactosa.

Preparación	$K_m$ (mM)			$V_{max}^a$	$E_a^b$
	5 °C	37 °C	45 °C	37 °C	(kcal/mol)
Preparado celular	35.5	33.1	32.4	86.74	9.56
Enzima libre	29.65	28.2	27.9	84.5	10.3

Las medidas de velocidad inicial se efectuaron en PPB-Mn 20, pH 6.6 con concentraciones de lactosa entre 7 y 139 mM. La concentración del PCE y ES así como el tiempo de reacción se variaron de acuerdo a la temperatura de incubación. En todos los casos la hidrólisis no superó el 5%.

<sup>a</sup>: PCE:  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 10^9$  células, ES:  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  de proteína. <sup>b</sup>:  $E_a$ : energía de activación (kcal/mol) para  $V_{max}$  determinada en el rango de 5 a 45 °C.

La desviación estándar para los parámetros fueron:  $K_m$ : 2.5,  $V_{max}$ : 1.16;  $E_a$ : 0.35.



Los gráficos de Eadie-Hoftee, para el PCE, mostraron linealidad en todo el rango de concentraciones de sustrato, lo cual indica la ausencia de limitaciones difusionales en las medidas de actividad con lactosa. Este comportamiento es similar a lo observado con ONPG (Sección 3.3.2.1.)

La constante de afinidad ( $K_m$ ) disminuye ligeramente con la temperatura y es algo superior para el PCE. Los valores de energías de activación son comparables a los encontrados por Declaire y col. (1985a) para un preparado celular de *K. bulgaricus*; y por Mahoney y Whitaker (1978) para la enzima purificada de *K. fragilis*. De los valores de la energía de activación para la velocidad máxima de hidrólisis ( $V_{max}$ ) se puede calcular que la relación entre la actividad a 5 y 45 °C es 0.097 y 0.115 para ES y PCE respectivamente, por lo tanto la capacidad hidrolítica del PCE a bajas temperaturas es similar al de la ES. La  $\beta$ -galactosidasa tiene una mayor afinidad por el sustrato ONPG ( $K_m \approx 3$  mM), pero la velocidad máxima para ambos sustratos es del mismo orden ( $V_{max}$  (ONPG):  $74.7 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot 10^9$  células (Sección 3.3.2.1.).

#### **5.3.2.2. Efecto del entorno iónico**

La influencia de diferentes cationes sobre la velocidad inicial de hidrólisis de lactosa se presentan en la Tabla 5.3.

La velocidad inicial de hidrólisis no dependió de la concentración de los cationes  $K^+$  y  $Mn^{+2}$  en el rango de concentraciones estudiadas. La actividad en sodio es menor que en potasio, y en presencia de potasio el sodio ejerce una acción inhibitoria de la actividad en lactosa.

En leche la actividad inicial es inferior (70%) que en buffer y el efecto puede ser parcialmente revertido por la adición de potasio.

El efecto provocado por estos cationes sobre el PCE es similar a los obtenidos con células permeabilizadas y con la enzima libre (Voget y col., 1994).

**Tabla 5.3.** Efecto del entorno iónico sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa del PCE.

Medio base de incubación	Cationes presentes	Concentración (mM)	Actividad inicial <sup>a</sup> (%)
PPB-Mn	K/Mn <sup>T</sup>	40/0.1	100
		40/0.2	100
		100/0.1	100
	K/Na/Mn	40/20/0.1	43.9
		40/40/0.1	33.4
NaPB-Mn	Na/Mn	40/0.1	9.1
		100/0.1	9.3
Leche	--	--	31
	K	40	41.7

Condiciones de ensayo: lactosa 139 mM, pH 6.6, temperatura de incubación: 37 °C. La concentración adicional de los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> o Mn<sup>+2</sup> respecto al buffer (PPB-Mn 20, NaPB-Mn 20), se obtuvo adicionando KCl, NaCl y MnCl<sub>2</sub>. <sup>a</sup>: Actividad relativa a la muestra T: Actividad en mezcla de reacción 0.37 LAUest/ml. --: Sin adición

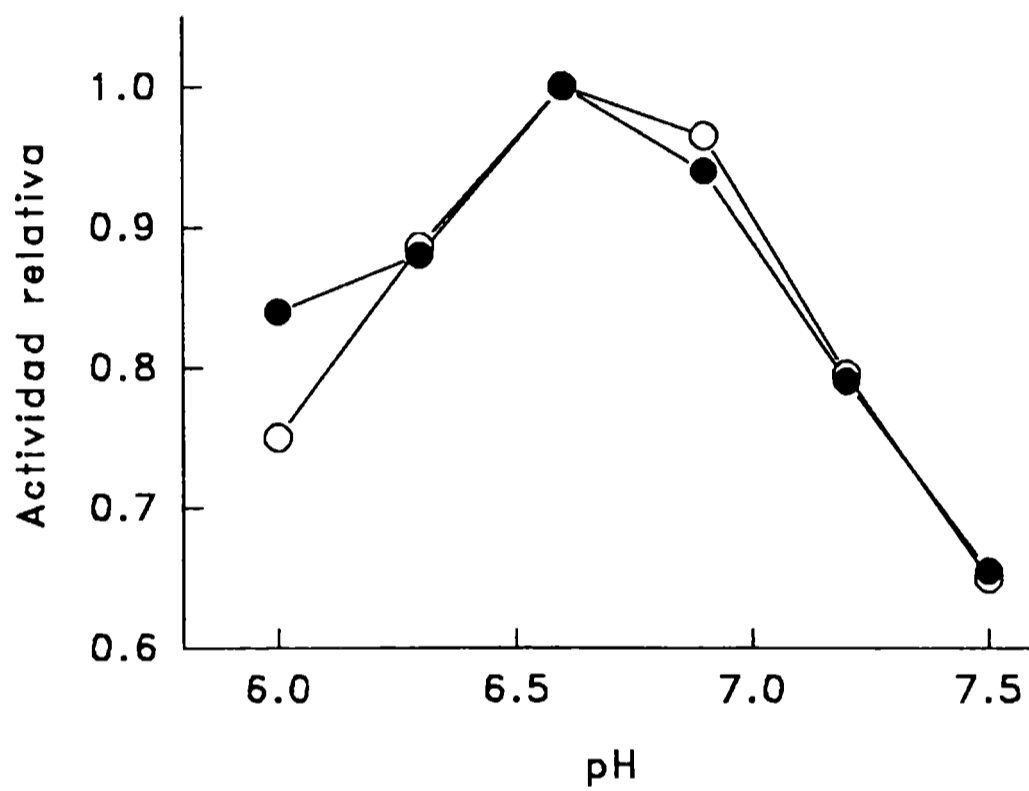
### 5.3.2.3. Efecto del pH sobre la actividad

El efecto del pH sobre la velocidad inicial de hidrólisis de lactosa para el PCE y la ES se llevó a cabo a 37 °C. Los resultados se presentan en la Figura 5.4. El efecto del pH sobre la actividad es similar siendo el valor óptimo de alrededor de 6.6.

---

**Figura 5.4. Efecto del pH sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa.**

---



---

El pH se ajustó al valor deseado con HCl. Incubación 15 minutos a 37 °C. Condiciones de ensayo: Sustrato lactosa 139 mM en PPB-Mn 20. ○: PCE ( $10^7$  células/ml). ●: ES 0.01 mg proteína/ml.

---

### 5.3.3. Cinéticas de hidrólisis en lactosa

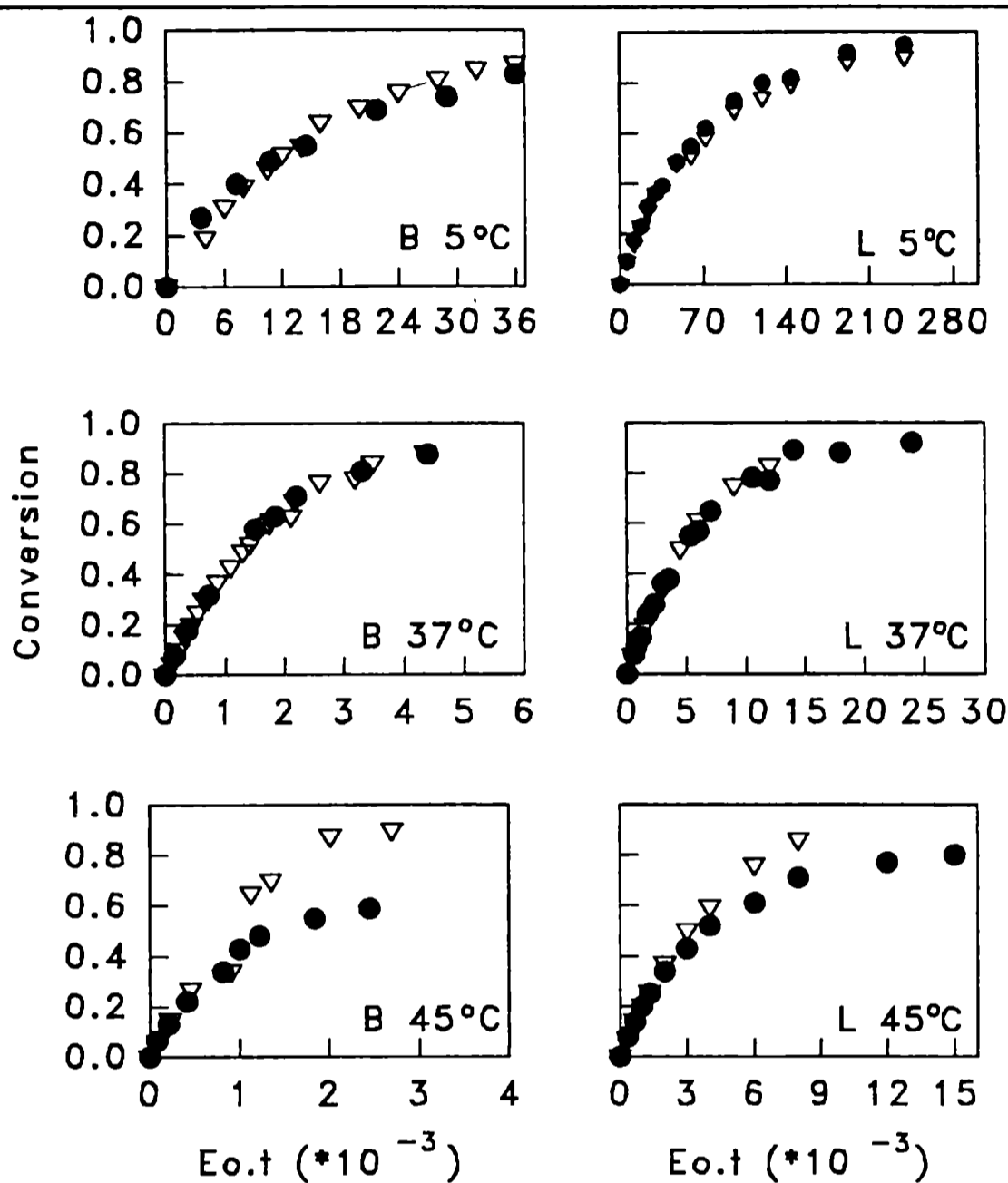
En una serie de experiencias se analizó el curso global de la reacción de hidrólisis en soluciones de lactosa y en leche a diferentes temperaturas. En todos los casos la concentración de lactosa usada fue 139 mM (5.2%), que es la comunmente encontrada en leche. El pH de los sustratos fue siempre  $6.6 \pm 0.1$ . Las hidrólisis se realizaron a 5, 37 y 45 °C, con diferentes concentraciones iniciales de enzima. La actividad adicionada se expresa como unidades medidas en la condición estándar (LAUest). La cantidad máxima de enzima adicionada permitió obtener una conversión de 80 - 90% en 1 a 2 h de reacción. Esto se ajustó realizando hidrólisis de lactosa en buffer a 37 °C. La actividad a 5 y 45 °C se estimó con los valores de la energía de activación de la reacción de hidrólisis. La conversión se analizó en función del producto  $E_0.t$ , donde  $E_0$  corresponde a la actividad de enzima adicionada (LAUest/L) y  $t$  es el tiempo de reacción en horas. Las curvas de hidrólisis se presentan en la Figura 5.5.

A 5 y 37 °C no se observaron diferencias en el curso global de la hidrólisis entre el PCE y la ES, tanto en solución de lactosa como en leche. La conversión ( $X$ ) depende del producto  $E_0.t$  pero es independiente de la concentración inicial de enzima ( $E_0$ ). Este comportamiento es importante cuando se considera un posible mecanismo de hidrólisis, y desde el punto de vista práctico esto simplifica el manejo de las variables para predecir el curso de la conversión.

La conversión se incrementa en forma lineal con  $E_0.t$  hasta un 35% de hidrólisis, luego la velocidad de la reacción disminuye paulativamente y tiende lentamente a la conversión total (esto fue confirmado mediante caracterización por HPLC de muestras incubadas durante tiempos prolongados de reacción).

A 45 °C la menor conversión obtenida con la ES, sobre todo en la hidrólisis de lactosa, es atribuible a la menor estabilidad térmica de la enzima soluble. Por otra parte es evidente el efecto protector de la leche, debido a la presencia de proteínas y otros componentes que aumentan la estabilidad térmica de la enzima. En condiciones industriales la conversión óptima de lactosa es 75 - 85% (Gekas y Lopez-Leiva, 1985). Así para la hidrólisis en leche a 5 °C, se necesita una  $E_0.t$  equivalente a 140 000 LAUest.h. A 37 y 45 °C los valores requeridos son aproximadamente 10 000 y 6 000 LAUest.h respectivamente.

**Figura 5.5.** Cinética de hidrólisis de lactosa en buffer y leche a diferentes temperaturas.



En ambos sustratos la concentración inicial de lactosa fue aproximadamente 139 mM. Eo: actividad (LAUest/L), t: tiempo de hidrólisis (h). Hidrólisis 5 °C: en leche ES y PCE: 1 500 - 12 000 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 4 - 20 h. En buffer:ES: 5 000 - 15 000 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.25 - 2.5 h. PCE: 7 000 - 14 000 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.25 - 2.5 h.

Hidrólisis 37 °C: en leche ES y PCE: 1 500 - 12 000 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.083 - 2.0 h. En buffer:ES y PCE: 4 00 - 4 500 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.033 - 2.0 h. Hidrólisis 45 °C: en leche ES: 4 000 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.083 - 2 h. PCE: 3 000 - 6 000 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.083 - 2 h. En buffer: ES y PCE: 2 500 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.033 - 1 h.

**B:** Buffer PPB-Mn 20, pH 6.6, **L:** Leche descremada. ●: ES, ▽: PCE.

Estas curvas características pueden modificarse para otros sustratos como sueros o permeados, dependiendo fundamentalmente de la composición iónica del medio.

#### **5.3.4. Distribución de productos de hidrólisis**

Para determinar la distribución de los productos de reacción, se evaluó la producción de monosacáridos (glucosa y galactosa) y de trisacáridos durante la hidrólisis de soluciones de lactosa y leche.

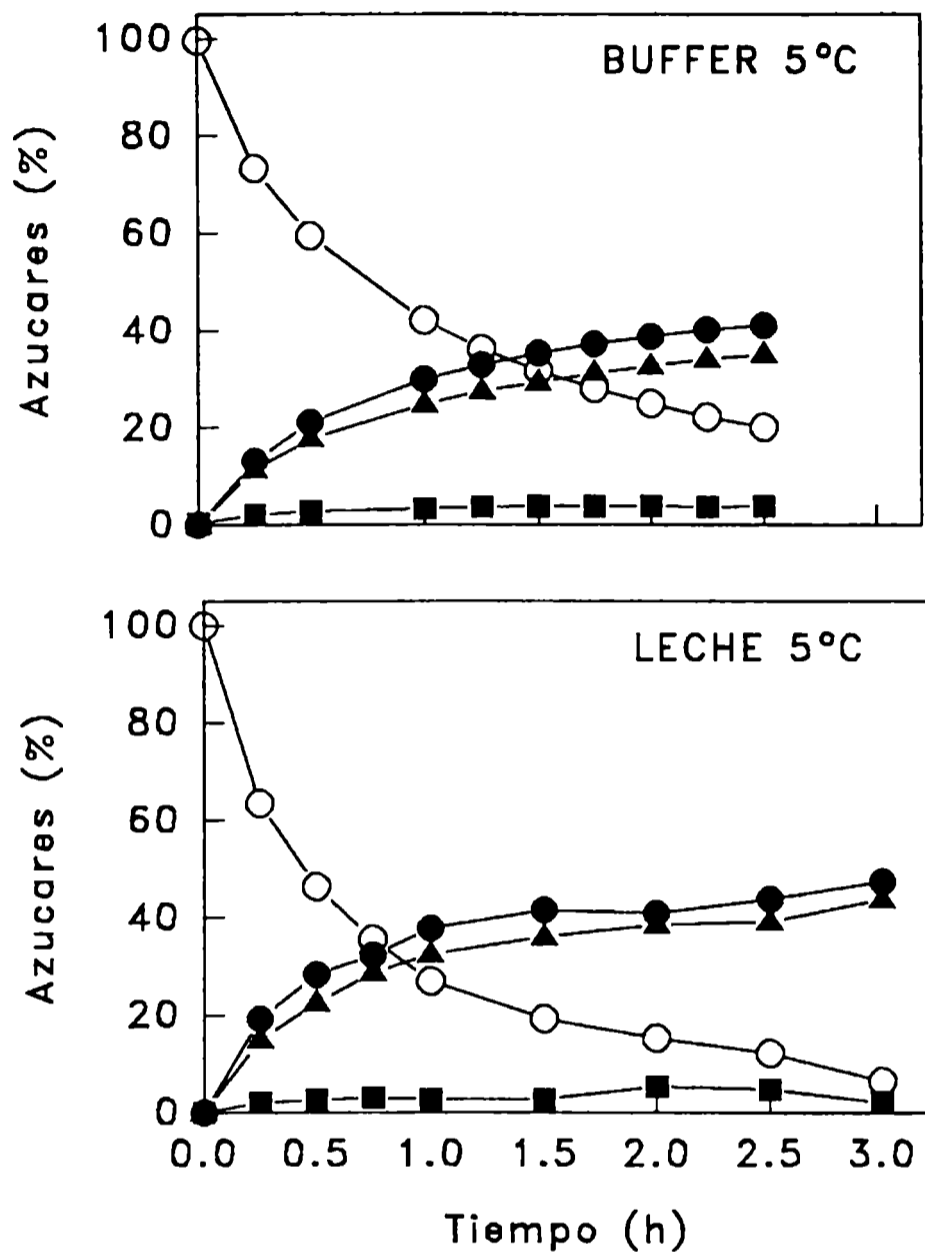
En la Figura 5.6 se muestra la evolución de los productos de reacción para un proceso típico de hidrólisis de lactosa a 5 °C realizado con el PCE.

La concentración de galactosa libre siempre es menor que la concentración de glucosa, lo que evidencia la participación de la galactosa en las reacciones de transglicosidación. Los trisacáridos comienzan a formarse desde el inicio de la hidrólisis alcanzándose una concentración máxima en la solución de lactosa es de 4.8%, para una conversión de 80%, y en leche de 5.3% para una conversión de 89%. En la Figura 5.7 se detallan los trisacáridos formados en función de la conversión a diferentes temperaturas. En este caso los valores se refieren a hidrólisis efectuadas en soluciones de lactosa. En todos los casos los trisacáridos se acumulan, y llegan a representar el 6% de los azúcares totales. Se puede observar además que no existen diferencias en la cinética de formación de trisacáridos entre el PCE y la ES.

#### **5.3.5. Reutilización del preparado celular**

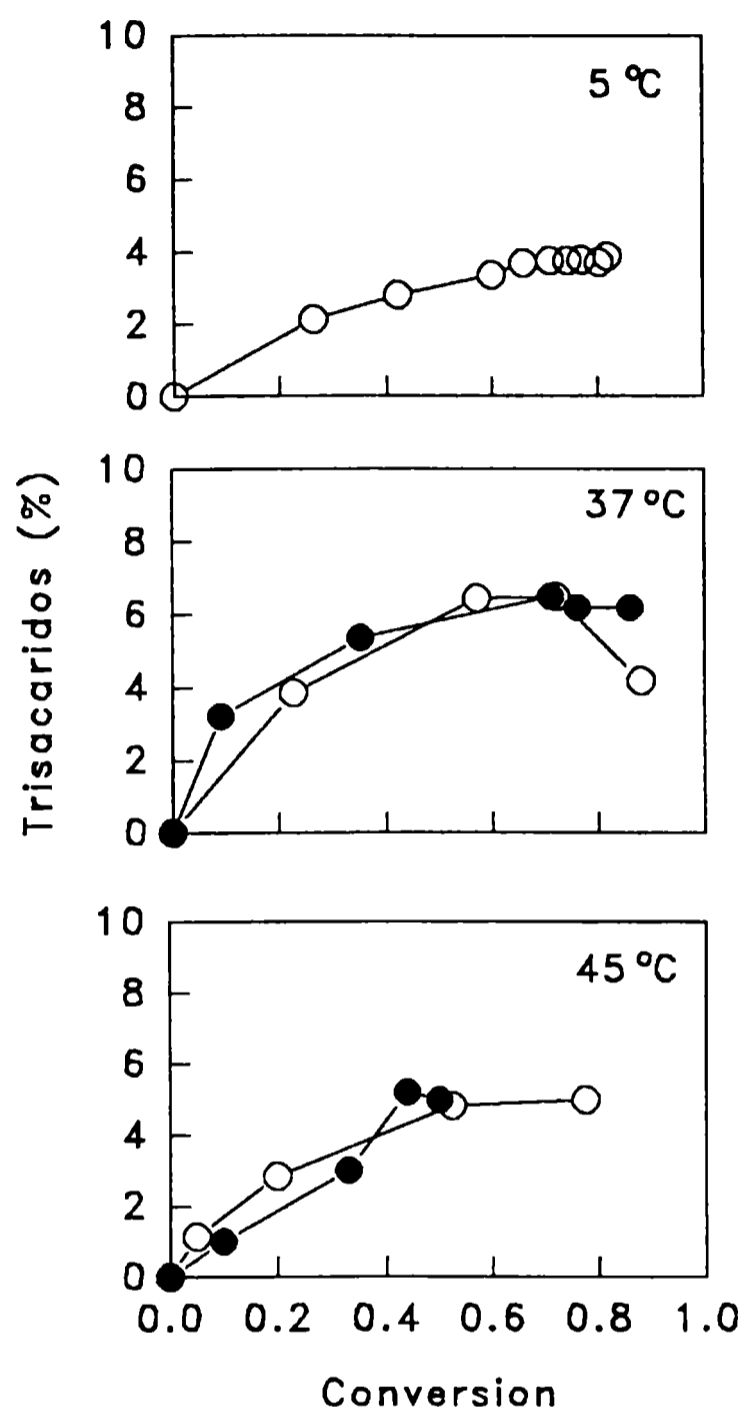
El objetivo más importante de la inmovilización de enzimas es el reuso del catalizador. La factibilidad de la reutilización del PCE se estudió a 5 °C usando solución de lactosa y leche y a 45 °C empleando únicamente leche como sustrato. Los tiempos de incubación se fijaron en 2 horas, para las hidrólisis a 5 °C, y una hora para el proceso a 45 °C. En todos los casos se adicionó una concentración de enzima que permitiera obtener una conversión de 75 y 80%.

**Figura 5.6.** Evolución de los productos de reacción durante la hidrólisis de lactosa.



Fuente de enzima PCE. Actividad adicionada: en buffer 17 000 LAUest/L, en leche: 75 000 LAUest/L. ○: Lactosa, ●: Glucosa, ▲: Galactosa, ■: Trisacáridos.

**Figura 5.7.** Formación de trisacáridos durante la hidrólisis de lactosa.

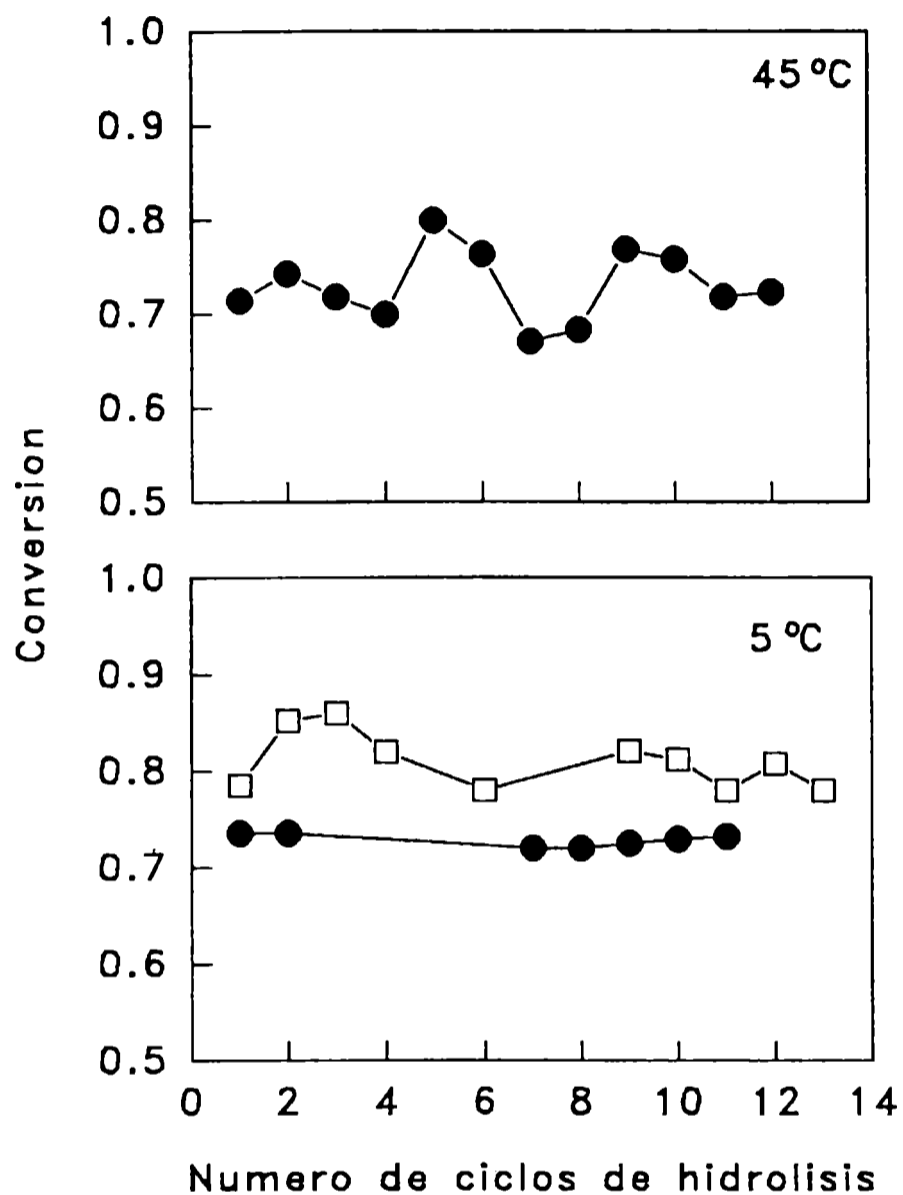


Las hidrólisis se efectuaron en PPB-Mn 20, pH 6.6. Concentración inicial de lactosa: 139 mM.

○: PCE, ●: ES.



**Figura 5.8.** Reutilización del preparado celular estabilizado en leche y buffer.



Los ciclos de hidrólisis fueron 2 h a 5 °C y 1 h a 45 °C. ●: Conversión en leche.  
□: Conversión en buffer.

La conversión alcanzada se determinó midiendo la glucosa formada después de cada ciclo de hidrólisis, como se indica en la Sección 5.2.4.3. Después de cada ciclo las células fueron centrifugadas (3 000g, 10 minutos) y reutilizadas. Para la conservación durante los períodos en que no fueron utilizadas, las células luego de la hidrólisis se lavaron dos veces con PPB-Mn 50 y se resuspendieron en el mismo buffer conteniendo 0.2% de metilparabeno, manteniéndose a 5 °C. Para mantener la concentración celular constante en la mezcla de hidrólisis, la pérdida de células originada por los lavados fue compensada modificando el volumen de sustrato agregado. La pérdida se estimó mediante recuento en cámara, luego de resuspender el paquete celular en el buffer de conservación. En la Figura 5.8 se muestra la conversión obtenida en función de los ciclos de reutilización. Los resultados indican que el sistema es estable tanto a 5 como a 45 °C aún cuando las células son usadas para la hidrólisis de lactosa en un medio complejo como leche.

## 5.4. DISCUSION

La  $\beta$ -galactosidasa de levadura es poco estable térmicamente. En condiciones óptimas de pH y medio iónico la enzima se inactiva rápidamente a temperaturas mayores que 40 °C. La estabilidad puede mejorarse si en el medio estan presentes sustancias protectoras, por ejemplo proteínas como ocurre en las células permeabilizadas donde la  $\beta$ -gal exhibe una mayor resistencia a la inactivación.

La estabilidad del PCE es mayor que la de la enzima libre, pero es del mismo orden que la hallada en las células permeabilizadas (Voget y col. 1994). Por lo tanto el tratamiento con GA no modifica sustancialmente esta propiedad. El proceso de desactivación térmica de la enzima (al igual que la  $\beta$ -gal de origen fúngico o bacteriano) presenta una cinética de primer orden, y una sola fase de desactivación. Esto sugiere un mecanismo simple de inactivación (Lencki y col., 1992). La microheterogeneidad que suelen presentar los sistemas de enzimas inmovilizadas puede dar lugar a una distribución de energías de activación que conduce a desviaciones de la cinética de primer orden (Agarwal, 1985; Henley y Sadana, 1989). Esto no se observa con el PCE, lo que indica una alta homogeneidad enzimática en las células estabilizadas.

Cuando se considera el uso continuo de enzimas en la industria de alimentos, uno de los factores críticos a considerar es la temperatura del proceso. La eliminación y la prevención de la contaminación de sustratos y productos por microorganismos toxigénicos puede ser efectiva a temperaturas del orden de 60 °C. A temperaturas menores inclusive 50 °C es casi imposible controlar la contaminación por microorganismos mesófilos o termodúricos (Kilara y Shahami, 1985). ES evidente que el PCE no reúne las características de estabilidad para operar a altas temperaturas. Sin embargo el valor de la energía de activación predice un incremento rápido de la estabilidad con la disminución de la temperatura. A su vez el PCE mantiene la capacidad que presenta la enzima libre de hidrolizar lactosa a bajas temperaturas, por lo cual el uso prolongado de la enzima es factible, en sustratos naturales susceptibles de contaminación operando el proceso de hidrólisis en frío (5 - 10 °C).

En este sentido la reutilización del PCE realizada a 5 °C, mediante sucesivos ciclos de hidrólisis, demostró que el preparado celular posee una buena

estabilidad operacional aún en sustratos complejos como leche. La actividad del PCE se mantuvo luego de 12 horas de hidrólisis en leche a 45 °C, lo que puede atribuirse al efecto de protección que ejerce el medio natural sobre la enzima. De acuerdo a los datos cinéticos obtenidos en buffer era esperable una pérdida de actividad del 20%. Es evidente que la célula estabilizada no ofrecería inconveniente alguno para su empleo prolongado en la hidrólisis de sustratos naturales. En procesos con enzimas inmovilizadas, un parámetro importante es la vida media del catalizador. En algunos procesos típicos por ejemplo el uso de glucosa isomerasa para obtener jarabes de glucosa, los tiempos de vida media del biocatalizador en condiciones de proceso son de alrededor de seis meses. Este comportamiento parece factible con el PCE para hidrólisis a bajas temperaturas (5 °C), en las cuales se minimiza también la desactivación química debida a cationes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ , lo que contribuye a la mayor estabilidad del sistema.

En relación al efecto del pH con el PCE es interesante mencionar que la enzima presenta máxima estabilidad en el intervalo de pH 7 a 7.5; pero su máxima actividad se encuentra en el intervalo 6.2 a 6.7, que es el rango de pH encontrado en los sustratos naturales. A diferencia de la enzima libre, la estabilidad del PCE disminuye rápidamente a pH inferiores a 6.5. Las causas de esta situación no son claras, pero el fenómeno ha sido observado con otras enzimas estabilizadas con GA (Workman y Day, 1984)

Es interesante de destacar la acción de cationes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . En presencia de  $\text{Na}^+$  como único catión monovalente, la  $\beta$ -gal exhibe baja estabilidad térmica (la velocidad de inactivación es 16 veces mayor que en presencia de  $\text{K}^+$ , 40 mM). La estabilidad no depende de la concentración de  $\text{Na}^+$  (40 - 100 mM), pero la estabilidad de la enzima es una función de la concentración de potasio, siendo máxima con 100 mM de  $\text{K}^+$ . Lo más relevante es el hecho de que la presencia de  $\text{Na}^+$  no interfiere en el mecanismo de estabilización, el que parece depender de la concentración absoluta de  $\text{K}^+$ . Esto es completamente diferente a lo observado para la actividad en lactosa. La velocidad de hidrólisis no depende de la concentración de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  (en el rango 20 - 100 mM) pero, es máxima en presencia de  $\text{K}^+$  y el  $\text{Na}^+$  inhibe la actividad  $\beta$ -gal cuando ambos cationes están presentes en la mezcla de reacción. Para explicar este comportamiento sería necesario disponer de algún modelo de estructura de la enzima. Sin embargo, el efecto de los cationes sobre la

estabilidad parece ser independiente de lo que ocurre con la actividad. Esto surge de que la acción diferencial del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sobre la actividad, no se observa cuando se usa ONPG como sustrato. En este caso la velocidad de hidrólisis es la misma en presencia de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ . En este sentido el efecto sobre la actividad parece ser específico de la lactosa y no es extrapolable a otros sustratos como el ONPG.

Como se discutirá en el Capítulo 6, los parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa dependen del catión presente. La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) determinada en PPB-Mn es ligeramente superior para el PCE, y disminuye, en forma poco pronunciada con el aumento de la temperatura. Esta dependencia de  $K_m$  con la temperatura es similar a la observada para la  $\beta$ -gal de *A. niger* (Yang y Okos, 1989).

La conversión obtenida en soluciones de lactosa y leche en función del producto  $E_0 \cdot t$  es independiente de la concentración inicial de enzima ( $E_0$ ). Por lo tanto el curso de la reacción de hidrólisis es fácilmente predecible, lo que es de gran utilidad en aplicaciones prácticas.

En condiciones industriales la conversión óptima de lactosa es 75 - 85% (Gekas y Lopez-Leiva, 1985). Esto es debido en parte a razones económicas pues la velocidad de conversión en esta zona es muy baja.

Como se ha mencionado la reacción catalizada por la enzima no es una simple hidrólisis, sino que el propio sustrato (lactosa) y los azúcares producidos en la reacción pueden ser utilizados en reacciones de transglicosidación, dando origen a diversos disacáridos y oligosacáridos. En general la cantidad de oligosacáridos formados aumenta con la concentración inicial de lactosa y disminuye a medida que avanza la hidrólisis. La presencia de oligosacáridos en las mezclas de reacción es indeseable porque pueden originar trastornos digestivos (Richmond y col., 1981). Teóricamente es posible eliminarlos, dejando que la reacción alcance el equilibrio; sin embargo, ésta es una solución que no puede ser llevada a cabo en la práctica debido a los altos tiempos requeridos para obtener conversión completa.

El análisis de los productos de hidrólisis en soluciones de lactosa y leche, indica que la distribución es similar para el preparado celular y la enzima libre y

la máxima concentración de trisacáridos se encuentra para conversiones del orden de 75 - 90%. Este comportamiento es diferente al encontrado por Prenosil y col., (1987b) con las lactasas de *A. niger* y *A. oryzae*, donde la concentración máxima de oligosacáridos obtenida durante la hidrólisis se encuentra a conversiones menores (40 - 50%). Sin embargo, para las concentraciones de lactosa encontradas en sustratos naturales, la concentración de oligosacáridos es inferior al 6% de los azúcares totales. Por otro lado la estabilización de la enzima mediante glutaraldehído no provoca cambios en la cinética de formación de los mismos. Resultados similares son presentados por Prenosil y col. (1987a), quienes encuentran que, para bajas concentraciones de lactosa (5%), no existen diferencias en la concentración de oligosacáridos producidos por la  $\beta$ -gal de *A. niger* libre e inmovilizada. Sin embargo, Mozzafar y col. (1988) encuentran un incremento en la producción de oligosacáridos, de 6 a 40 %, cuando tratan con glutaraldehído una preparación cruda de  $\beta$ -gal de *B. circulans*. Es evidente que las reacciones secundarias de transglicosidación dependen fuertemente de la fuente de enzima utilizada.

---

**CAPITULO 6**

**MODELO PARA LA HIDROLISIS DE LACTOSA:  
Influencia del entorno iónico**

---

## 6.1. INTRODUCCION

La composición iónica del medio tiene gran influencia en el potencial hidrolítico de la  $\beta$ -gal. Esto es debido a que la mayoría de los cationes presentes en sustratos naturales como leche, sueros, etc. tienen algún efecto sobre la actividad y estabilidad de la enzima. El efecto global es difícil de analizar. Considerando la acción específica de los diferentes cationes, el efecto más importante de analizar es probablemente el provocado por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , tal como se indica en el Capítulo 5.

Si bien no es el objetivo de este trabajo determinar el mecanismo de la reacción de hidrólisis, como una contribución al conocimiento del sistema, se desarrolló un modelo simple para explicar el efecto de los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en la reacción de hidrólisis de lactosa. Este estudio se ve facilitado por el hecho de que la composición iónica del medio puede ser fácilmente establecida lavando el producto celular estabilizado.

### 6.1.1. Modelos de hidrólisis de lactosa

Para el desarrollo del modelo de acción de estos cationes, fue necesario establecer un modelo cinético de la reacción de hidrólisis de lactosa. Para ello se realizó un estudio preliminar de los distintos modelos propuestos en la bibliografía.

La mayoría de los modelos cinéticos para la hidrólisis enzimática de lactosa, han considerado enzimas con potencial aplicación industrial. Esto es debido a la necesidad de optimizar el proceso de hidrólisis, siendo un aspecto fundamental para ello el disponer de un modelo cinético de la reacción. Los diferentes modelos encontrados en bibliografía para la hidrólisis enzimática de lactosa con enzimas de levadura, fúngica y bacteriana (*B. circulans*) se detallan en la Tabla 6.1.

En general estos modelos no consideran la formación de productos de transglucosidación, como trisacáridos o disacáridos diferentes de lactosa, debido en parte a la complejidad que presentaría el modelo. Además, en ciertas condiciones de reacción (bajas concentraciones de lactosa, del orden de 5%) la



formación de estos productos es muy baja comparada con los productos glucosa y galactosa. La galactosa es un inhibidor de la actividad  $\beta$ -gal, existiendo, según los modelos propuestos, diferentes modos de inhibición.

**Tabla 6.1.** Modelos para la hidrólisis enzimática de lactosa.

Fuente de enzima	Características del modelo	Referencia
<i>K. lactis</i>	Inhibición mixta por galactosa, no competitiva por glucosa	Ohmiya y col., 1977
<i>K. fragilis</i>	Inhibición competitiva por galactosa, no competitiva por glucosa	Chen y col., 1985
<i>A. niger</i>	Inhibición competitiva y anticompetitiva por $\alpha$ -galactosa y competitiva por $\beta$ -galactosa	Flaschel y col., 1982
<i>A. niger</i>	Inhibición competitiva por galactosa*	Yang y Okos, 1989
<i>A. niger</i>	Inhibición competitiva por $\alpha$ - y $\beta$ -galactosa	Peterson y col., 1989
<i>A. oryzae</i>	Inhibición no competitiva por galactosa	Shukla y Chaplin, 1993
<i>B. circulans</i>	Formación de trisacáridos, inhibición por $\alpha$ - y $\beta$ -galactosa	Bakken y col., 1992

\*: Considera la posible descomposición del complejo enzima-sustrato en glucosa y un intermediario enzima-galactosa.

Para la hidrólisis de lactosa mediante  $\beta$ -gal de *A. niger* y *B. circulans* se han propuesto modelos de inhibición que consideran la mutarrotación de la galactosa. La reacción hidrolítica genera solamente  $\beta$ -galactosa, que se convierte, debido a su mutarrotación, en el anómero  $\alpha$ -galactosa. En estos modelos de hidrólisis la enzima puede distinguir las formas anoméricas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos autores postulan que la forma  $\alpha$  del anómero es un inhibidor más fuerte que la forma  $\beta$  y, por lo tanto, la presencia de este anómero causa una disminución más notoria en la velocidad de reacción (Flaschel y col., 1982; Bakken y col., 1992).

Este efecto tendría importancia cuando la velocidad de mutarrotación es del mismo orden de magnitud que la velocidad de hidrólisis. Si la velocidad de la mutarrotación es más rápida que la velocidad de reacción de hidrólisis, la galactosa estará presente en la forma de la mezcla anomérica en equilibrio ( $\alpha/\beta$ : 1/2). Esto se observa por ejemplo a temperaturas mayores que 40 °C. Si la velocidad de mutarrotación es mas lenta, el equilibrio estará desplazado hacia la forma  $\beta$ -galactosa. Es evidente que la inhibición debida a la  $\alpha$ -galactosa es muy dependiente de la temperatura.

Una situación muy importante de este modelo es que a una temperatura fija, la conversión para un determinado valor del producto  $E_0 \cdot t$  es dependiente de  $E_0$ , ya que la concentración inicial de enzima controla la velocidad de reacción sin afectar la velocidad de mutarrotación. A mayor  $E_0$  se deberá observar menor influencia de la inhibición causada por  $\alpha$ -galactosa.

Existen algunas controversias sobre el tipo de inhibición que ocurre con la lactasa fúngica, y se ha propuesto incluso que la  $\alpha$ -galactosa ejerce además una inhibición anticompetitiva (Flaschel y col., 1982).

El modelo convencional de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa considera que, la galactosa y la glucosa se liberan simultáneamente del complejo enzima-sustrato. Sin embargo se ha propuesto otro mecanismo que implica la descomposición del complejo en glucosa y un intermediario enzima-galactosa, que se descompone en una etapa posterior (Sección 1.3.). Este último modelo ha sido propuesto como el mecanismo básico de la reacción (Richmond y col., 1981). Esta situación introduce un parámetro adicional en la ecuación cinética. Yang y Okos (1989), utilizaron este modelo para predecir la conversión a diferentes temperaturas. Sin embargo el valor del parámetro adicional es inferior a la unidad, y por simplicidad concluyen que el mecanismo convencional puede ser usado, sin mucho error para modelar la hidrólisis.

En los modelos de hidrólisis propuestos para la  $\beta$ -gal de levadura no se considera la inhibición diferencial de  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosa, y se propone que la glucosa es un inhibidor no competitivo de la reacción.

## **6.2. MATERIALES Y METODOS**

### **6.2.1. Reactivos y soluciones**

Los azúcares lactosa, glucosa, galactosa fueron Sigma. El resto de los reactivos usados fueron de grado analítico. Las soluciones buffer empleadas fueron los siguientes: PPB-Mn 20, (Sección 3.2.2.) y NaPB-Mn 20 (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-ClH, pH 6.6 conteniendo 0.1 mM de MnCl<sub>2</sub>). Los ensayos de hidrólisis y la determinación enzimática de glucosa se realizaron como se indica en la Sección 5.2.1.

### **6.2.2. Fuentes de enzima utilizadas**

Las fuentes de enzima utilizada son las mencionadas en la Sección 5.2.2.

En algunos ensayos se utilizaron preparados purificados de la enzima de *K. lactis* (Maxilact MX 5 000) y *K. fragilis* (Lactozym L 3 000). Ambas preparaciones están estabilizadas con polioles que representan aproximadamente el 90% de los sólidos totales (60%). La actividad de los preparados fue de 4.38 y 14.95 LAUest/mg de producto para Maxilact y Lactozym respectivamente.

### **6.2.3. Ensayos de actividad**

La actividad en lactosa se determinó como se indica en la Sección 5.2.3.

### **6.2.4. Ensayos de hidrólisis y determinación de la conversión**

Los ensayos de hidrólisis se realizaron como se indica en la Sección 5.2.4 y la conversión se determina como se indica en la Sección 5.2.4.3.

### **6.2.5. Evaluación de parámetros cinéticos y uso de simuladores**

Las simulaciones por computadora se realizaron mediante un simulador interactivo ISIM (University of Salford, Inglaterra). Para la determinación de los parámetros cinéticos se usó un programa para ajuste no lineales por mínimos cuadrados MINSQ (Micromath, USA)

## 6.3. RESULTADOS

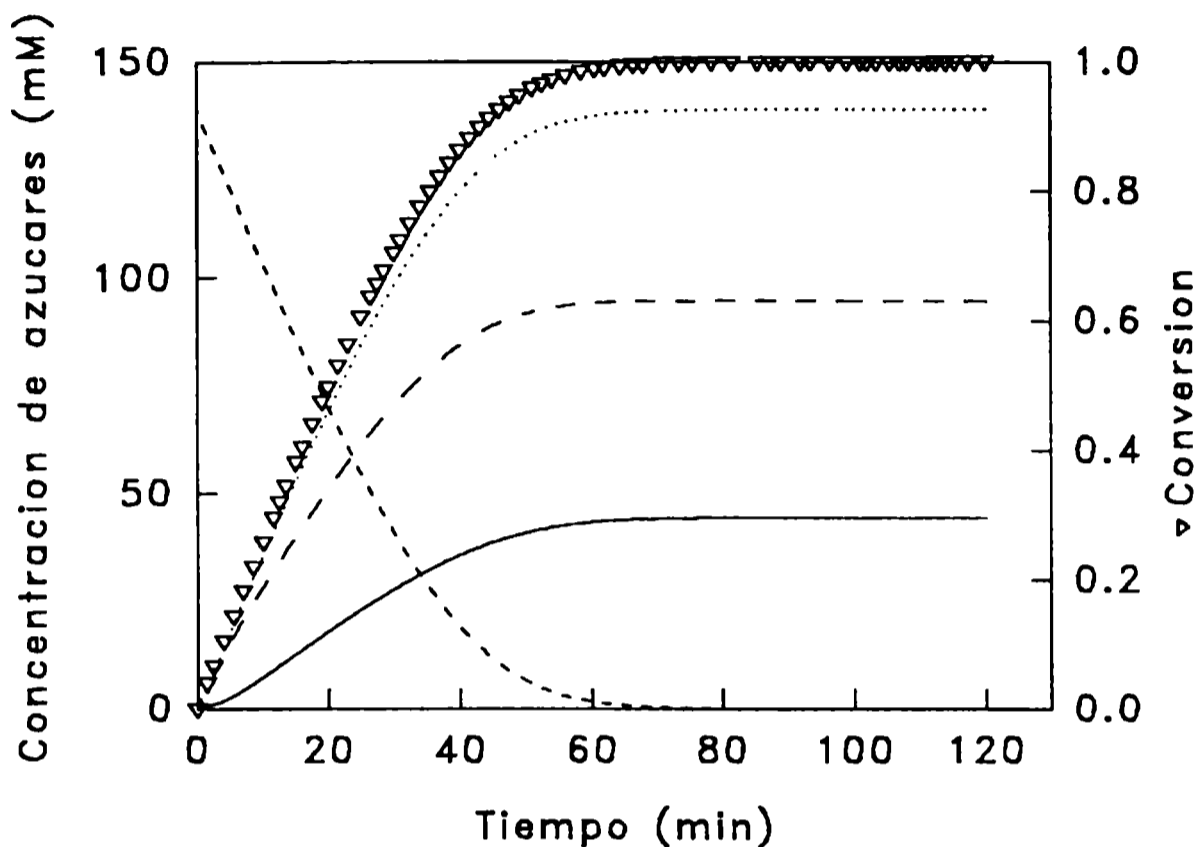
### 6.3.1. Selección de un modelo de hidrólisis

Obviamente es imposible considerar las diferentes reacciones en un modelo de hidrólisis de lactosa, debido a que las reacciones secundarias de transglucosidación generan diferentes productos de reacción. Un modelo práctico requiere considerar fundamentalmente la formación de glucosa y galactosa, es decir el curso de la reacción principal. Tal como se mencionó en el Capítulo anterior, los productos de transglucosidación representan como máximo el 6% de los azúcares totales cuando la concentración inicial de lactosa es baja (139 mM). Por lo tanto, para el modelo no se tomará en cuenta la formación de productos originados en las reacciones secundarias de transglucosidación.

El otro aspecto a considerar es la inhibición de los productos de la reacción. Resultó interesante determinar si la inhibición diferencial de la  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosa realmente ocurre con la  $\beta$ -gal de levaduras, o bien la misma no se pone en evidencia por la temperatura a la cual se estudia la hidrólisis con esta enzima (5 y 37 °C). Para ello se estimó la concentración de  $\alpha$ -galactosa producida durante la hidrólisis a 37 °C que es la temperatura que se empleará en los estudios cinéticos con esta enzima. Esto se realizó mediante simulaciones por computadora, considerando una cinética de Michaelis-Menten sin inhibición (Figura 6.1.). Para la cinética de mutarrotación se tomaron los datos informados por Flaschel y col. (1982).

En la simulación puede verse que la  $\alpha$ -galactosa se acumula, y, por lo tanto, de existir inhibición diferencial, ésta debería ponerse en evidencia. Sin embargo, si la inhibición ocurriera, la variación de la conversión (X) con  $E_0 \cdot t$  sería dependiente de la concentración inicial de enzima ( $E_0$ ), y esto no ocurre en condiciones de proceso similares (Figura 5.5.). Esto demostraría que la  $\beta$ -gal de levaduras no reconoce en forma diferencial las formas anoméricas de la galactosa.

**Figura 6.1.** Concentraciones relativas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosa durante la hidrólisis de lactosa a 37 °C.



Modelo de hidrólisis

$$\frac{dX}{dt} = \frac{V_{max} (1 - X)}{K_m + S_0 (1 - X)}$$

Modelo de mutarrotación

$$\frac{dG_{\alpha}}{dt} = k_{mut} (G_{\alpha eq} - G_{\alpha})$$

$$G_{\beta} = S_0 X - G_{\alpha}, \quad G_{\alpha eq} = \frac{K_{mut} S_0 X}{1 + K_{mut}}$$

Los parámetros cinéticos de mutarrotación de la galactosa fueron tomados de Flaschel y col. (1982). La simulación se realizó mediante un simulador interactivo (ISIM University of Salsford, Inglaterra). Parámetros cinéticos:  $V_{max}$ : 4.48  $\mu$ moles de lactosa/ml min,  $K_m$ : 33.1 mM,  $k_{mut}$ : 0.095908  $\text{min}^{-1}$  y  $K_{mut}$ : 0.47. - - -: Lactosa, — —:  $\beta$ -galactosa, —:  $\alpha$ -galactosa, ····: Glucosa.  $\nabla$ : Conversión.

Una confirmación adicional se realizó analizando la velocidad de hidrólisis de lactosa en presencia tanto de los anómeros en equilibrio como de la forma  $\alpha$  del azúcar. Para ello se agregó al sustrato (lactosa) una solución de galactosa, preparada 24 horas antes de la determinación, con el fin de asegurar la presencia de ambas formas anoméricas en equilibrio ( $\alpha/\beta = 32.1/67.9$ ). En otro experimento el agregado de inhibidor fue realizado utilizando galactosa cristalina, la cual contiene la forma  $\alpha$ . Las cinéticas de hidrólisis determinadas en ambas condiciones no presentan diferencias (Figura 6.2). Por lo tanto puede concluirse que, a diferencia de la enzima fúngica o bacteriana, la  $\beta$ -gal de levadura no distingue entre las formas anoméricas y ambas formas producirían el mismo efecto inhibitorio sobre la actividad  $\beta$ -gal.

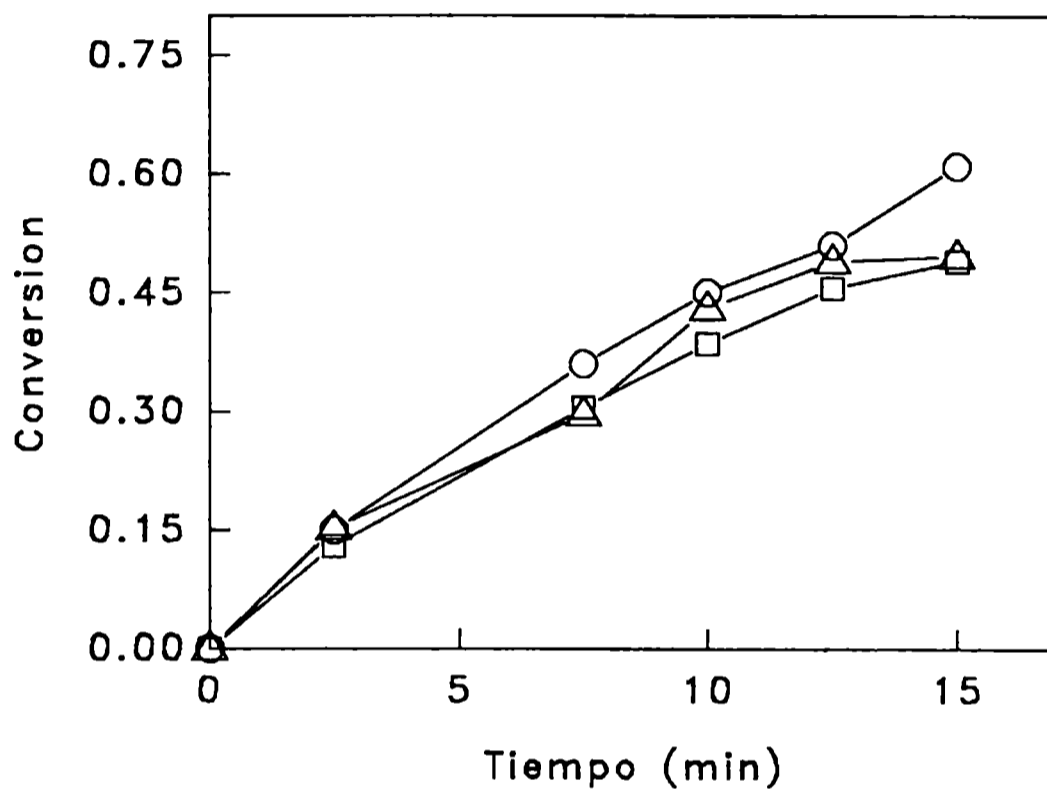
Queda por establecer qué tipo de inhibición ejerce la galactosa y la influencia de la glucosa sobre la velocidad de reacción. En el trabajo de Ohmiya y col. (1977) se propone, para la  $\beta$ -gal de *K. lactis*, una inhibición mixta por galactosa ( $K_i$ : 47 mM;  $K_i'$ : 103 mM) y no competitiva por glucosa ( $K_{glu}$ : 340 mM). Estos valores fueron calculados a partir de medidas experimentales de velocidad inicial de hidrólisis, realizadas con diferentes concentraciones de inhibidor y sustrato. Sin embargo, los autores no presentan cinéticas de hidrólisis experimentales, no pudiéndose establecer el grado de ajuste del modelo. En un trabajo posterior, Chen y col. (1985) determinaron, para la enzima de *K. fragilis*, una inhibición competitiva por galactosa ( $K_i$ : 77 mM) y no competitiva por glucosa ( $K_{glu}$ : 270 mM). Cabe por otra parte destacar las condiciones de incubación utilizadas. En el trabajo de Chen y col. (1985) el buffer utilizado fue Tris-maleato-NaOH; en cambio Ohmiya y col. (1977) usan buffer fosfato sin aclarar cual es el catión monovalente. Como se verá posteriormente los valores de los parámetros cinéticos dependen del entorno iónico.

Para determinar el efecto de la glucosa sobre la velocidad de reacción se realizó una simulación, en la que se consideró una cinética de Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa usando los parámetros cinéticos propuestos por Ohmiya y col. (1977),  $K_i$ : 47 mM y  $K_i'$ : 103 mM, con y sin inhibición no competitiva por glucosa ( $K_{glu}$ : 340 mM), la conversión obtenida se indica en la Figura 6.3. Puede observarse que el efecto de la glucosa es significativo aunque las diferencias en las conversiones estimadas con ambos modelos no superan el 6%. Para simplificar el modelo cinético se decidió no tomar en cuenta la inhibición no competitiva por glucosa.

---

**Figura 6.2.** Influencia de las formas anoméricas de la galactosa sobre la conversión en lactosa.

---



---

Condiciones de ensayo: PPB-Mn 20, pH 6.6. Concentración inicial de lactosa 139 mM, temperatura 37 °C. Concentración de inhibidor (galactosa) 100 mM. Fuente de enzima: ES (8 500 LAUest/L). ○: Sin adición de inhibidor. □: Solución de galactosa, mezclas anoméricas en equilibrio. Δ: Galactosa cristalina forma  $\alpha$  del anómero.

---



Asumiendo como válido el mecanismo de inhibición mixto para galactosa propuesto por Ohmiya y col. (1977) se estimaron los valores de las constantes de inhibición mediante ajuste no lineal por mínimos cuadrados (MINSQ, Micromath) utilizando los datos de conversión a 37 °C en buffer obtenidos con el producto celular estabilizado (PCE). Los parámetros  $V_{max}$  y  $K_m$  fueron los determinados experimentalmente (Sección 5.3.2.1.). Los valores obtenidos fueron  $K_i$ :  $54.8 \pm 4.7$  mM y  $K_i'$ :  $1 \times 10^8 \pm 4.9 \times 10^7$  mM, lo que sugiere que un modelo con inhibición competitiva sería suficiente para explicar la inhibición por galactosa. El ajuste del modelo a los datos experimentales se representa en la Figura 6.4.

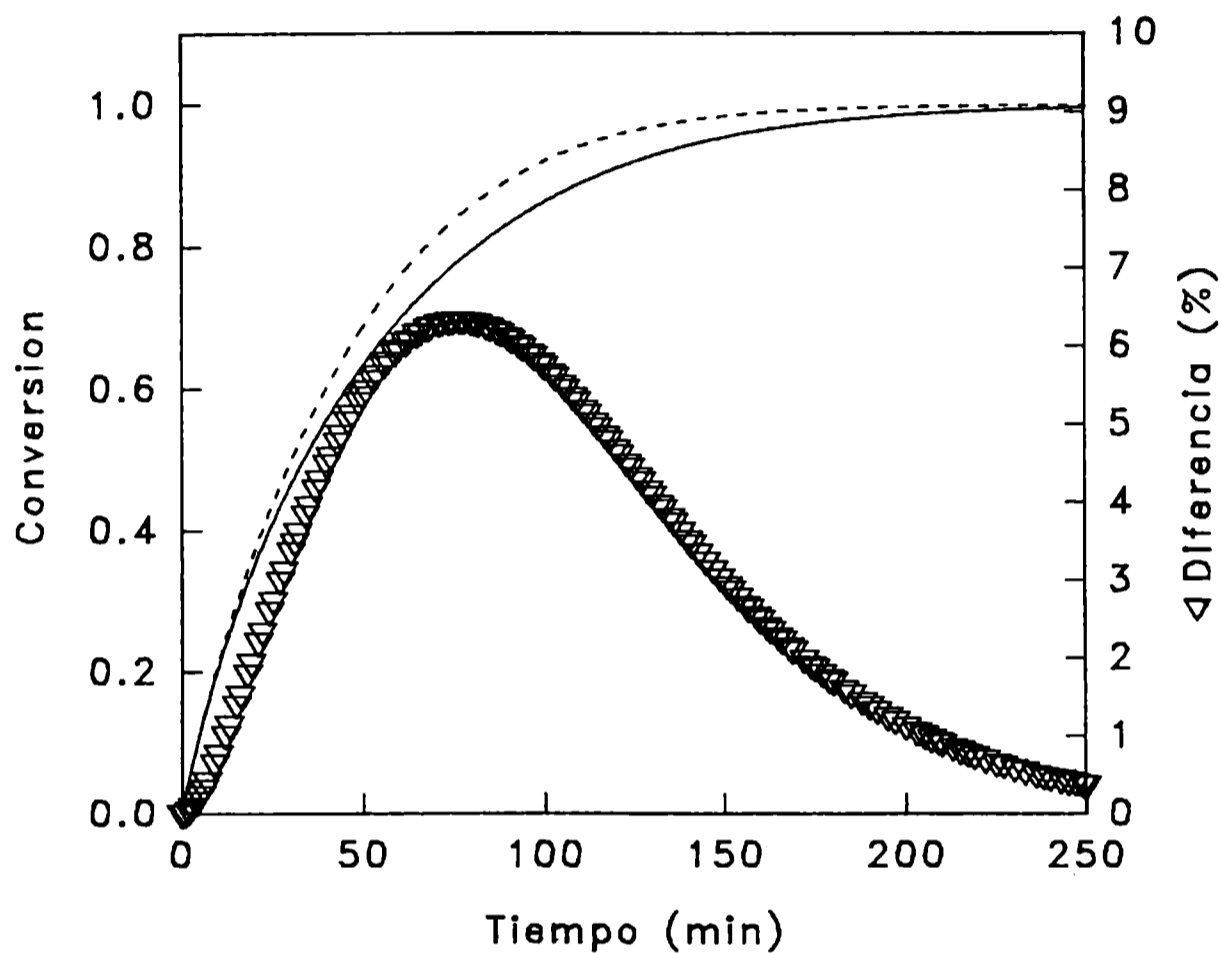
Por otra parte se efectuaron ensayos de hidrólisis con un preparado purificado de la enzima de *K. fragilis* (Lactozym L 3 000, Novo Ind.) y a efectos comparativos, con un preparado similar de *K. lactis* (Maxilact MX 5 000, Gist Brocades). Para un mismo valor de  $E_0.t$  la conversión obtenida fue similar (Figura 6.5.). Estos resultados no son consistentes con la existencia de diferentes mecanismos de inhibición por galactosa como los postulados para ambas enzimas. Las razones de estas diferencias no fueron estudiadas.

En base a los análisis y estudios efectuados se adoptó como modelo de la reacción de hidrólisis una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa.

---

**Figura 6.3.** Efecto de la inhibición no competitiva por glucosa en la reacción de hidrólisis de lactosa.

---



---

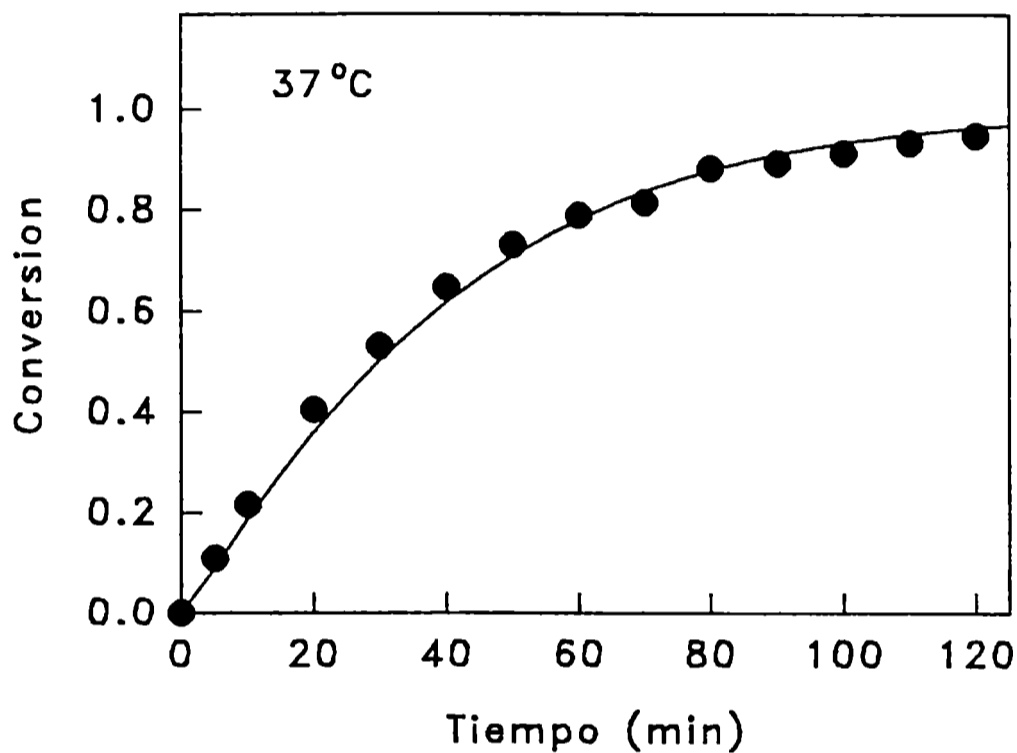
La simulación se realizó mediante un simulador interactivo ISIM (University of Salford, Inglaterra). Los parámetros cinéticos son:  $V_{max}$ : 4.48  $\mu\text{mol}$  de lactosa/ml min,  $K_m$ : 33.1 mM,  $K_i$ : 47 mM,  $K_i'$ : 340 mM,  $K_{glu}$ : 340 mM.  $K_i$ ,  $K_i'$  y  $K_{glu}$  se tomaron de Ohmiya y col. (1982). —: Cinética de Michaelis-Menten, con inhibición competitiva por galactosa. —: Cinética de Michaelis-Menten, con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa.  $\nabla$ : Diferencia en la conversión entre los dos modelos (%).

---

---

**Figura 6.4.** Estimación de la constante de inhibición por galactosa a partir de una cinética de hidrólisis de lactosa efectuada en presencia de potasio.

---

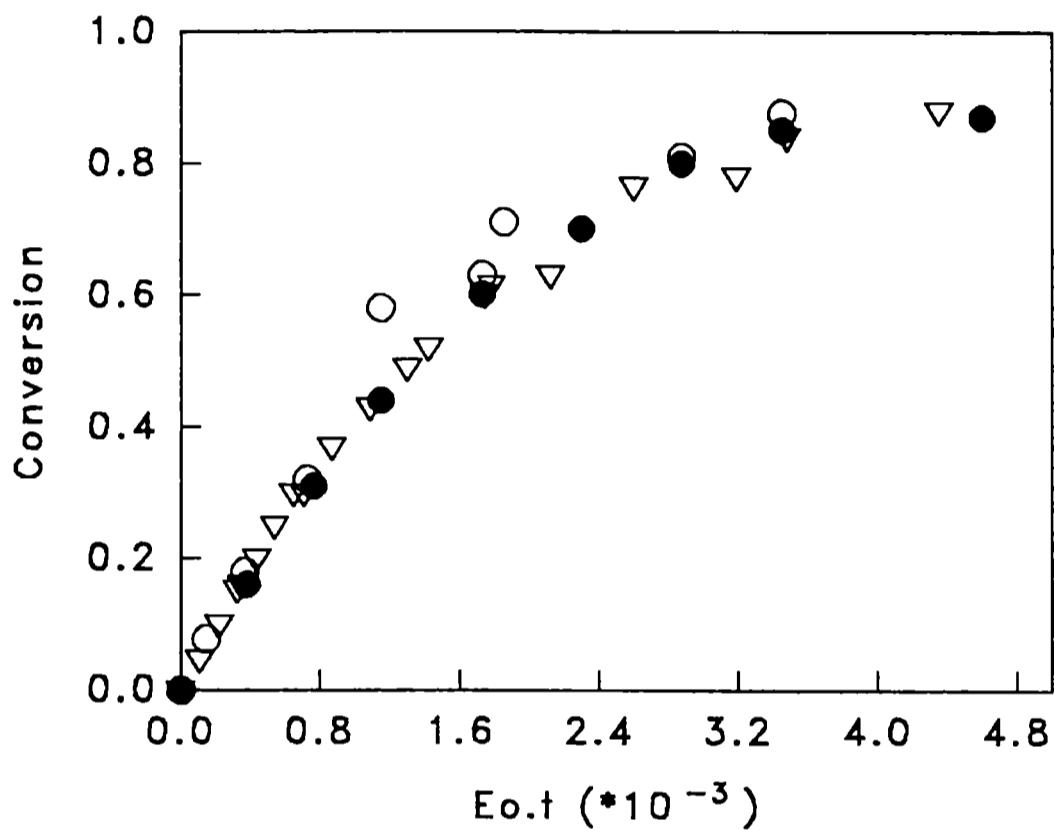


---

El modelo de hidrólisis asume una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa. Condición de reacción: PPB-Mn 20 (40 mM de  $K^+$ ), parámetros cinéticos usados en el modelo:  $V_{max}$ : 3.714  $\mu$ moles de lactosa/ml min,  $K_m$ : 33.1 mM. El valor de  $K_i$  se estimó por ajuste no lineal por mínimos cuadrados (MINSQ, Micromath). El valor obtenido fue de  $54.8 \pm 4.7$  mM. ●: Datos experimentales, —: Ajuste del modelo.

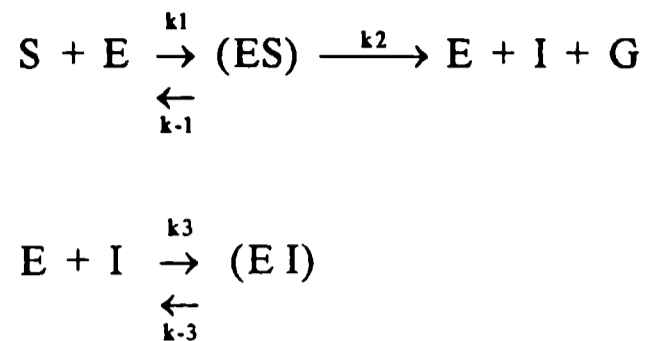
---

**Figura 6.5.** Cinética de hidrólisis de lactosa en buffer realizadas con  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y *K. fragilis*.



Actividad: 400 - 4 500 LAUest/L, tiempo de hidrólisis 0.033 - 2 h temperatura 37 °C. ▽: *K. lactis*, ○: *K. fragilis*, ●: PCE.

A continuación puede observarse el esquema de la reacción.



S, E, G, I: lactosa, enzima, glucosa, y galactosa, respectivamente.

ES, EI: complejos enzima-sustrato y enzima-galactosa, respectivamente.

k: constantes cinéticas.

El mecanismo propuesto por estas ecuaciones indica que la glucosa, tal como se había considerado, no tiene efecto en la velocidad de reacción de hidrólisis de lactosa.

Usando la aproximación de estado estacionario para los complejos intermediarios (ES) y (EI), se obtiene la siguiente expresión para la velocidad de reacción:

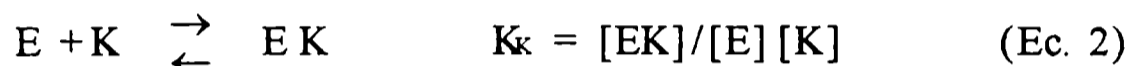
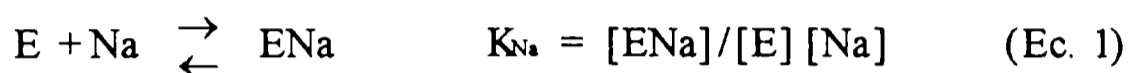
$$V = -\frac{dS}{dt} = \frac{dG}{dt} = \frac{V_{\max} S}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + S}$$

donde V es la velocidad de reacción, t tiempo, E<sub>0</sub> es la concentración total de enzima; K<sub>I</sub> = k<sub>-3</sub>/k<sub>3</sub>; V<sub>max</sub> = k<sub>2</sub> E<sub>0</sub>; K<sub>m</sub> = (k<sub>2</sub> + k<sub>-1</sub>)/k<sub>1</sub>.

### 6.3.2. Efecto de los cationes monovalentes (Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) en la cinética de hidrólisis de lactosa

Los cationes Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> cumplen una función fisiológica como transportadores de carga, por lo tanto, interactúan con la proteína estabilizándola. Para considerar su efecto específico en la hidrólisis de lactosa, se postula que el

$\text{Na}^+$  o el  $\text{K}^+$  son capaces de ocupar un lugar específico localizado en la región del centro activo, modulando la interacción enzima-sustrato, como probablemente también la interacción de la enzima con los productos de reacción como la galactosa. La unión de los cationes es excluyente y el lugar puede ser ocupado por  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ . A su vez esta unión es reversible y por lo tanto se puede plantear que se establece un equilibrio en la unión del catión con el grupo receptor (en forma semejante a lo que ocurre entre la enzima y el sustrato). Esta situación puede ser descripta del siguiente modo:



donde  $K_{\text{Na}}$  y  $K_{\text{K}}$  son las constantes de equilibrio para las dos reacciones.

Cuando ambos cationes están presentes puede asumirse que existirá una fracción de la enzima ligada a  $\text{Na}^+$  y otra fracción ligada a  $\text{K}^+$ . La probabilidad de unión de los cationes a la enzima dependerá de su afinidad por el receptor (determinada por la constante de equilibrio) y de sus concentraciones relativas. Como la concentración de estos iones es mucho mayor que la concentración de enzima (como ocurre en las condiciones experimentales), se puede considerar que todos los sitios o receptores estarán ocupados por el catión.

Si se elimina E entre las ecuaciones 1 y 2 se obtendrá:

$$\frac{[\text{ENa}]}{[\text{Na}] K_{\text{Na}}} = \frac{[\text{EK}]}{[\text{K}] K_{\text{K}}} \quad (\text{Ec. 3})$$

La relación de enzima ligada a  $\text{K}^+$  y a  $\text{Na}^+$  será:

$$\frac{[\text{EK}]}{[\text{ENa}]} = \frac{K_{\text{K}} [\text{K}]}{K_{\text{Na}} [\text{Na}]} \quad (\text{Ec. 4})$$

Como toda la enzima está ligada a cationes entonces:

$$E_{Na} + E_K = E_0 \quad (\text{Ec. 5})$$

De este modo la Ecuación 4 puede escribirse:

$$\frac{E_0}{E_{Na}} = \frac{K_K [K]}{K_{Na} [Na]} + 1 \quad (\text{Ec. 6})$$

y, reordenando:

$$\frac{E_{Na}}{E_0} = \frac{1}{1 + \frac{K_K [K]}{K_{Na} [Na]}} \quad (\text{Ec. 7})$$

La ecuación puede escribirse:

$$F_{Na} = \frac{1}{1 + \frac{K_K [K]}{K_{Na} [Na]}} \quad (\text{Ec. 8})$$

donde  $F_{Na}$  es la fracción de enzima asociada a sodio ( $E_{Na}/E_0$ ).

De este modo la Ecuación 5 puede escribirse en función de la fracción de enzima asociada a potasio:

$$F_K = 1 - F_{Na} \quad (\text{Ec. 9})$$

Para completar el modelo se considera que la velocidad de la reacción puede expresarse como una combinación lineal de dos términos, uno asociado a la actividad que presenta la fracción de enzima ligada a potasio, y otro término asociado a la actividad de la fracción de la enzima ligada a sodio

$$V = V_K F_K + V_{Na} F_{Na} \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde  $V$  es la velocidad de reacción en presencia de ambos cationes y  $V_K$  y  $V_{Na}$  son las velocidades de reacción exhibida por la enzima cuando está combinada a potasio o sodio, respectivamente. La Ecuación 10 puede escribirse en términos de la fracción de enzima ligada a potasio:

$$V = V_K F_K + V_{Na} (1 - F_K) \quad (\text{Ec. 11})$$

Para determinar el curso global de la hidrólisis es necesario considerar el modelo general de la reacción. Esto es:

$$V = -\frac{dS}{dt} = \frac{dG}{dt} = \frac{k_2 E_0 S}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + S} \quad (\text{Ec. 12})$$

Combinando las Ecuaciones 11 y 12 se llega a:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_{2K} E_0 S}{K_{mK} \left(1 + \frac{[I]}{K_{IK}}\right) + S} F_K + \frac{k_{2Na} E_0 S}{K_{mNa} \left(1 + \frac{[I]}{K_{INa}}\right) + S} (1 - F_K) \quad (\text{Ec. 13})$$

Esta misma ecuación puede expresarse en términos de la conversión:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{k_{2K} E_0 (1 - X)}{K_{mK} \left(1 + \frac{X S_0}{K_{IK}}\right) + S_0 (1 - X)} F_K + \frac{k_{2Na} E_0 (1 - X)}{K_{mNa} \left(1 + \frac{X S_0}{K_{INa}}\right) + S_0 (1 - X)} (1 - F_K) \quad (\text{Ec. 14})$$

donde  $X: (S_0 - S)/S_0$ , e  $I: X S_0$ .

Cabe aclarar que  $F_K$  y  $F_{Na}$  no dependen de la conversión, ya que las concentraciones de  $Na^+$  y  $K^+$  no se modifican durante el curso de la reacción.



### 6.3.3. Comprobación experimental del modelo

#### 6.3.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos

Para determinar la validez del modelo es necesario conocer los parámetros cinéticos de la hidrólisis en presencia de  $K^+$  y  $Na^+$ . Los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  en presencia de  $Na^+$  se determinaron a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en NaPB-Mn 20, en forma similar a lo descrito para  $K^+$  (Sección 5.3.2.1.). El valor de  $K_i$  se estimó por ajuste no lineal por mínimos cuadrados a partir de los valores de conversión durante el curso global de la reacción (Figura 6.6.). Los datos se resumen en la Tabla 6.2.

---

**Tabla 6.6.** Parámetros cinéticos para la hidrólisis de lactosa en sodio y potasio.

---

Parámetros	Cación	
	$Na^+$	$K^+$
$V_{max}$	7.47	86.74
$K_m$	22.4	33.1
$K_i$	19.49	54.8

---

Condiciones de reacción NaPB-Mn 20 o NaPP-Mn 20 ( $40\text{ mM } K^+$  o  $Na^+$ ), temperatura  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

$V_{max}$ : Velocidad máxima de hidrólisis ( $\mu\text{moles de lactosa/min } 10^9\text{ células}$ );  $K_m$  y  $K_i$ : Constante de Michaelis-Menten y constante de inhibición por galactosa (mM).

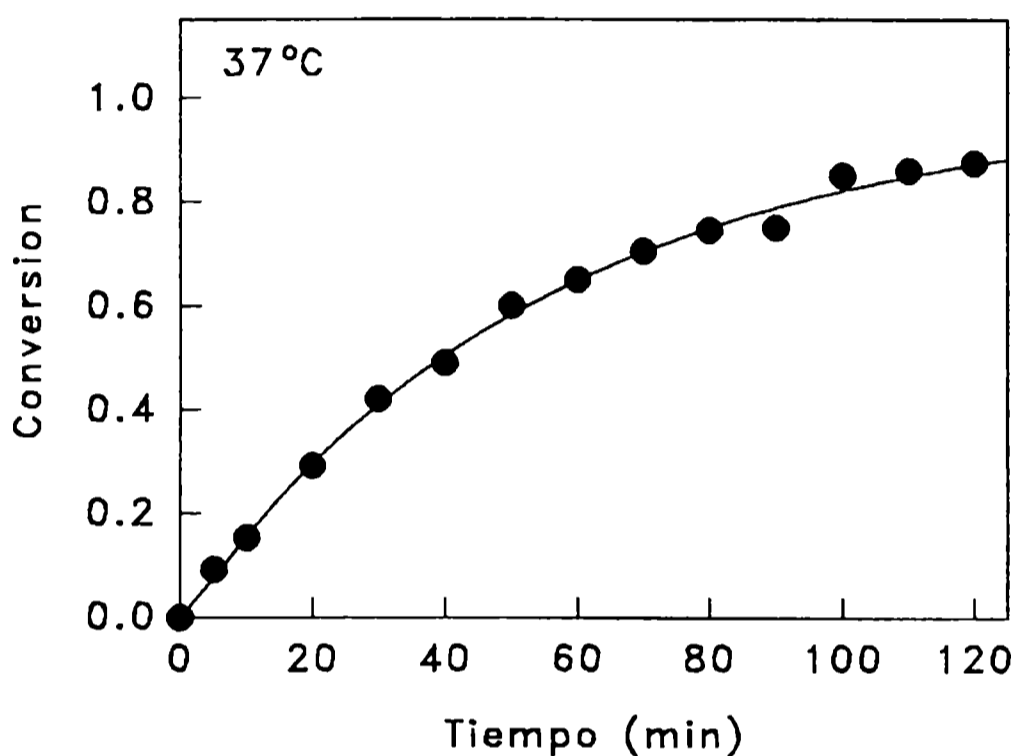
---

En presencia de  $Na^+$  la enzima presenta mayor afinidad por lactosa y mayor inhibición por galactosa. El efecto principal reside en la  $V_{max}$  que es 12 veces menor con sodio. Los valores de actividad inicial no fueron afectados por la concentración de potasio o de sodio en el rango de 20 a 120 mM.

---

**Figura 6.6.** Estimación de la constante de inhibición por galactosa a partir de una cinética de hidrólisis de lactosa efectuada en presencia de sodio.

---



---

El modelo de hidrólisis asume una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa. El valor de  $K_i$  se estimó por ajuste no lineal por mínimos cuadrados (MINSQ, Micromath). El valor obtenido fue de  $19.49 \pm 1.23$  mM. Condición de reacción: NaPB-Mn 20 (40 mM de  $\text{Na}^+$ ), parámetros cinéticos usados en el modelo:  $V_{\text{max}}$ : 2.967  $\mu\text{moles de lactosa/ml min}$ ,  $K_m$ : 22.4 mM. ●: Datos experimentales. —: Ajuste del modelo.

---

### 6.3.3.2. Determinación de la velocidad inicial de hidrólisis en mezclas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>

En este caso el modelo se reduce a la siguiente expresión:

$$V_0 = V_{\max K} \frac{S_0}{K_{mK} + S_0} F_K + V_{\max Na} \frac{S_0}{K_{mNa} + S_0} (1 - F_K) \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde  $V_0$  es la velocidad inicial de hidrólisis y  $V_{\max K}$  y  $K_{mK}$  son los parámetros cinéticos determinados en presencia de potasio y sodio respectivamente.  $S_0$  es la concentración inicial de sustrato.

Para poder calcular las velocidades iniciales de hidrólisis teóricas es necesario conocer  $F_K$  y  $F_{Na}$  (Ecuaciones 8 y 9). Para ello es necesario sin embargo, conocer los valores de las constantes de equilibrio  $K_{Na}$  y  $K_K$ . Como estas no se determinaron en forma independiente, la relación de las mismas pueden estimarse indirectamente, conociendo un valor de velocidad inicial de hidrólisis para una relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> definida. El modelo predice que la velocidad depende de la relación de concentraciones Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y no de la concentración absoluta de ambos iones. Se utilizó para ello una relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de 0.5 (K<sup>+</sup> 40 mM, Na<sup>+</sup> 20 mM) y una concentración de enzima (PCE) en mezcla de reacción equivalente a una  $V_{\max}$  en potasio y en sodio de 4.48 y 0.3859  $\mu\text{moles lactosa/min ml}$  respectivamente. Las medidas se realizaron a 37 °C. El valor experimental de velocidad inicial fue de 1.48  $\mu\text{moles lactosa/min ml}$  y el valor de  $F_K$  calculado fue de 0.35, con lo cual se determinó una relación  $K_K/K_{Na}$  de 0.27. Esta relación es constante para una temperatura determinada, y en este caso el valor mencionado indica que la enzima posee mayor afinidad por sodio.

Con esta relación se calcularon los valores de  $F_k$  para distintas concentraciones de sodio y potasio y se estimó la velocidad inicial de hidrólisis con la ecuación cinética propuesta. Los valores teóricos y experimentales se detallan en la Tabla 6.3.

Los valores teóricos y experimentales concuerdan en todo el rango de concentraciones ensayadas, con un error del orden del 3%.

**Tabla 6.3.** Efecto de la concentración de iones Na y K sobre la velocidad inicial de hidrólisis.

Concentración <sup>a</sup>		R <sub>Na/K</sub> <sup>b</sup>	F <sub>K</sub>	Velocidad inicial de hidrólisis <sup>c</sup>	
Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>			E	M
40-100	--		--	3.618	--
--	40-100		--	0.3323	--
80	10	0.125	0.68	2.37	2.56
120	20	0.166	0.618	2.24	2.37
40	10	0.25	0.52	2.11	2.04
160	40	0.25	0.52	2.00	2.04
50	20	0.4	0.40	1.62	1.65
40	20	0.5*	0.35	1.48	1.48
80	40	0.5	0.35	1.45	1.48
40	40	1	0.212	1.03	1.02

<sup>a</sup>: Concentración de cationes en la mezcla de reacción (mM). <sup>b</sup>: Relación de concentraciones sodio potasio en mezcla de reacción. <sup>c</sup>: Velocidad inicial de hidrólisis (LAU/ml), concentración de sustrato: 139 mM, temperatura 37 °C. E: Determinada experimentalmente, M: Determinada por el modelo. \*: Relación usada para determinar el cociente de constantes de equilibrio (K<sub>K</sub>/K<sub>Na</sub>).

Se observa tal como predice el modelo, que la velocidad de reacción no depende de la concentración absoluta de los cationes sino de su concentración relativa en la mezcla de reacción.

### **6.3.3.3. Determinación de la conversión**

Para determinar la influencia de estos iones durante el curso global de la reacción de hidrólisis, la ecuación cinética debe tener en cuenta la inhibición competitiva por galactosa (Ecuación 13). En la Figura 6.7 se presentan las conversiones obtenidas experimentalmente junto con los valores teóricos calculados mediante el modelo propuesto. Al igual que lo mencionado anteriormente la predicción del modelo es aceptable.

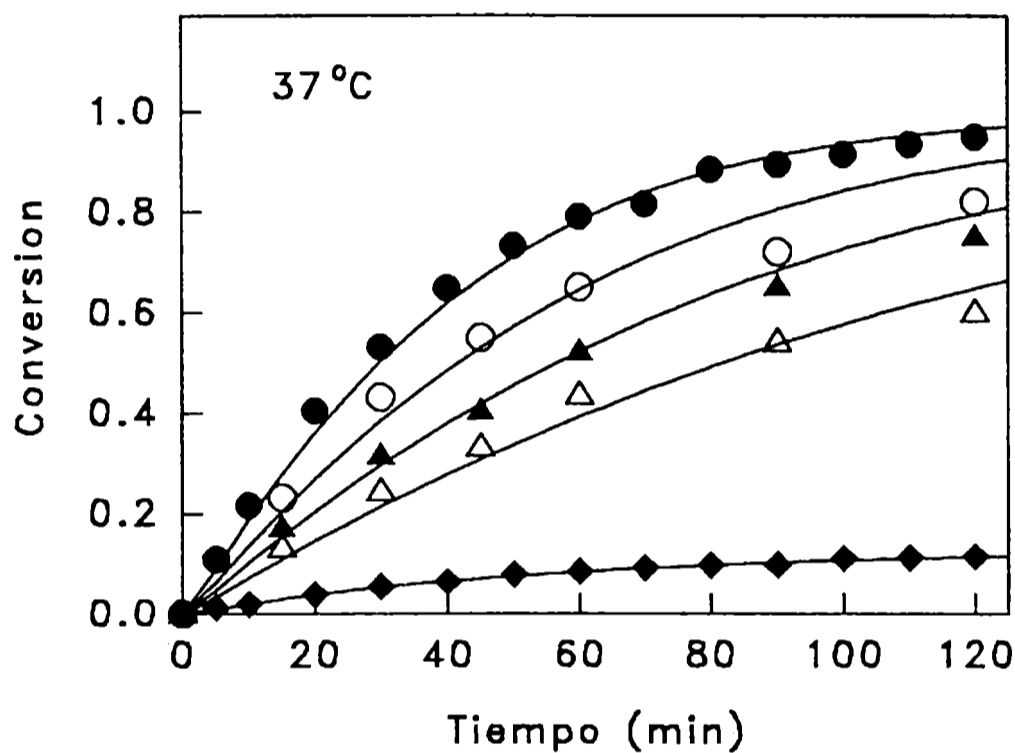
### **6.3.3.4. Predicción de la hidrólisis en leche**

En base a los resultados obtenidos se aplicó el modelo para poder predecir la conversión en leche. La relación de concentraciones  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en el sustrato (obtenido del análisis de origen) fue de 0.55 - 0.6. En la experiencia la cantidad de enzima adicionada fue equivalente a una  $V_{\text{max}}$  de 7.42 y de 0.63  $\mu\text{moles}$  de lactosa/min ml en potasio y sodio respectivamente. La velocidad inicial de hidrólisis en leche fue de aproximadamente 2.0  $\mu\text{moles}$  de lactosa/min ml. Este valor es el 87% del valor teórico calculado por el modelo (2.29  $\mu\text{moles}$  de lactosa/min ml).

Esto demuestra que si bien hay otros factores que deprimen la actividad  $\beta$ -gal en el sustrato, el efecto principal debe ser atribuido al ejercido por los cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . La evolución de la conversión con el tiempo de hidrólisis en leche y la curva teórica predecible por el modelo se detallan en la Figura 6.8. Además de las diferencias encontradas en la velocidad inicial de reacción, se observa una desviación de los valores de conversión a medida que avanza la hidrólisis. Sin embargo, las desviaciones no superan el 10% del valor teórico, lo cual es aceptable si se considera la complejidad del sistema.

Es evidente que una mejor predicción de la conversión en sustratos naturales, deberá conciderar por ejemplo el posible efecto de otros componentes sobre los parámetros cinéticos de la reacción enzimática. Por otra parte sería necesario profundizar el estudio sobre el mecanismo de la reacción hidrolítica, ya que en este estudio solo se considera una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa para modelar el curso de la reacción.

**Figura 6.7.** Efecto de la concentración de iones Na y K durante el curso global de la reacción de hidrólisis.

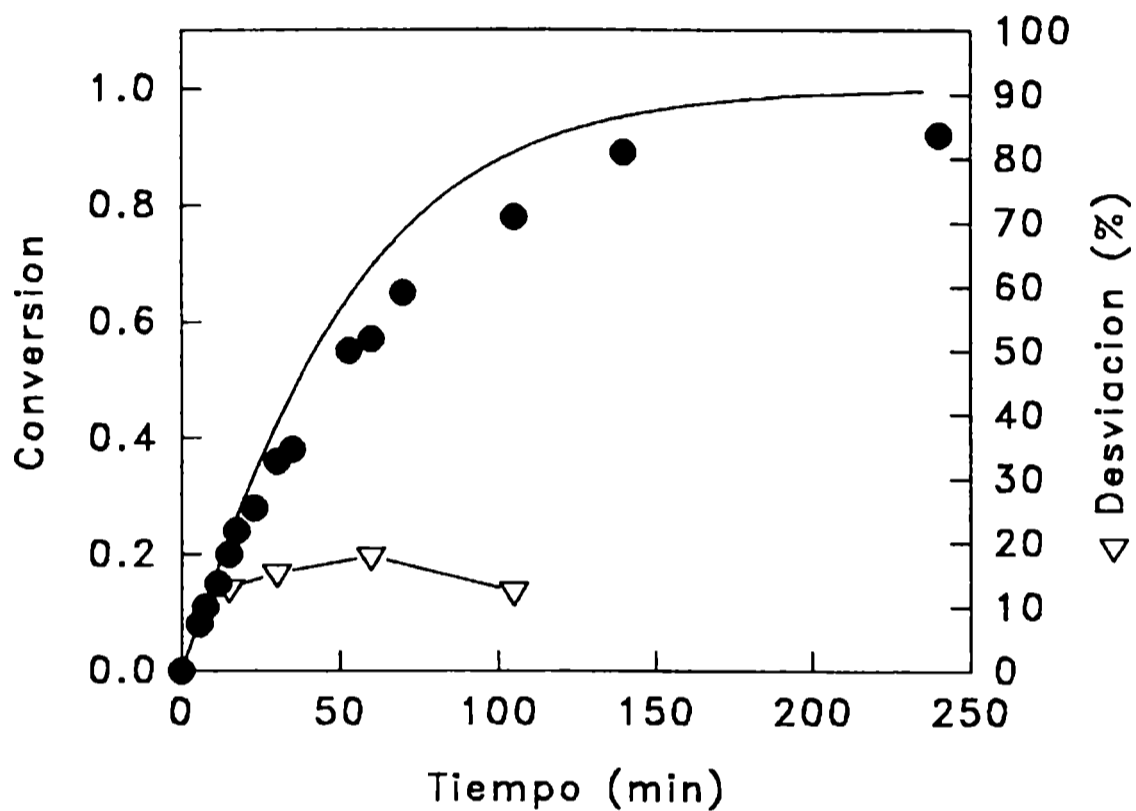


$V_{max}$  ( $\text{Na}^+$  40 mM): 2.967  $\mu\text{moles de lactosa/min ml}$ ,  $V_{max}$  ( $\text{K}^+$  40 mM): 3.714  $\mu\text{moles de lactosa/min ml}$ , temperatura 37 °C. Conversión experimental en mezclas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . ●: 40 mM  $\text{K}^+$ , ○: 40 mM  $\text{K}^+$ , 10 mM  $\text{Na}^+$ , ▲: 40 mM  $\text{K}^+$ , 20 mM  $\text{Na}^+$ , △: 40 mM  $\text{K}^+$ , 40 mM  $\text{Na}^+$  ◆: 40 mM  $\text{Na}^+$ , —: Conversión predicha por el modelo.

---

**Figura 6.8.** Comprobación del modelo de acción de cationes monovalentes. Predicción de la conversión en leche.

---



---

Condiciones de reacción: leche descremada concentración inicial de lactosa 139 mM, (relación de concentraciones  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ : 0.55), temperatura 37 °C. ●: Datos experimentales, —: Ajuste del modelo.

---

---

**CAPITULO 7**

**CONCLUSIONES GENERALES**

---



## 7.1. CONCLUSIONES

La permeabilización celular mediante el uso de solventes orgánicos como tolueno, cloroformo o etanol es un método efectivo para obtener células no viables con actividad  $\beta$ -galactosidasa. El proceso es sumamente rápido pudiendo ocurrir en 5 minutos y probablemente en un tiempo menor. La temperatura, concentración celular y de solventes y el tiempo de tratamiento, constituyen las variables fundamentales del proceso.

Las células permeabilizadas constituyen un sistema inestable. Los solventes producen una desorganización generalizada de los sistemas de membranas, lo que se manifiesta en la progresiva solubilización de proteínas de distintos compartimientos al medio extracelular. El proceso de solubilización es básicamente una difusión a través de la pared celular que permanece esencialmente inalterada por la permeabilización. En una etapa posterior se pone en evidencia el proceso autolítico, que conduce a la desintegración de la matriz celular, y a la desactivación de las enzimas. Este proceso es altamente dependiente de la temperatura. El fenómeno más característico es la proteólisis generalizada.

La solubilización de las enzimas y la pérdida de actividad pueden suprimirse tratando las células permeabilizadas con glutaraldehído. Los parámetros principales del proceso son la concentración de reactivo ligante y la temperatura. En condiciones óptimas de tratamiento se pierde entre el 15 y el 25% de la actividad  $\beta$ -gal, lo que es atribuible a la inactivación química del catalizador. Esta inactivación involucra reacciones del agente ligante con el centro activo de la enzima y una acción más inespecífica relacionada con el efecto de "entrecruzamiento".

El efecto estabilizante del glutaraldehído, que se manifiesta en el confinamiento o retención de la actividad en la célula permeabilizada, no es un fenómeno estérico controlado por la porosidad de la pared celular. El efecto real es la formación de una estructura insoluble en la cual se hallan involucrados los principales componentes de la matriz celular, incluyendo una fracción de las proteínas de la pared. La integridad de este *cluster* de material celular no depende de la presencia intacta de la pared. Se puede considerar a dicha estructura como un pseudo protoplasto. La estabilidad de la actividad  $\beta$ -gal es debida entre otras

causas, al bloqueo del sistema proteolítico endógeno. A diferencia de la  $\beta$ -gal donde el sustrato exógeno de bajo peso molecular puede difundir a través de la estructura y acceder al sitio activo de la enzima, las proteasas no pueden actuar sobre los sustratos protéicos endógenos, debido a su inmovilización provocada por la reacción de entrecruzamiento. El pseudo protolasto es sensible en cambio, a la degradación proteolítica exógena que solubiliza e inactiva la enzima. De igual manera es sensible a los esfuerzos de corte, como es característico de estructuras de alto peso molecular.

La obtención de la estructura insoluble requiere que la reacción de entrecruzamiento ocurra dentro de la célula permeabilizada. La dispersión de los componentes celulares no impide el entrecruzamiento pero modifica las propiedades de los productos de la reacción, en particular su solubilidad.

Las propiedades cinéticas, que exhibe la enzima en la célula estabilizada, no difieren mayormente de las que presenta la enzima libre o soluble. La enzima confinada en la célula es más estable térmicamente, lo que se atribuye al efecto protector que ejercen las proteínas y probablemente otros componentes celulares. La enzima inmovilizada presenta un rango de estabilidad frente al pH diferente al de la enzima soluble, aunque el efecto de la composición iónica del medio es similar.

El biocatalizador presenta una estabilidad operacional y de almacenamiento que lo hacen apropiado para ser reusado.

En el caso de células con actividad  $\beta$ -gal es común que el estudio del comportamiento del catalizador se realice con un sustrato artificial como el ONPG. Los resultados así obtenidos no pueden ser extrapolables a sustratos naturales como leche, suero o permeado, que serán los sustratos reales del mismo. Es por ello que en este trabajo se determinó el comportamiento en soluciones de lactosa y leche y se desarrolló un modelo cinético que contempla el efecto de cationes monovalentes, como sodio y potasio, que puede servir de base para predecir el comportamiento del biocatalizador en sustratos naturales. La hidrólisis de lactosa puede ser modelada mediante una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto (galactosa).

Los estudios realizados han permitido adquirir conocimientos básicos que pueden ser utilizados como guía para obtener biocatalizadores que incluyan otras actividades enzimáticas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Achstetter, T.; Emter, O.; Ehmann, C.; Wolf, D. (1984). Proteolysis in eukaryotic cells. Identification of multiple proteolytic enzymes in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 259 (21), 13334 - 13343.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27 (6), 1256 - 1262.
- Agarwal, P. (1985). Heterogeneous denaturation of enzymes: A distributed activation energy model with nonuniform activities. *Biotechnology and Bioengineering* 27, 1554 - 1563.
- Ariga, O.; Yamakawa, T.; Fujimatsu, H.; Sano, Y. (1989). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase with polyvinyl alcohol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68 (4), 293 - 295.
- Arnold, W. (1972a). *p*-Toluenethiol as an initiator of autolysis in Bakers' yeast. *Journal of Bacteriology* 100, 949 - 951.
- Arnold, W. (1972b). The structure of the yeast cell wall. Solubilization of a marker enzyme,  $\beta$ -fructofuranosidase, by the autolytic enzyme system. *Journal of Biological Chemistry* 247 (4), 1161 - 1169.
- Bakken, A.; Hill, C, Jr.; Amundson, C. (1992). Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized  $\beta$ -galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnology and Bioengineering* 39, 408 - 417.
- Banerjee, M.; Chakrabarty, A.; Majudmar, S. (1982). Immobilization of yeast cells containing  $\beta$ -galactosidase. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 1839 - 1850.
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. (1983). *Yeast: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bergmeyer, H.; Gawehn, K.; Grassl, M. (1974). Enzymes as biochemical reagent En: Bergmeyer H.; Gawehn, K. (Eds.). *Methods of enzymatic analysis* Academic Press: Londres; vol. 1 pp. 452 - 522.

- Beunink, J.; Rehm, H. (1990). Coupled reductive and oxidative degradation of 4-chloro-2-nitrophenol by a co-mobilized mixed culture system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34, 108 - 115.
- Bisso, G.; Melelli, F. (1986). Application of glutaraldehyde cross-linked yeast cells to the continuous phosphorylation of glucose to fructose 1,6-diphosphate. *Process Biochemistry* (Agosto), 113 - 115.
- Bódalo, A.; Gómez, E.; Gómez, J. L.; Bastida, J.; Máximo, M. F.; Díaz, F. (1991). A comparison of different methods of  $\beta$ -galactosidase immobilization. *Process Biochemistry* 26, 349 - 353.
- Boze, H.; Moulin, G.; Galzy, P. (1987). Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*. Biochemical characteristics and attempted genetical analysis. *Journal of General Microbiology* 133, 15 - 23.
- Breddam, K.; Beenfeldt, T. (1991). Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35, 323 - 329.
- Brodsky, J.; GrootWassink, J. (1986). Development of whole-cell yeast lactase for use in dairy processing. *Journal of Food Science* 51 (4), 897 - 903.
- Catley, B. (1988). Isolation and analysis of cells walls. En: Campbell y Duffus (Eds.). *Yeast a practical approach*. IRL Press: Oxford. pp. 163 - 183.
- Champluvier, B.; Kamp, B.; Rouxhet, P. (1988a). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase retained in yeast. Adhesion of the cells on a support. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27, 464 - 469.
- Champluvier, B.; Kamp, B.; Rouxhet, P. (1988b). Preparation and properties of  $\beta$ -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 10, 611 - 617.
- Champluvier, B.; Marchal, F.; Rouxhet, P. (1989). Immobilization of lactase in yeast cells retained in a glass wool matrix. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 422 - 431.
- Charpentier, C.; Nguyen Van Long, T.; Bonaly, R.; Feuillat, M. (1986). Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, 405 - 413.

- Chen, C.; Dale, M.; Okos, M. (1990). The long-term effects of ethanol on immobilized cell reactor performance using *K. fragilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 36, 975 - 982.
- Chen, K.; Houn, J.; Ling, A. (1985). Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. *Enzyme and Microbial Technology* 7, 510 - 514.
- Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T. (1974). Immobilized aspartase-containing microbial cells: Preparation and enzymatic properties. *Applied Microbiology* 27, 878 - 885.
- Chibata, I.; Tosa, T. (1977). Transformations of organic compounds by immobilized microbial cells. *Advances in Applied Microbiology* 22, 1- 25.
- Chibata, I. (1979). Development of enzyme engineering - Application of immobilized cell systems. *Kemia-Kemi* 12, 705 - 714.
- Chun, G.; Agathos, S. (1991). Comparative studies of physiological and environmental effects on the production of cyclosporin A in suspended and immobilized cells of *Tolypocladium inflatum*. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 256 - 265.
- Constantinides, A.; Metha N. (1991). Periodic operation of immobilized live cell bioreactor for the production of candicidin. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 1010 - 1020.
- Dahlquist, A.; Mattianson, B.; Mosbach, K. (1973). Hydrolysis of  $\beta$ -galactosidase using polymer-entrapped lactase. A study towards producing lactose-free milk. *Biotechnology and Bioengineering* 15, 395 - 402.
- Declaire, M.; De Cat, W.; Van Huynh, N. (1986). Appearance of cell-bound  $\beta$ -galactosidase activity in *Kluyveromyces bulgaricus* resting cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, 323 - 325.
- Declaire, M.; van Huyhn, N.; Motte, J. (1985a). Hydrolysis of lactose solutions and wheys by whole cells of *Kluyveromyces bulgaricus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21, 103 - 107.
- Declaire, M.; van Huyhn, N.; Motte, J.; De Cat, W. (1985b). Hydrolysis of whey by whole cells *Kluyveromyces bulgaricus* immobilized in calcium alginate gels and in hen egg white. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22, 438 - 441.

- Declaire, M.; De Cat, W.; van Hugh, N. (1987). Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining *in situ*  $\beta$ -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 9, 300-302.
- Dhulster, P.; Parascandola, P; Scardi, V. (1983). Improved method for immobilizing invertase active whole-cell of *Saccharomyces cerevisiae* in gelatin. *Enzyme and Microbial Technology* 5, 65 - 69.
- Dickson, R.; Barr, K. (1983). Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology* 154, 1245 - 1251.
- Dickson, R.; Dickson, L.; Markin, J. (1979). Purification and properties of an inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology* 137, 51 - 61.
- Edebo, L. (1969). Disintegration of cells En: Perlman, D. (Ed.). *Fermentation Advances*. Academic Press: Nueva York. pp. 249 - 272.
- Ellar, D.; Muñoz, E.; Salton, M. (1971). The effect of low concentrations of glutaraldehyde on *Micrococcus lysodeikticus* membranes: changes in the release of membrane-associated enzymes and membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 225, 140 - 150.
- Farkas V. (1989). Polysaccharides metabolism En: Rose, A. y Harrison, S. (Eds.). *The Yeast*. Academic Press: Londres. vol. 3, pp. 317 - 366.
- Felix, H. (1982). Review. Permeabilized cells. *Analytical Biochemistry* 120, 211 - 234.
- Fenton, D. (1982). Solvent treatment for  $\beta$ -galactosidase release from yeast cells. *Enzyme and Microbial Technology* 4, 229 - 232.
- Flaschel, E; Raetz, E; Renken, A (1982). The kinetics of lactose hydrolysis for the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 2499 - 2518.
- Furusaki, S.; Seki, M. (1992). Use and engineering aspects of immobilized cells in biotechnology. En: Fiechter, A. (Ed.). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag: Heidelberg. vol. 46; pp. 161-185.
- Galazzo, J.; Bailey, J. (1990). Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* 36 (4), 417 - 426.

- Gekas, V.; López-Leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochemistry* (Febrero) 2 - 12.
- Goldstein, L.; Manecke, G. (1976). The chemistry of enzyme immobilization. En: Wingard, L.; Katchalski-Katzir, E.; Goldstein, L. (Eds.). *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Academic Press, Inc.: Nueva York. vol. 1: Immobilized Enzyme Principles, pp. 23 - 126.
- Gonçalves, J.; Castillo, F. (1985). Partial purification and characterization of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Dairy Science* 65, 2088 - 2091.
- Gowda, L.; Bachlawat, N.; Bhat, S. (1991). Permeabilization of Bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 154 - 157.
- Grieve, P.; Kitchen, B.; Dulley, J.; Bartley, J. (1983). Partial characterization of cheese-ripening proteinases produced by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Dairy Research* 50, 460 - 480.
- Habeeb, A. F. S. A.; Hiramoto, R. (1968). Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126, 16 - 26.
- Habeeb, A. F. S. A. (1967). Preparation of enzymically active, water-insoluble derivatives of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 119, 264 - 268.
- Hansen, R.; Switzer, R.; Hinze, H.; Holzer, H. (1977). Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 496, 103 - 114.
- Hansruedi, F. (1982). Permeabilized cells. *Analytical Biochemistry* 120, 211 - 234.
- Hardy, P.; Nicholls, C.; Rydon, H. (1976). The nature of the cross-linking of proteins by glutaraldehyde. Part I. Interaction of glutaraldehyde with the amino groups of 6-aminohexanoic acid of  $\alpha$ -N- acetyl-lysine. *J. C. S. Perkin I*, 958 - 962.
- Hasal, P.; Vojtíšek, W.; Cejková, A; Kleczek, P.; Kofronová, O. (1992). An immobilized whole yeast cell biocatalyst for enzymatic sucrose hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 221 - 229.



- Hayashi, R.; Moore, S.; Stein, W. (1973). Carboxypeptidase from yeast. Large scale preparation and the application to COOH-terminal analysis of peptides and proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 248 (7), 2296 - 2302.
- Heckley, R. (1978). Preservation of microorganisms. En: *Advances in Applied Microbiology*. Perlman, D. (Ed.). Academic Press: Nueva York, vol. 24, pp. 1 - 4.
- Heinemeyer, W.; Kleinschmidt, J.; Saidowsky, J.; Escher, C.; Wolf, D. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *The EMBO Journal* 10 (3), 552 - 562.
- Henley, J.; Sadana, A. (1989). Graphical determination of mean activation energy and standar deviation in a microheterogeneity model of enzyme deactivation. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 916 - 925.
- Herber, D.; Phipps, P.; Strange, P. (1971). Chemical analysis of microbial cells. En: Norris, J. y Ribbons, D (Eds.). *Methods in microbiology* Academic Press: Londres, vol. 5B pp. 210 - 344.
- Hien, N.; Fleet, G. (1983). Separation and characterization of six (1→3)-β-glucanases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 156 (3), 1204 -1213.
- Hilt, W; Wolf, D. (1992). MicroReview. Stress-induced proteolysis in yeast. *Molecular Microbiology* 6 (17), 2437 - 2442.
- Hocknull, M.; Lilly, M. (1990). The use of free and immobilized *Arthorobacter simplex* in organic solvent/aqueous 2-liquid-phase reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, (2), 148-153.
- Holzer, H. (1978). The proteolytic system in yeast during growth and sporulation. En: Bacila, Horecker, y Stoppani (Eds.). *Biochemistry and Genetics of Yeasts. Pure and Applied Aspects*. Academic Press: Nueva York. pp. 229 - 240.
- Hooijmans, C.; Geraats, S.; van Neil, E.; Robertson, L.; Heijnen, J.; Luyben, K.Ch. (1990). Determination of growth and coupled nitrification denitrification by immobilized thiosphaera-pantotropha using measurement and modeling of oxygen profiles. *Biotechnology and Bioengineering* 36, 931 - 936.

- Hough, J.; Maddox, I. (1970). Yeast autolysis. *Process Biochemistry* (Mayo), 50 - 52.
- Hunter, J. B.; Asenjo, J. A. (1987). Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells: II. A simple model of lysis kinetics. *Biotechnology and Bioengineering* 30, 481 - 490.
- Hunter, J. B.; Asenjo, J. A. (1988). A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering* 31, 929 - 943.
- Inchaurredo, V; Yantorno, O.; Voget, C. E. (1994). Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochemistry* 29, 47 - 54.
- Irvine, D; Hill, A. (1985). Cheese Technology. En: Blanch, H.; Drew, S.; Wang, D. (Eds.). *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press: Nueva York. vol. 3, pp. 523 - 566.
- Jansen, E.; Olson, A. (1969). Properties and enzymatic activities of papain insolubilized with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 129, 221 - 227.
- Jasper, H.; Christiansen, K.; van Steveninck, J. (1975). An improved method for the preparation of yeast enzyme *in situ*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 65 (4), 1434 - 1439.
- Jones, E. (1991). Minireview. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (13) 7963 - 7966.
- Joshi, M.; Gowda, L.; Katwa, L. Bhat, S. (1989). Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 439 - 443
- Kidby, D.; Davies, R. (1970). Invertase and disulphite bridges in the yeast wall. *Journal of General Microbiology* 61, 327 - 333.
- Kilara, A.; Shahani, K. (1985). Enzyme in food technology. En: Blanch, H.; Drew, S.; Wang, D. (Eds.). *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press: Nueva York, vol. 3, pp. 1045 - 1064.
- Klein J., Wagner, R. (1983). *Applied Biochemistry and Bioengineering*, vol. 4 Academic Press: Nueva York.

- Klein, J.; Vorlop, K. D. (1985). Immobilization techniques cells. En: Moo-Young, M. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology*, vol. 2, pp. 203 - 223. Academic Press: Nueva York.
- Korn, A.; Fearheller, S; Filachione, E. (1972). Glutaraldehyde: nature of the reagent. *Journal of Molecular Biology* 65, 525 - 529.
- Kosaric, N.; Asher, Y. (1985). The utilization of cheese whey and its components. En: Fiechter, A. (Ed.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Verlag: Heidelberg, vol. 32; pp. 25 - 60.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685.
- Laouar, L.; Mulligan, B.; Lowe, K. (1992). Yeast permeabilization with surfactants. *Biotechnology Letters* 14 (8), 719 - 720.
- Laurence, C.; Block, S. (1978). Antiseptics and disinfectants Part IV. Laurence C. y Block, S. (Eds.). *Desinfection, sterilization, and preservation*. Lea& Febiger: Filadelfia, pp. 237 - 504.
- Leao, C.; van Uden, N. (1984). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 774, 43 - 48.
- Lee, S.; Robinson, F; Wang, M. (1981). Rapid determination of cell viability. Third Symposium on Biotechnology in Energy Conservation and Production. En: Gaden E. (Ed.). *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, vol 11. J. Wiley and Sons: Nueva York. 641 - 650.
- Lencki, R.; Arul, J.; Neufeld, R. (1992). Effect of subunit dissociation , denaturation, aggregation, coagulation, and decomposition on enzyme inactivation kinetics: I. First-order behaviour. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 1421 - 1426.
- Lohr, D. (1988). Isolation of yeast nuclei and chromatic for studies of transcription-related processes. En: Campbell, I, Duffus, J. (Eds.) *Yeast a practical approach*. Airl Press: Oxford, cap. 6, 125 - 145.
- Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 256 - 275.

- Mahoney R; Whitaker, J. (1978). Purification and physicochemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *K. fragilis*. *Journal of Food Science* 43, 584 - 591.
- Mahoney R.; Adamchuck, S. (1980). Effect of milk constituents on the hidrolysis of lactose by lactase from *K. fragilis*. *Journal of Food Science* 45, 962 - 964.
- Mahoney, R.; Nickerson, T.; Whitaker, J. (1975). Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactose from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Dairy Science* 58, 1620 - 1629.
- Margel, S.; Rembaum, A. (1980). Synthesis and characterization of poly(glutaraldehyde). A potential reagent for protein immobilization and cell separation. *Macromolecules* 13, 19 - 24.
- Matile, P.; Moor, H.; Robinow, F. (1969). Yeast cytology. En: Rose, A. y Harrison, J. (Eds.). *The Yeast*. Academic Press: Londres, vol. 1, pp. 220 - 297.
- Merchuk, J. (1990). Why use air-lift bioreactors?. *Trends in Biotechnology* 8, 66 - 71.
- Michiko, I. (1978). Degradation of lipids in yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) at the early phase of organic solvent-induced autolysis. *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (2), 247 - 251.
- Moersen, A.; Rehm, H. (1990). Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35, 662.
- Mozaffar, Z.; Nakanishi, K.; Matsumo, R. (1988). Production of oligasaccharides by glutaraldehyde treated and immobilized beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biotechnology Letters* 10 (11), 805 - 808.
- Murakami, K.; Nagura, H; Yoshino, M. (1980). Permeabilization of yeast cells: Aplication to study on the regulation of AMP deaminase activity *in situ*. *Analytical Biochemistry* 105, 407 - 413.
- Nobel, J.; Dijkers, C.; Hooijberg, E.; Klis, F. (1989). Increased cell wall porosity in *Saccaromyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. *Journal of General Microbiology* 155, 2077 - 2084.

- Novaes-Ledieu, M.; Garcia Mendoza, C. (1970). Biochemical studies on walls synthesized by *Candida utilis* protoplasts. *Journal of General Microbiology* 61, 335 - 342.
- Nowak, J.; Tsai, H. (1988). The yeast aminopeptidase Y. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 118 - 124.
- Ohmiya, K.; Ohashi, H.; Kobayashi, T.; Shimizu, S. (1977). Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 33, (1), 137 - 146.
- Pastore, M.; Morisi, F. Lactose reduction of milk by fiber-entrapped  $\beta$ -galactosidase. Pilot-plant experiment. En: *Methods in Enzymology*. 822 - 830.
- Peterson, R.; Hill, C.; Amundson, C. (1989). Effect of temperature on the hydrolysis of lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase in a capillary bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 429 - 437.
- Prabhune, A.; Rao, B.; Pundle, A.; SivaRaman, H. (1992) Immobilization of permeabilized *Escherichia coli* cells with penicillin acylase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 161 - 163.
- Prenosil, J.; Stuker, E.; Bourne, J. (1987a). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis. Part I: State of Art. *Biotechnology and Bioengineering* 30, 1019 - 1025.
- Prenosil, J.; Stuker, E.; Bourne, J. (1987b). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis process. Part II: Experimental. *Biotechnology and Bioengineering* 30, 1026 - 1031.
- Reed, G. R.; Pepler, H. J. (1973). Feed and food yeast En: *Yeast technology* AVI Publishing Co., Inc., Westport, Connecticut, pp. 328 - 354.
- Richard, F.; Knowles, J. (1968). Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *Journal of Molecular Biology* 37, 231 - 233.
- Richmond, M. L.; Gray, J.; Stine, C. M. (1981).  $\beta$ -galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *Journal of Dairy Science* 64, 1759 -1771.
- Rouwenhorst, R. J.; Prork, J.; van Dijken, J. (1989). The Discovery of  $\beta$ -galactosidase. *Trends in Biochemical Science* 14, 416 - 418.

- Rouwenhorst, R. J. (1990). Production and localization of inulinases in *Kluyveromyces* yeasts. Ph.D. Thesis Technische Universitat Delft, Delft, Holanda.
- Ruch, J.; Johnson, J. (1956). Determination of aldehyde by mercurimetric oxidation. *Analytical Chemistry* 28 (1), 69 - 71.
- Saheki, T.; Holzer, H. (1974). Comparison of the tryptophan synthase inactivating enzyme with proteinases from yeast. *European Journal of Biochemistry* 42, 621 - 626.
- Salton, M. (1963). The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain. *Journal of General Microbiology* 303, 223 - 235.
- Sarath, G.; de la Motte, R.; Wagner, F. (1989). Protease assay methods. En: Beynon, R. y Bond, J. (Eds.). *Proteolytic enzymes a practical approach*. Oxford University Press: Nueva York, pp. 25 - 54.
- Scherrer, R.; Lowden, L.; Gerhardt, P. (1974). Porosity of the yeast cell wall and membrane. *Journal of Bacteriology* 118 (2), 534 - 540.
- Schewencke, J. (1981). Measurement of proteinase B activity in crude extracts: A novel procedure of activation using pepsin. *Analytical Biochemistry* 118, 315 - 321.
- Serrano, R.; Gancedo, J.; Gancedo, C. (1973). Assay of yeast enzyme *in situ*. A potential tool in regulation studies. *European Journal of Biochemistry* 34, 479 - 482.
- Shukla, H.; Chaplin, M. (1993) Noncompetitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*A. oryzae*) by galactose. *Enzyme Microbial Technology* 15, 297 - 299.
- Slaughter, J.; Nomura, T. (1992). Autocatalytic degradation of proteins in extracts of a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The role of endoproteinases and exopeptidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 638 - 642.
- Suárez-Rendueles, P.; Villa, L.; Arbesú, M. J.; Escudero, B. (1991) The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiology Letters* 81, 215 - 220.
- Suriyarachchi, V.; Fleet, G. (1981). Occurrence and growth of yeasts in yogurts. *Applied and Environmental Microbiology* 42 (3), 574 - 579.

- Ukeda, H.; Miyazaki, E.; Matsumoto, K; Osayima, Y. (1986). Application of glutaraldehyde to amperometric determination of protein in dairy products. *Analytical Chemistry* 58 (14), 2975 - 2978.
- Ukeda, H.; Nakazono, Y.; Matsumoto, K; Osayima, Y. (1991). Amperometric determination of amino group on a solid support using glutaraldehyde. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 948 - 951.
- van Hugh, N.; Declaire, M. (1985). *In situ* activation of  $\beta$ -galactosidase of *Kluyveromyces fragilis* resting cells by sodium and potassium phosphate and chlorides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21, 390 - 393.
- Vlach, D.; Prenosil, J. (1984). Yeast cells with high  $\beta$ -galactosidase activity and their immobilization. *Journal of Molecular Catalysis* 26, 173 - 185.
- Voget, C.; Flores, M.; Faloci, M.; Ertola, R. (1994). Effects of the ionic environment on the stability of yeast  $\beta$ -galactosidase. *Food Science and Technology*. En prensa.
- Vojtíšek, V. (1989). Immobilized microbial cell aggregates for biotransformation of antibiotics, aminoacids, sugars, and other compounds. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 11, 1 - 10.
- Watson, K. (1987). Temperatura relations. En: Rose, A. y Harrison, J. (Eds.) *The Yeast*. Londres: Academic Press, vol. 2, pp. 41-66.
- Weckström, L.; Linko, Y.; Linko, P. (1980). Entrapment of whole cell yeast  $\beta$ -galactosidase in precipitated cellulose derivatives. *Food Process Engineering* [Proc. Int. Congr.] 2<sup>nd</sup>, vol. 2 p. 148.
- Workman, W.; Day, D. (1984). Enzymatic hydrolysis of inulin to fructose by glutaraldehyde fixed cells. *Biotechnology and Bioengineering* 26, 905 - 910.
- Yabannavar, V; Wang, D. (1991) Analysis of mass transfer for imobilized cells in a extractive lactic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 544 - 550.
- Yang, S.; Okos, M. (1989). A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 763 - 773.
- Zavoico, G.; Kutchai, H. (1980). Effects of n-alkanols on the membrane fluidity of chick embryo heart microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 600, 263 - 269.