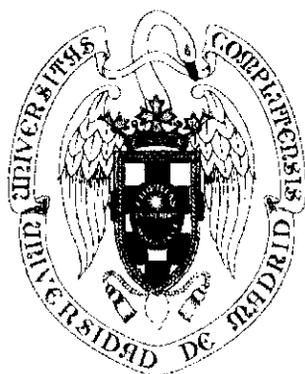


Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Ingeniería Química



X-53-381792-7

Hidrólisis de lactosa con β -galactosidasas de
Kluyveromyces fragilis y de *Escherichia coli*.

Memoria que para optar al
Grado de Doctor en Ciencias Químicas
presenta:

Miguel Ladero Galán

Madrid, 1999



A mis padres y a Esther

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Profesor Dr. D. Félix GARCÍA-OCHOA SORIA y de la Profesora Dra. D. Aurora SANTOS LÓPEZ, de quienes siempre he recibido consejo, amistad y saber y a quienes quiero expresar mi más profundo agradecimiento y cariño.

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y apoyado a lo largo de todos estos años:

Al Dr. José Luis García López, su eterna buena disposición, traducida en amenas charlas, consejos sabios y el haber puesto siempre a mi disposición instrumental que yo necesitara para llevar a buen puerto mi investigación. Además, me ha proporcionado una de las enzimas cuyo estudio forma parte de este trabajo.

Al Profesor Dr. Pedro Luis y Luis, sus consejos y el buen ánimo que siempre me ha transmitido, ya desde que empecé a formarme en los conocimientos de la Ingeniería Química, de lo cual ya hace once años.

Al Profesor Dr. José Antonio Casas de Pedro, siempre al lado para enseñarme cuando era menester, especialmente el uso del cromatografo H.P.L.C. y los trucos precisos para mantenerlo en buen uso. También quiero agradecerle su amistad y compañerismo.

Al Profesor Dr. Arturo Romero Salvador, los conocimientos sobre catálisis y reactores cuando yo estudiaba y las oportunidades de enseñarlos, menester que me es querido, cuando ha sido preciso.

A José Timón, por acudir en mi socorro cuando cualquier aparato precisaba de su conocimiento técnico y de sus hábiles manos para seguir vivo y útil; por toda la ayuda prestada y por su buen humor y su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Teresa, Irene, Ana, Angel, Juan, Blanca, Almudena, José Carlos, Virginia, Pedro, Vicky, Emilio y tantos otros que han formado parte de nuestro grupo y en quienes siempre encontré y encuentro afecto y apoyo. A los compañeros del C.S.I.C.: Alejandro y Estrella, con quienes he compartido enzima y charlas.

A todos mis profesores, por el cariño que han puesto en formarme y, además, muchas veces, simplemente por su cariño.

A la Comunidad Autónoma de Madrid, por concederme una beca de Formación de Personal Investigador, y a la Universidad Complutense, con la que me liga actualmente mi puesto de Profesor Ayudante. Con este apoyo, ambas instituciones me han permitido acometer la realización de esta Tesis.

A Novo Nordisk Ltd., por su generosa donación del preparado comercial Lactozym, que contiene la enzima de *Kluyveromyces fragilis*, y por toda la información facilitada.

A mis padres, por todo el amor que han puesto en mi persona en cada instante de mi vida, que es lo que ha hecho posible estar donde estoy ahora y ser quien soy.

A mis hermanos, con quienes he compartido tantos años de vida, por el cariño que nos profesamos.

A Esther, que siempre ha estado a mi lado en los momentos difíciles y también en las alegrías y que ha hecho que cambiase mi vida entera. Las palabras son, a veces, instrumentos romos para expresar el amor que uno siente por una persona y, desde luego, esta es una de tales ocasiones.

A Pedro y a Esther, por la generosidad y bondad de la que siempre han hecho gala para conmigo.

A todas las personas cuya amistad y cariño han sido y son un motor que me impulsa a vivir.

*He andado muchos caminos,
he abierto muchas veredas;
he navegado en cien mares
y atracado en cien riberas.*

*En todas partes he visto
caravanas de tristeza,
soberbios y melancólicos
borrachos de sombra negra,*

*y pedantones al paño
que miran, callan, y piensan
que saben, porque no beben
el vino de las tabernas.*

*Mala gente que camina
y va apostando la tierra...*

*Y en todas partes he visto
gentes que danzan o juegan,
cuando puedan, y laboran
sus cuatro palmos de tierra.*

*Nunca, si llegan a un sitio,
preguntan adónde llegan.
cuando caminan, cabalgan
a lomos de mula vieja,*

*y no conocen la prisa
ni aún en los días de fiesta.
donde hay vino, beben vino;
donde no hay vino, agua fresca.*

*Son buenas gentes que viven,
laboran, pasan y sueñan,
y en un día como tantos
descansan bajo la tierra.*

*Antonio Machado
Soledades*

Capítulo 1.- Introducción

1.1.- Enzimas: los catalizadores biológicos	1
1.2.- Fenomenología de las reacciones enzimáticas	9
1.3.- β -galactosidasas	18
1.3.1.- Fuentes de β -galactosidasas	18
1.3.2.- Mecanismo de acción de β -galactosidasas	23
1.4.- Hidrólisis de lactosa	27
1.5.- Objeto y alcance del trabajo	33

Capítulo 2.- Procedimiento experimental

2.1.- Enzimas empleadas	36
2.1.1.- Lactozym	36
2.1.2.- β -galactosidasa de <i>E. coli</i>	37
2.2.- Experimentación con enzima en disolución	39
2.2.1.- Equipos e instalaciones	39
2.2.2.- Materiales y reactivos	42
2.2.3.- Métodos de análisis	43
2.2.4.- Desarrollo de los experimentos	49
2.3.- Experimentación con enzima inmovilizada	50
2.3.1.- Equipos e instalaciones	50
2.3.2.- Materiales y reactivos	57
2.3.3.- Métodos de análisis	60
2.3.4.- Desarrollo de los experimentos	68

Capítulo 3.- Cinética de las reacciones de hidrólisis con las enzimas en disolución

3.1.- Introducción	78
3.1.1.- Mecanismos de acción enzimática	78
3.1.2.- Modelos cinéticos propuestos para las reacciones de hidrólisis con β -galactosidasas	91
3.1.3.- Métodos de discriminación de modelos y determinación de parámetros cinéticos	101

3.2.- Modelos cinéticos de las reacciones de hidrólisis con β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces fragilis</i> en disolución	113
3.2.1.- Experimentos previos	113
3.2.2.- Modelo cinético de la reacción de hidrólisis de lactosa	124
3.2.3.- Modelo cinético de la reacción de hidrólisis de ONPG	171
3.3.- Modelos cinéticos de las reacciones de hidrólisis con β -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i> en disolución	200
3.3.1.- Experimentos previos	200
3.3.2.- Modelo cinético de la hidrólisis de lactosa	205
3.3.3.- Modelo cinético de la hidrólisis de ONPG	220
3.4.- Comparación de las dos enzimas en disolución	241
3.4.1.- Actividad y estabilidad	241
3.4.2.- Modelo cinético de la hidrólisis de lactosa	246
3.4.3.- Modelo cinético de la hidrólisis de ONPG	248
 Capítulo 4.- Cinética de las reacciones de hidrólisis con las enzimas inmovilizadas	
4.1.- Introducción	251
4.1.1.- Inmovilización de enzimas	252
4.1.2.- Inmovilización de β -galactosidasas	268
4.2.- Modelos cinéticos de las reacciones de hidrólisis con β -galactosidasa de <i>Kluyveromyces fragilis</i> inmovilizada	276
4.2.1.- Selección de las condiciones de inmovilización	276
4.2.2.- Experimentos previos	292
4.2.3.- Modelo cinético de la reacción de hidrólisis de lactosa	302
4.2.4.- Modelo cinético de la reacción de hidrólisis de ONPG	319
4.2.5.- Comparación de la enzima de <i>K. fragilis</i> en disolución e inmovilizada	339
4.3.- Modelos cinéticos de las reacciones de hidrólisis con β -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i> inmovilizada	347
4.3.1.- Experimentos previos	347
4.3.2.- Modelo cinético de la reacción de hidrólisis de lactosa	353
4.3.3.- Modelo cinético de la reacción de hidrólisis de ONPG	370
4.3.4.- Comparación de la enzima de <i>K. fragilis</i> en disolución e inmovilizada	392

4.4.- Comparación de las dos enzimas inmovilizadas	400
4.4.1.- Actividad y estabilidad	400
4.4.2.- Modelo cinético de la hidrólisis de lactosa	404
4.4.3.- Modelo cinético de la hidrólisis de ONPG	405
Capítulo 5.- Reacción-difusión con enzima inmovilizada	
5.1.-Introducción	407
5.2.-Fenómenos presentes en reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas	411
5.2.1.- Efectos de partición y conformacionales	411
5.2.2.- Limitaciones difusionales externas	412
5.3.- Mecanismos de difusión de líquidos a través de capilares	414
5.4.- Determinación experimental del coeficiente de difusión efectivo	418
5.4.1.- Determinación de D_e en condiciones inertes	418
5.4.2.- Determinación de D_e en presencia de reacción química	424
5.5.- Representación de la estructura porosa y factor de corrección estructural	429
5.6.- Determinación de la distribución de enzima en el soporte	432
5.7.- Resultados experimentales	436
5.7.1.- Distribución de la enzima	437
5.7.2.- Difusión interna en ausencia de reacción química	445
5.7.3.- Difusión interna en presencia de reacción química	460
5.8.- Discusión	473
Capítulo 6.- Estabilidad de la enzima de <i>K.fragilis</i> inmovilizada	
6.1.- Introducción	479
6.1.1.- Mecanismos de desactivación de enzimas	483
6.1.2.- Modelización de la desactivación de enzimas	490
6.2.- Modelo cinético de la desactivación de la β -galactosidasa de <i>K.fragilis</i> en disolución	507
6.2.1.- Discriminación del modelo cinético de desactivación	507

6.2.2.- Simulación de reactores tanque en discontinuo y continuo con desactivación	514
6.3.- Modelo cinético de la desactivación de la β -galactosidasa de <i>K. fragilis</i> inmovilizada	516
6.4.- Comparación de los modelos de desactivación de la enzima libre y de la inmovilizada	523
6.5.- Reacciones de hidrólisis de lactosa en un BSTR con β -galactosidasa de <i>K. fragilis</i> inmovilizada en condiciones de desactivación y su simulación	525
6.5.1.- Experimentos previos	526
6.5.2. Hidrólisis de lactosa en continuo	531
Capítulo 7.- Resumen y Conclusiones	
7.1.- Resumen	537
7.2.- Conclusiones	549
Capítulo 8.- Nomenclatura	564
Capítulo 9.- Bibliografía	571

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- ENZIMAS: LOS CATALIZADORES BIOLÓGICOS

Las enzimas son proteínas con acción catalítica sobre determinados compuestos llamados sustratos. De hecho, las enzimas son los catalizadores de las reacciones que tienen lugar en los sistemas biológicos, aunque hay otras moléculas de carácter proteico (anticuerpos) y no proteico (RNA) que pueden tener una acción catalítica, aunque mucho menor que en el caso de las enzimas (Cornish-Bowden, 1995).

Las cadenas proteicas de las enzimas pueden tener de 100 a 2500 aminoácidos. Algunas enzimas no requieren ningún otro componente, además del sustrato, para ser activas. Sin embargo, otras enzimas requieren un componente no proteico para desarrollar su actividad, este componente se denomina **cofactor**. Los cofactores pueden ser iones metálicos o compuestos orgánicos que, por ejemplo, en el cuerpo humano, son derivados de las vitaminas B. Los cofactores que se unen firmemente a la enzima se denominan **grupos prostéticos**. Al conjunto de enzima y cofactor o grupo prostético se le llama **holoenzima** (que es la forma activa), pero cuando el cofactor se separa, a la proteína restante se la denomina **apoenzima** (y es inactiva).

La actividad de alguna enzima puede controlarse a través de rasgos característicos de su estructura molecular, ya que se ha encontrado que cierto número de enzimas diferentes existen en múltiples formas moleculares dentro de una misma especie o aún dentro de una misma célula (Price y Stevens, 1989). Las formas múltiples dentro de una especie o célula se llaman **isoenzimas**, y difieren unas de otras en la secuencia de aminoácidos, algunas

modificaciones covalentes tales como la fosforilación, y cambios conformacionales. Las isoenzimas también difieren unas de otras en sus características y comportamiento como catalizadores.

Al ser las enzimas proteínas, su acción catalítica está muy marcada por el carácter polimérico de su estructura química. El conocimiento de dicha estructura es muy útil para determinar, en parte, cómo transcurre la acción catalítica. Las técnicas de mutagénesis dirigida permiten conocer con exactitud los aminoácidos que son esenciales en la acción catalítica, mientras que la observación por RMN permite el estudio de la unión enzima-sustrato y de la posible dinámica de la transformación. Sin embargo, quedan muchos estudios que realizar antes de establecer claramente la relación estructura-funcionalidad, ya que todavía ni siquiera se puede predecir con exactitud el plegamiento de una proteína conocida su secuencia de aminoácidos. Naturalmente, en este camino, las aproximaciones son varias: por un lado se estudian las propiedades catalíticas de las enzimas, determinando el mecanismo de las reacciones catalizadas y los parámetros de las ecuaciones que se derivan de ellos, por otra parte, se llevan a cabo estudios estructurales que determinan las secuencias de aminoácidos (estructura primaria), sus plegamientos iniciales en hélices o láminas (estructura secundaria) y sus plegamientos finales que llevan a la conformación más estable en las condiciones ambientales reinantes (estructura terciaria y cuaternaria), dando lugar a lo que se conoce como estructura nativa o de menor energía libre de Gibbs. Las dos aproximaciones son clásicas en otros campos de investigación de la Química y llevan a conclusiones compartidas que mejoran el conocimiento que se tiene sobre la acción de las enzimas. No obstante, se debe considerar que la acción de una molécula compleja, como es una enzima, ha de ser compleja a su vez, si se compara con la acción de otros catalizadores más sencillos desde el punto de vista químico.

Las enzimas son catalizadores muy activos, multiplicando por un factor de 10^3 a 10^9 la velocidad de la reacción sin catalizar. Además, son catalizadores muy selectivos o específicos, tanto más cuanto más importante es el control de su acción biológica. Esta selectividad se refiere tanto al tipo de reacción catalizada como al sustrato o sustratos sobre los que se ejerce la acción catalítica. Para el caso de enzimas cuya acción es menos controlada, pueden catalizar una reacción y su inversa, dependiendo de las condiciones

físicoquímicas del medio de reacción, y, además, pueden actuar sobre sustratos similares entre sí, no necesariamente isómeros. Otras enzimas, sin embargo, son capaces de discernir entre dos estereoisómeros y de catalizar exclusivamente una reacción concreta de uno de ellos.

Existen varios tipos de enzimas, según el tipo de reacción que catalizan (Chaplin y Bucke, 1997):

Oxidoreductasas: catalizan reacciones en las que se dan transferencia de electrones, hidrógeno u oxígeno. Incluye las dehidrogenasas, las oxidasas, las oxigenasas y las peroxidasas.

Transferasas: catalizan la transferencia de una molécula a otra de un átomo o grupo de átomos, con exclusión de los que son catalizados por hidrolasas u oxidoreductasas.

Hidrolasas: catalizan la transferencia de moléculas de agua. Son las enzimas con más aplicaciones actualmente.

Liasas: enzimas que favorecen la eliminación de un grupo de átomos de una molécula (no hidrolasas); incluyen las aldolasas, las decarboxilasas, las deshidratasas y algunas pectinasas.

Isomerasas: catalizan las isomerizaciones y se dividen en epimerasas, racemasas y transferasas intramoleculares.

Ligasas: también se llaman sintetasas y, con el uso de la energía de un nucleósido trifosfatado, favorecen la formación de enlaces covalentes entre moléculas.

Las enzimas se nombran de diversas maneras. Existen nombres tradicionales y no sistemáticos, como renina o quimosina, otros hacen referencia al sustrato natural con la terminación **-asa** (lactasa), otra nomenclatura hace referencia a la reacción y al sustrato con la misma terminación (p.e. lactosa hidrolasa) y, por último, se ha establecido una

nomenclatura por números que hacen referencia al tipo de enzima (liasa, p.e.), al sustrato o sustratos o tipo de enlace sobre el que actúa, al tipo de partículas, átomos, iones, moléculas... que se manejan en la reacción y a un número de enzima, si hay otras enzimas con la misma actividad (Price y Stevens, 1989). Así, la histidasa también se llama, sistemáticamente, L-histidina amoniaco liasa o EC 4.3.1.3.

Considerando su aplicación en procesos químicos, las enzimas tienen una serie de inconvenientes: son estructuralmente frágiles, lo que influye notablemente en su estabilidad como catalizadores, son complejas químicamente, lo que dificulta su conocimiento y la aplicación del mismo y, en muchos casos, son muy difíciles de extraer, lo que conlleva unos precios elevados y una baja disponibilidad. Hay otra característica que hace más difícil el entendimiento de los mecanismos de acción enzimática a nivel molecular: la existencia de enzimas que sólo son activas en presencia de cofactores o de coenzimas, moléculas que pueden actuar en la unión de los sustratos a la enzima, además de poder actuar ellos mismos como catalizadores, intercambiando densidad electrónica con los sustratos. Todos estos inconvenientes están siendo abordados y, de una u otra forma, resueltos, con lo que cabe esperar que, según aumenten los conocimientos científicos y técnicos sobre las enzimas, se diversifique su uso, actualmente restringido a los campos alimentario, farmacéutico, analítico y médico a otros campos como la petroquímica y a la química orgánica sintética, que implican el uso del catalizador en ambientes hidrófobos, lo que, además, potenciaría su utilización en la síntesis de fármacos.

La acción catalítica de las enzimas se desarrolla, como mínimo, en tres pasos: inicialmente la enzima y el sustrato o sustratos se unen, luego se produce una recombinación electrónica, que es la propia reacción química, para, finalmente, separarse la enzima del producto o productos. Mecanísticamente, hay aminoácidos implicados en cada una de las etapas del proceso.

En la unión están implicados varios aminoácidos y, a veces, el cofactor o coenzima. El hecho de que las interacciones enzima-sustrato se reduzcan a puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, puentes hidrofóbicos y, sólo si intervienen iones metálicos, fuerzas iónicas (de naturaleza más fuerte) indica que hacen falta de hecho

muchas interacciones para conseguir una unión suficientemente fuerte. La disposición de los aminoácidos es esencial para que se consiga esta fuerza de unión. Normalmente, los centros activos suelen ser huecos en la estructura polimérica donde quedan “atrapados” los sustratos. Para explicar la unión, se han utilizado varios modelos. Inicialmente, se supuso que la unión era similar a la que hay entre una llave y una cerradura, lo cual implica un inmovilismo estructural obvio. Posteriormente, se introdujo la idea de que la enzima puede modificar su estructura para unirse al sustrato, al menos, ligeramente, con lo que hay cierto dinamismo en la unión. El proceso de unión es reversible.

Una vez se produce la unión, la enzima actúa sobre los sustratos favoreciendo el intercambio electrónico necesario para la reacción. Esto implica que se necesita menos energía para llegar a un estado transitorio desde el cual sea posible que se formen los productos. En este proceso, la enzima puede actuar como donante o aceptor de densidad electrónica. Todos los procesos que ocurren en esta etapa suelen ser reversibles. Hay casos en los que, cuando se obtienen los productos, éstos suelen tener una entalpía menor que la de los sustratos de partida, con lo que el paso de productos a sustratos está más dificultado (un caso típico son las hidrólisis enzimáticas). Sin embargo, hay varias reacciones enzimáticas en las que el paso a productos no es irreversible, sino que también está en equilibrio con las etapas anteriores (un caso típico son las reacciones de síntesis). Las enzimas, como catalizadores que son, aceleran las reacciones químicas. La teoría de la catálisis enzimática encierra tres aspectos, que condicionan su desarrollo:

- (1) Los sustratos deben colisionar o entrar en contacto con la enzima.
- (2) La colisión molecular ocurre con una orientación adecuada.
- (3) Los reactivos deben poseer la energía suficiente para que se produzca la reacción.

Esta energía se denomina energía de activación, que, según la teoría más aceptada, disminuye cuando se produce la catálisis enzimática (Figura 1.1), aumentando la probabilidad de una orientación adecuada de los reactivos (Blanch y Clark, 1995).

En un primer momento, los reactivos se encuentran en un estado inicial cuyo contenido energético es mínimo, y por tanto, es el más estable. A medida que los reactivos se aproximan y empieza a producirse la reacción química, la energía del sistema

aumenta hasta alcanzar un máximo; a esta etapa se la conoce como estado de transición de la reacción. Las enzimas disminuyen la energía de ese máximo (energía de activación) mediante la formación del complejo enzima-sustrato. La enzima distorsiona la conformación inicial del sustrato y la transforma en la del estado de transición, debido a que aparecen interacciones favorables de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas entre la enzima y su sustrato, con lo que se consigue una interacción más fuerte entre ambos. Como consecuencia, disminuye la energía de activación, lo que se traduce en un aumento de la velocidad de reacción. En la Figura 1.1 se muestra el transcurso de la acción catalítica de las enzimas, comparado con el de una reacción no catalítica y en la Figura 1.2 se representa esquemáticamente la formación del complejo enzima-sustrato según los modelos de adaptación inducida y de llave-cerradura (Stryer, 1985).

La formación del complejo enzima-sustrato supone que al unirse el sustrato a la enzima disminuye su movilidad, disminuyendo su entropía y, por tanto, la diferencia de entropía entre los reactivos y los productos es menor, la energía de activación se reduce y la reacción transcurre a mayor velocidad. El sustrato se une a la enzima en el llamado centro activo. Este es una pequeña hendidura o bolsillo de la enzima donde el agua suele quedar excluida, excepto si es uno de los compuestos que intervienen en la reacción, y donde están los aminoácidos que se unen el sustrato y que llevan a cabo la catálisis. La rotura subsiguiente del complejo para liberar los productos se considera exotérmica, y esta etapa puede ser prácticamente irreversible en muchos casos.

La catálisis se produce por varios mecanismos, entre los que destacan la aproximación, la catálisis covalente y la catálisis general ácida o básica. Otros mecanismos que pueden estar implicados son: la catálisis electrostática, la catálisis por iones metálicos y los efectos de tensión y distorsión de sustratos provocados por la enzima en el centro activo. El mecanismo de aproximación se basa en que la enzima junta los sustratos en el centro activo en concentraciones altas y en la orientación adecuada, favoreciendo su intercambio. La catálisis covalente es debida a la formación de un intermedio de este tipo en el centro activo: las catálisis nucleófila y electrófila son dos ejemplos de este mecanismo. Los aminoácidos en el centro activo pueden actuar como ácidos o bases, cediendo o aceptando protones del sustrato.

La utilización práctica de las enzimas se ha realizado desde hace siglos, ya que son los catalizadores que utilizan los microorganismos en procesos fermentativos, que han sido empleados por el hombre desde tiempos prehistóricos. La utilización asociada al conocimiento de su naturaleza y de su función es mucho más reciente. Desde principios de siglo se ha diversificado el empleo de enzimas, pues comenzó siendo importante el uso de proteasa alcalina en detergentes y actualmente las enzimas se emplean en campos tan diversos como la alimentación, la industria farmacéutica, la industria química y en aplicaciones analíticas y ambientales. El mayor conocimiento de la química de las proteínas está aumentando el empleo de enzimas, creando nuevas aplicaciones, como la síntesis de nuevas especialidades farmacéuticas, la asociación de enzimas y electrónica en los llamados biosensores y el empleo de enzimas en la industria alimentaria como innovadoras de antiguos procedimientos, como el malteado, o creadoras de nuevos productos, como el jarabe rico en fructosa procedente del procesado enzimático del almidón. Algunas de las aplicaciones industriales más importantes de las enzimas quedan recogidas en la Tabla 1.1.

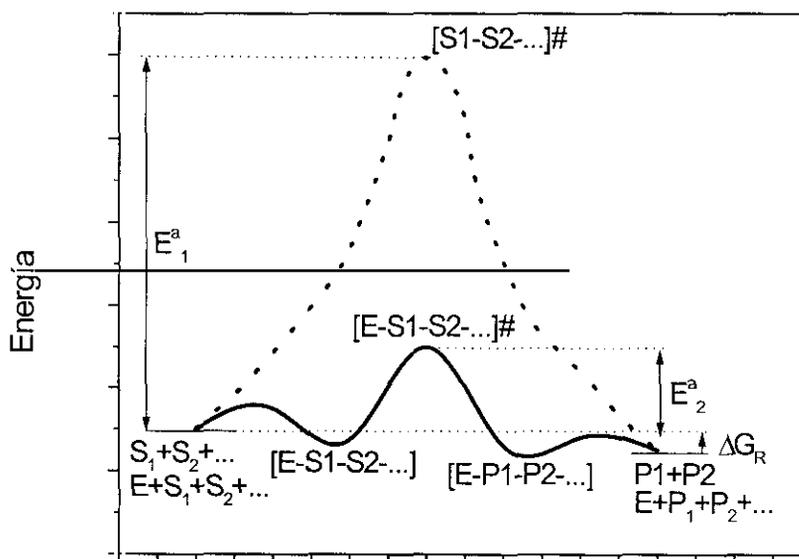
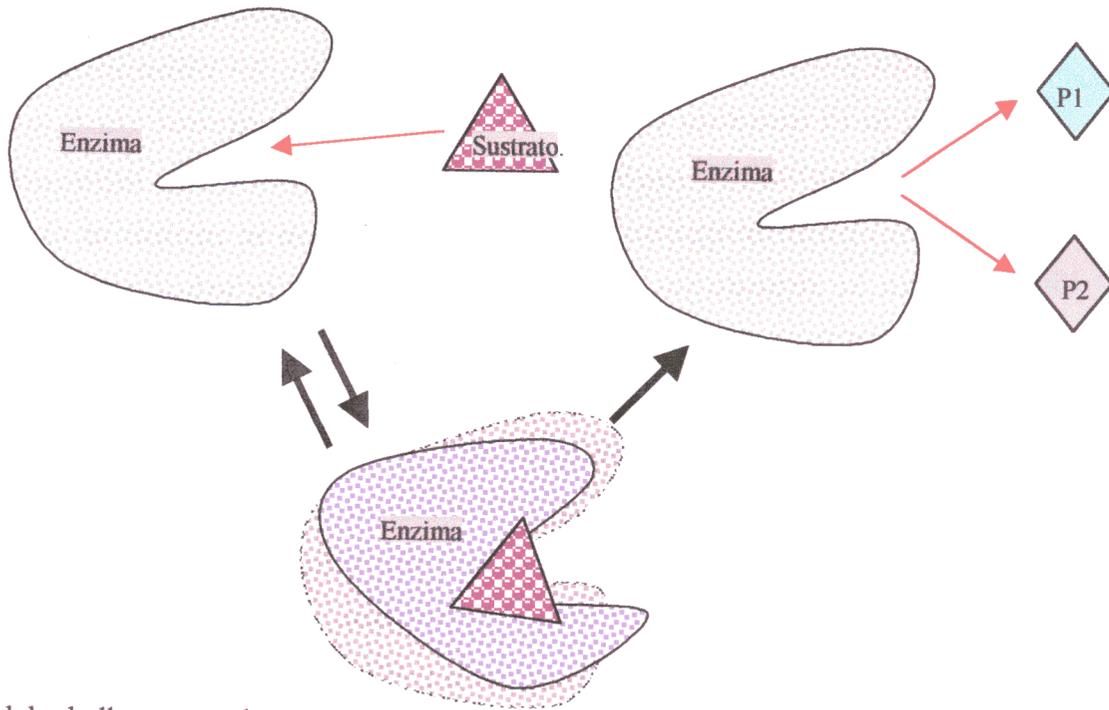


Figura 1.1.- Transcurso termodinámico de la catálisis enzimática comparada con una reacción no catalizada.

a) Modelo de adaptación inducida:



b) Modelo de llave-cerradura:

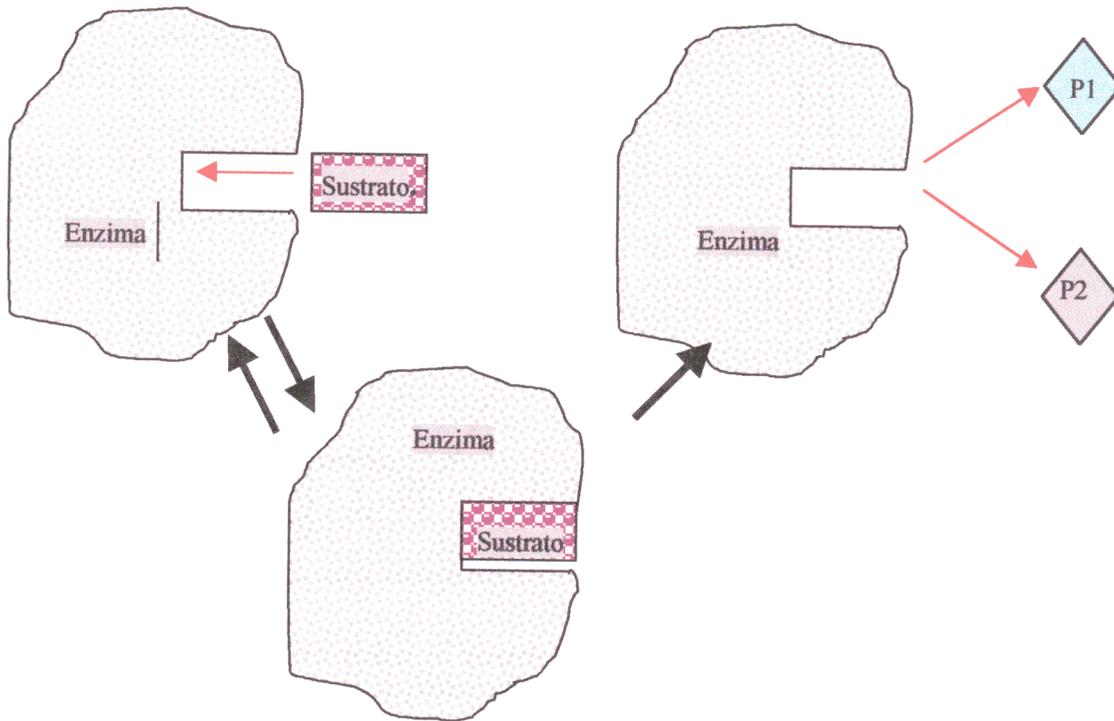


Figura 1.2.- Formación y desaparición del complejo enzima-sustrato.

Tabla 1.1.- Algunas aplicaciones actuales de las enzimas.

APLICACIONES INDUSTRIALES		
Producto	Enzima	Reacción
Acrilamida	Nitril hidratasa fijada en células	Hidrólisis de acrilonitrilo a acrilamida
Aspartamo	Termolisina (soluble o inmovilizada)	Unión estereoespecífica de péptidos en agua
Jarabe de fructosa (HFCS)	Amilasas solubles en tanque agitado y xilosa isomerasas en reactores de lecho fijo	Hidrólisis de almidón a glucosa y posterior isomerización de esta a fructosa
6-APA	Penicilina acilasa inmovilizada en partículas de polímero	Hidrólisis quimioselectiva de ácido fenilacético en penicilina G
L-tert-leucina	Leucina dehidrogenasa soluble junto con formato dehidrogenasa en un reactor con membrana de ultrafiltración	Aminación reductora enantioespecífica de ácido alfa-ceto con formato amónico
L-aminoácidos	Acilasa inmovilizada en reactores de lecho fijo	Hidrólisis L-específica de N-acetil amida
APLICACIONES TERAPEUTICAS		
Dolencia	Enzima	Reacción
Falta de ureasa	Ureasa inmovilizada sobre carbón activo	Eliminación de urea de la sangre
APLICACIONES ANALÍTICAS		
Tubos reactores	Tubo de nylon impregnado internamente con una o más enzimas (glucosa oxidasa, ureasa, uricasa)	
Sondas bioanalíticas	Enzima inmovilizada sobre un sensor electroquímico (medida de glucosa, ácido láctico, colesterol, etanol, etc)	
Reactivos en fase sólida	Sistemas enzimáticos inmovilizados sobre un adsorbente que cambian de color en presencia del analito	

1.2.- FENOMENOLOGIA DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

Los fenómenos que se producen durante la catálisis enzimática dentro del centro activo han sido someramente explicados en el punto 1.1. Para la gran mayoría de las enzimas que se aplican en la práctica, la cinética enzimática se explica mediante el mecanismo de Michaelis-Menten, mientras que mecanismos más complicados son necesarios para explicar la acción de las enzimas metabólicas que requieren un mayor control que el sugerido por el mecanismo de Michaelis-Menten. Este control es debido a pequeñas moléculas orgánicas que actúan como inhibidores o activadores de la acción de las enzimas alostéricas (Blanck y Clark, 1995). En el caso de las β -galactosidasas, el mecanismo de Michaelis-Menten es adecuado para explicar la cinética de las reacciones de hidrólisis y de transgalactosidación, puesto

que no se detecta inhibición o activación de un centro activo debido a la unión del sustrato a otro centro activo de la enzima.

Los fenómenos implicados en la acción de las enzimas son: la reacción química en sí, la transferencia de sustratos y productos del medio de reacción hacia o desde los centros activos de la enzima y la desactivación de dicha enzima con el tiempo de operación.

En el caso de una enzima en disolución, la velocidad a la que transcurre el proceso de transformación de los sustratos depende exclusivamente de los fenómenos de adsorción y catálisis que se dan en los centros activos de la enzima, es decir, de la velocidad de la reacción química, y de la desactivación de la propia enzima. La transferencia de sustratos del medio de reacción hacia el centro activo depende de la orientación de la propia enzima, puesto que no todas las moléculas de sustrato que difunden hacia la enzima tienen la orientación adecuada para ser transformadas, al igual que no todas las moléculas de reactivos en una reacción química chocan con la suficiente energía y orientación adecuada para formar los estados transitorios de reacción, según la teoría de colisiones. Estos hechos son los que determinan la velocidad de la reacción química en una reacción no catalítica. En las reacciones catalizadas por enzimas hay que considerar, además, que hay una unión previa de los sustratos al centro activo por adsorción y una liberación o desorción de los productos, etapas que pueden ser más lentas que la formación de los complejos de transición en el centro activo, que es la reacción química en sí.

La desactivación de la enzima es debida a la paulatina modificación estructural que sufre la enzima, que consiste en un desplegamiento reversible hacia otra forma todavía activa pero menos estable que la estructura nativa. Esta configuración más abierta puede evolucionar a otras configuraciones de la enzima más energéticas e inactivas. Esta evolución es reversible desde el punto de vista termodinámico, pero puede estar impedido el regreso a la forma activa por motivos cinéticos (Volkin y Klibanov, 1989).

La aplicación de enzimas en disolución es posible en muchos casos en los que se desea una acción catalítica determinada para una determinada transformación total. En estos casos, la enzima se utiliza en reactores discontinuos o se añade para que actúe durante un tiempo determinado. Así, por ejemplo, se utilizan las proteasas en la maduración de quesos, en el malteado y en la fabricación de pan. El empleo de enzimas libres también puede realizarse en procesos de transformación en continuo, pero la enzima se pierde al salir con los productos de reacción. Si se quiere recuperar la enzima o no es conveniente su presencia en el producto final, hay que separarla de la corriente de salida del reactor. Esto se logra mediante el uso de ultrafiltros, que separan la corriente de salida del reactor en dos corrientes, una que contiene los productos y otra que contiene la enzima y otros posibles polímeros, que es recirculada al reactor. Para evitar la disminución de actividad catalítica en el reactor, se purga parte de la corriente de recirculación de la enzima y se añade enzima fresca. Sin embargo, es conocido el fenómeno de polarización que se produce en la membrana del ultrafiltro y que provoca el bloqueo de poros de la membrana y la formación de una "torta" de proteínas sobre dicha membrana. El efecto es una pérdida de actividad catalítica importante asociado a un aumento de la pérdida de carga en el ultrafiltro, que supone una disminución la concentración de productos, es decir, una disminución paulatina de la producción (Atkinson, 1986).

Para evitar la pérdida de enzima debida a su empleo en disolución, la enzima se puede inmovilizar. El uso de ultrafiltros previene la salida de la enzima de la zona de reacción, pero, generalmente, lleva asociados varios problemas de operación, como ya se ha comentado. Otra opción, más utilizada, es inmovilizar la enzima mediante la unión de la enzima a soportes con una alta superficie interna o mediante la generación de polímeros activos por entrecruzamiento de enzimas o por polimerización en presencia de soluciones enzimáticas, técnica denominada atrapamiento. La unión a soportes, junto con el entrecruzamiento, son muy utilizados porque permite obtener inmovilizados más estables que la enzima libre de partida. La unión de la enzima a soportes ya existentes se puede llevar a cabo por múltiples técnicas: adsorción, intercambio iónico, afinidad, enlace metálico o enlace covalente o químico propiamente dicho (Bickerstaff, 1997). La inmovilización permite que la enzima permanezca en el reactor, lo que es imprescindible para desarrollar procesos

en continuo a gran escala, similares a los que ya existen en industrias como la petroquímica o la alimentaria. Además, aunque se suele perder algo de la actividad inicial de la enzima que se inmoviliza, se obtienen catalizadores que pueden tener varios miles de veces la vida media de la enzima libre de partida. Como las enzimas son catalizadores caros, su estabilidad es una característica fundamental para el desarrollo de aplicaciones a gran escala y también para el desarrollo de nuevas herramientas analíticas como los biosensores. La inmovilización de la enzima evita tener que separarla de los productos de la reacción a la salida del reactor. Esta separación es importante en algunos casos, pues una continuación de la acción enzimática más allá del punto requerido puede alterar el producto de forma inaceptable (es conocido que la degradación de muchos alimentos se debe a la acción de las enzimas que contienen).

La inmovilización de la enzima implica que ciertos fenómenos que, con la enzima en disolución, carecían de importancia son ahora importantes. Estos fenómenos son: los fenómenos de partición asociados a la carga del soporte, la modificación configuracional que implica la inmovilización, la transferencia de materia en la capa de líquido estancado que está alrededor de la partícula de soporte (transferencia que se puede denominar difusión externa) y la transferencia de materia en los poros o difusión interna (Wiseman, 1985). Estos fenómenos pueden condicionar e, incluso, controlar la velocidad a la que se lleva a cabo el proceso de transformación. La reacción química transcurre a una velocidad que depende, en el caso de la cinética de Michaelis-Menten, de la concentración de sustratos que se unan a la enzima. La reacción química con una determinada enzima inmovilizada en un poro del soporte transcurre a la velocidad que marca la concentración de sustratos en el líquido adyacente. Si la reacción química es más rápida que la difusión de sustratos hacia el centro activo de la enzima, esta difusión o transferencia de materia es la que determina la velocidad del proceso, ya que la reacción química se dará a una concentración de reactivo inferior a la concentración que hay en la superficie del soporte. La mayor velocidad de la reacción química genera un gradiente de concentraciones de sustrato desde la superficie hacia el centro de la partícula. Los gradientes generados se tratan de esquematizar en la Figura 3.1.

La presencia de cargas en la superficie interna del soporte provoca que haya una exclusión de los iones del mismo signo y una concentración de iones del signo opuesto en torno a la enzima inmovilizada en dicha superficie. Este hecho es el que provoca fenómenos de partición en una capa de líquido cuyo espesor ronda las decenas de nanómetros. La actividad de la enzima se ve alterada respecto a la que tenía en disolución por esta distribución de iones a su alrededor, que también provoca variaciones en el valor del pH óptimo aparente de la enzima: la enzima sigue estando sometida al pH óptimo que tenía en disolución, pero ahora éste es el pH del microentorno de la enzima, que no tiene porqué coincidir con el pH de la disolución exterior a la partícula donde está la enzima. El mismo fenómeno puede aplicarse a cationes importantes para la actividad de la enzima. Por ejemplo, la β -galactosidasa necesita una concentración de ión magnesio para poder ser activa. Si se utilizan resinas cargadas con iones negativos; se favorece la presencia de magnesio en torno a la enzima; por el contrario, si las resinas están cargadas positivamente, la enzima puede perder su actividad.

La inmovilización provoca interacciones entre el soporte y la enzima que modifican la estructura tridimensional de la misma y, por tanto, su actividad. Si se utilizan determinadas técnicas de inmovilización covalente, se puede unir la enzima al soporte por varios enlaces químicos, modificando de forma importante la estructura de la enzima y provocando una pérdida de actividad de la misma respecto a la de la enzima en disolución (Guisán y col., 1997). Al mismo tiempo se logra una estructura más rígida y más estable, puesto que su alteración implicaría romper nuevos y fuertes enlaces. De hecho, es de esperar que la estructura proteica a la que se llegaría por desactivación de esta enzima inmovilizada sería distinta a la que se llega desde la enzima libre, ya que ciertas estructuras internas de la enzima quedarían estabilizadas y la modificación estructural ahora implicaría la ruptura de las uniones entre otros aminoácidos.

La velocidad a la que transcurre la transferencia de materia en la capa externa depende del espesor de dicha capa. Éste disminuye si aumenta la agitación en el medio de reacción, lo cual se logra aumentando la velocidad de paso del líquido en reactores en los que se mueva en sentido axial (lechos fijos, lechos fluidizados,

monolitos, etc), la velocidad de agitación de hélices o turbinas en reactores tipo tanque o la velocidad de paso del gas de agitación en reactores tipo airlift. La disminución del espesor de la capa de líquido estanco supone que el camino a recorrer por difusión (un mecanismo lento de transferencia de materia) por parte de los sustratos que entran al catalizador disminuye, disminuyendo por tanto la resistencia a la transferencia de materia y aumentando su velocidad. Como la reacción química no se lleva a cabo hasta que los sustratos alcanzan el soporte que contiene la enzima, la difusión externa y la reacción química son dos fenómenos asociados en serie y la difusión externa se puede describir con un modelo de gradiente máximo, dependiendo la velocidad de la transferencia de materia de la diferencia entre la concentración en el seno de la solución y la concentración en la superficie del soporte (Figura 1.3). Acoplando la difusión externa y la reacción química la velocidad general del proceso, para una cinética de primer orden, viene dada por:

$$(r_{obs}) = k_c a_m (C_s^{fluido} - C_s^{sup}) = k_q f(C_s^{sup}) \quad [1.1]$$

donde r_{obs} es la velocidad de transformación observada, k_c es el coeficiente externo de transferencia de materia, a_m es la superficie de contacto por unidad de volumen de soporte, C_s^{fluido} es la concentración de sustrato en el seno del medio de reacción, C_s^{sup} es la concentración de sustrato en la superficie del soporte, k_q es la constante de reacción química de primer orden y $f(C_s^{sup})$ una función que depende de la ecuación cinética de la reacción enzimática. En estado estacionario, la velocidad de transferencia de materia en la capa externa es igual a la velocidad de la reacción química, que queda descrita por la ecuación cinética de dicho modelo, donde la concentración de sustratos y productos es la que hay en superficie, siempre que no existe difusión interna controlante, en cuyo caso $f(C_s^{sup})$ se sustituye por $f(C_s^{sup}) \cdot \eta$, donde η es el factor de efectividad interno.

La transferencia de materia dentro de los poros rellenos con un medio líquido transcurre por difusión molecular, siguiendo la ley de Fick. Debido a que la estructura porosa opone una nueva resistencia a la difusión de los sustratos, además de la debida al líquido que rellena los poros, el coeficiente de difusión no es el de difusión

molecular de los sustratos en el líquido, generalmente agua, sino un coeficiente de difusión efectivo inferior al anterior. Cuando la velocidad de difusión es inferior a la velocidad de reacción se produce una disminución progresiva de la concentración de los sustratos desde la superficie hacia el centro de la partícula, siendo menos eficaz la enzima inmovilizada cerca del centro que la que está próxima a la superficie de la partícula de soporte porque reacciona con una concentración de sustrato menor (Figura 1.3).

Según entran los sustratos en el poro van uniéndose a las enzimas inmovilizadas en las paredes del mismo y reaccionan, por lo que la reacción y la difusión interna están asociadas en serie-paralelo. Por tanto, en el estado estacionario, se igualan las velocidades de los dos procesos, describiéndose la velocidad de difusión interna mediante un modelo de gradiente múltiple:

$$D_e \left[\frac{d^2 C_s^i}{d r^2} + \frac{a-1}{r} \frac{d C_s^i}{d r} \right] = r_w \rho_p \quad [1.2]$$

donde D_e es el coeficiente de difusión efectivo, C_s^i es la concentración de sustrato en un punto interior del soporte (a radio r del centro de la partícula), r_w es la velocidad de reacción referida a peso de enzima inmovilizada y ρ_p es la densidad del soporte.

La resolución de la ecuación diferencial planteada se lleva a cabo teniendo en cuenta que las concentraciones de sustratos y productos a un radio igual al radio de partícula son las concentraciones de los mismos en la superficie del soporte y que en el centro de la partícula no hay variación de dichas concentraciones (sus derivadas son cero). La resolución de este balance de materia en el interior de la partícula por métodos numéricos (intervalos finitos o colocación ortogonal) permite conocer las concentraciones de los compuestos implicados a determinados valores del radio y, mediante la ecuación cinética, se pueden calcular las velocidades de reacción en esos puntos. Estos datos permiten el cálculo de una velocidad promedio en la partícula; el llamado factor de efectividad (η) es el cociente entre esta velocidad promedio y la

velocidad máxima en la partícula, que es la velocidad en condiciones de superficie. La velocidad de transformación observada es, por tanto:

$$(r_{obs}) = \eta k_q \rho_p C_s^{sup} \quad [1.3]$$

Con frecuencia, la distribución de la enzima tras la inmovilización suele ser no uniforme, siendo mayor la concentración de enzima cerca de la superficie que en el centro de la partícula, como se observa en la Figura 1.3. Este fenómeno se debe a que la inmovilización es una reacción heterogénea entre una enzima que está en la fase líquida y una superficie sólida activada, por tanto, la enzima tiene que difundir en los poros hasta fijarse a la superficie de los mismos y la velocidad del proceso de inmovilización puede (y suele) estar controlado por la transferencia de materia en los poros. Este hecho favorece que las zonas más externas de la partícula de soporte tiendan a fijar la mayor cantidad de enzima posible antes de que zonas más internas se vean involucradas en el proceso de inmovilización, generándose una distribución en forma de coraza, no uniforme. Así, se evita en parte el control de la velocidad del proceso de transformación enzimático debido a la difusión interna de los sustratos, ya que éstos entran rápidamente en contacto con la zona con mayor cantidad de enzima inmovilizada, que es la más cercana a la superficie del soporte.

Finalmente, los procesos enzimáticos suelen ser isotermos. Este hecho se debe a que la energía de reacción en las transformaciones enzimáticas no son importantes. De esta forma, no existe transmisión de energía hacia o desde la partícula de biocatalizador que sea considerable y la temperatura en la partícula es la misma que la que hay en el seno del fluido (Figura 1.3).

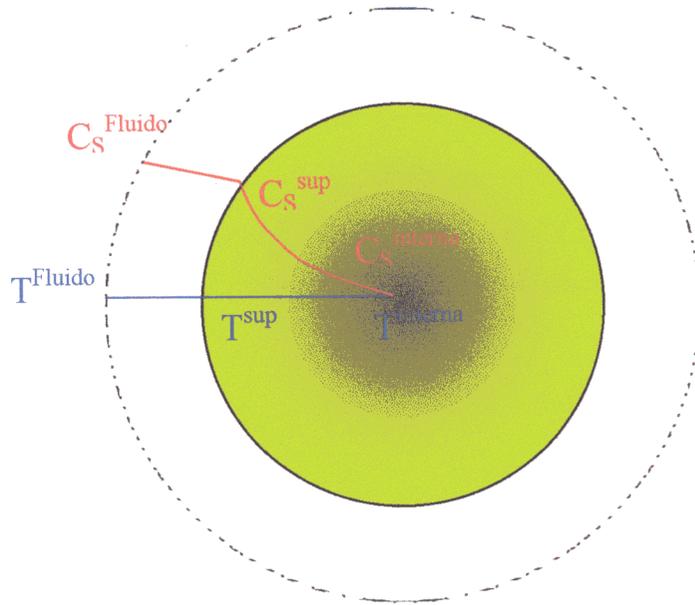


Figura 1.3.- Gradientes de temperatura y concentración de sustrato formados durante un proceso enzimático en condiciones de limitaciones por difusión externa e interna. Se aprecia la distribución en concha de la enzima, más abundante cerca de la superficie de la partícula de soporte.

1.3.- β -GALACTOSIDASAS

También conocidas como lactasas o más formalmente como β -D-galactosido galactohidrolasas, las β -galactosidasas se encuentran en el intestino de los mamíferos jóvenes (actividad que desaparece normalmente después del período de destetado) y también en ciertos microorganismos. Su sustrato natural es la lactosa y son enzimas capaces de hidrolizarla e, incluso, en ciertas condiciones, de cambiar la glucosa de este azúcar por otro grupo aglicón presente en el medio, en una reacción conocida como transgalactosidación (Finochiaro y col., 1980; Gekas y López-Leiva, 1985; Prenosil y col., 1987; Stevenson y col., 1993; Iwasaki y col., 1996; Menzler y col., 1997; Sheu y col., 1998).

1.3.1.- Fuentes de β -galactosidasas

Existen numerosas fuentes de enzimas con actividad β -galactosidasa, en la Tabla 1.2 se muestran las posibles fuentes de β -galactosidasa (Gekas y López-Leiva, 1985). No todas las fuentes de β -galactosidasa son aceptables o reconocidas como inocuas para su aplicación industrial, sobre todo en la industria alimentaria. Las mejores fuentes de esta enzima son los microorganismos *Saccharomyces lactis*, *Aspergillus niger* u *oryzae* o bacterias tales como *Escherichia coli*. Las preparaciones de lactasa a partir de *A. niger*, *A. oryzae* y de *Saccharomyces sp. (lactis o fragilis)* son consideradas inocuas por su utilización a través de la historia y por los múltiples estudios e investigaciones a que han sido sometidas. La β -galactosidasa de *E. coli*, a pesar de ser la más estudiada, encuentra aplicación sólo en Química Analítica, ya que presenta algunos problemas de toxicidad cuando se utiliza en la industria alimentaria. Las propiedades de las β -galactosidasas dependen de sus fuentes de origen -Tabla 1.2 (Gekas y López-Leiva, 1985)-. El mayor tamaño molecular corresponde a la β -galactosidasa de *E. coli* (520.000-850.000 Dalton), mientras que para las enzimas de *A. oryzae* y *S. fragilis* los pesos moleculares oscilan alrededor de 90.000 y 200.000 Dalton, respectivamente. La fuente y preparación comercial de la enzima, el método de inmovilización empleado y el tipo de soporte escogido influyen en las condiciones de temperatura y pH que deben utilizarse. En general, las β -galactosidasas de hongos tienen un pH óptimo en la zona ácida (2,5-4,5) y las β -galactosidasas de levaduras y bacterias funcionan en la zona neutra de pH (entre 6 y 7 y entre 6,5 y 7,5, respectivamente). Esta propiedad, de poseer un

pH óptimo, permite que cada β -galactosidasa tenga una aplicación específica. Así, las enzimas procedentes de hongos son usadas para la hidrólisis de la lactosa del lactosuero, mientras que las de levadura y bacterias son empleadas para la hidrólisis del azúcar presente en la leche (pH = 6,6) y en jarabes de lactosuero (pH = 6,1).

Las β -galactosidasas de *Saccharomyces*, especialmente de *S. lactis*, están presentes en la mayoría de preparaciones lácteas, debido a que sus condiciones óptimas (35-40°C, pH 6,6-6,8) se encuentran cerca de la temperatura y pH natural de la leche y de la mayoría de los preparados lácteos. Además, presentan una apreciable actividad, incluso a temperaturas muy bajas (menores de 4°C), donde el crecimiento de la espora del microorganismo es muy pequeño. Así, la leche o lactosuero pueden ser tratados durante el usual período de almacenaje durante la noche.

La β -galactosidasa de *A. niger* tiene condiciones óptimas de proceso alrededor de 50°C y pH 3,5-4,5 y su aplicación está restringida a los lactosueros, debido a su carácter ácido. Por razones económicas, sólo es aplicada en forma inmovilizada.

La hidrólisis de β -D-galactósidos por β -galactosidasas se puede seguir por la liberación de cualquiera de los dos productos: el resto glicón o el aglicón. El seguimiento de galactosa sólo indica la velocidad de la reacción de hidrólisis cuando se produce en unas condiciones en las que la transgalactosidación es imperceptible. La determinación de ambos productos permite seguir tanto la hidrólisis como la transgalactosidación, que es una reacción de intercambio del grupo aglicón original del sustrato por otro presente en el medio.

Cuando se utilizan β -D-galactósidos con un grupo aglicón cromóforo o fluoróforo, la detección es sencilla y muy sensible. También se pueden utilizar sustratos con carbonos radiactivos y seguir la obtención de un producto por separación y seguimiento de la radiactividad. La mayoría de los métodos para seguir la hidrólisis están basados en el seguimiento de la liberación del aglicón. Dentro de éstos, los más utilizados son aquellos en los que el aglicón es cromóforo, como en el caso de los derivados aril- β -D-galactósidos: PMPG, ONPG, etc. Otro método muy conocido utiliza como sustrato 6-

bromo-2-naftil- β -D-galactósido (BNG), cuya hidrólisis de un producto insoluble, el 6-bromo-2-naftol. Es un sustrato muy usado en estudios histoquímicos y en detección de actividad en geles de proteínas. El uso de sustratos fluorogénicos ha mejorado la sensibilidad de la detección de la actividad β -galactosidas. Los sustratos más usados son: mono-fluoresceína- β -D-galactósido, di-fluoresceína- β -galactósido y metillumbilferil - β -D-galactósido, aunque continuamente salen al mercado otros nuevos.

Tabla 1.2.- Algunas fuentes de β -galactosidasa.

Fuentes de Lactasa	
Plantas	Melocotón Almendras Albaricoque Granos de Kefir Tipos de rosas silvestres Semilla de alfalfa Bayas de café
Organos de animales	Intestino Tejidos de la piel y sesos
Levaduras	<i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis y fragilis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Wingea roberstii</i>
Bacterias	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Thermus aquaticus</i> <i>Streptococcus lactis y thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus y helveticus</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Lactobacillus sporogenes</i>
Hongos	<i>Neurosporas crassa</i> <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Mucor pueillus</i> <i>Mucor miehie</i> <i>Scopuloriopsis</i> <i>Alternaria palmi</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Alternaria alternara</i>

El ensayo de estas enzimas se suele hacer en tampón fosfato, si su pH óptimo es neutro, o en tampón citrato, si es ácido. En ambos casos, el tampón suele contener mercaptoetanol y concentraciones adecuadas de sodio, potasio y iones divalentes, sobre todo Mg^{2+} . Las condiciones del ensayo son muy variadas, pues han sido muchos los grupos que han desarrollado sus propios métodos de ensayo. En general, la temperatura varía entre 20 y 30°C, el sustrato es ONPG y el medio contiene mercaptoetanol 0,01 a 0,1 M y Mg^{2+} 0,01 a 0,1M. Para la β -galactosidasa de *E. coli*, las condiciones más usadas son: 28°C, tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0 al que se le ha añadido mercaptoetanol (0,1 M) y Mg^{2+} (0,001M) y una concentración inicial de ONPG en torno a 2 mM (Bódalo, 1985). La hidrólisis de ONPG se muestra en la Figura 1.4. En estas condiciones, una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que hidroliza 10^{-9} moles de sustrato en 1 minuto. El ensayo de transgalactosidación o la actividad transferasa se conoce midiendo la cantidad de galactosa liberada en presencia y ausencia de glicerol o metanol.

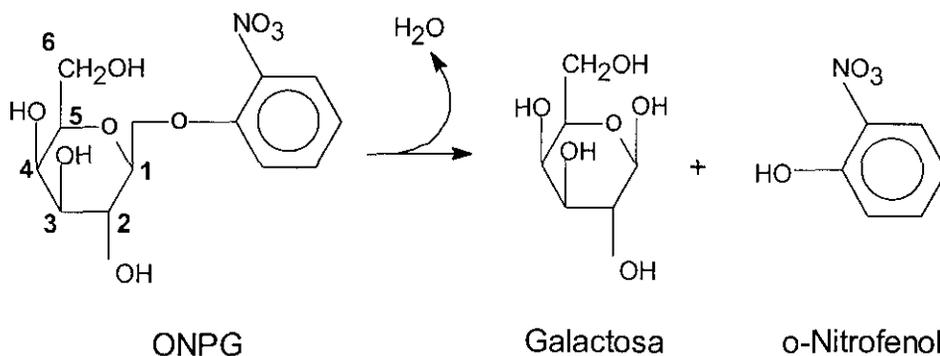


Figura 1.4.- Esquema de hidrólisis de o-nitrofenil-B-1,4-D-galactósido (ONPG).

La purificación se ha realizado mediante procedimientos tradicionales: precipitación y separación cromatográfica por intercambio iónico, permeación en gel e interacción hidrofóbica, y otros más modernos: cromatografía de afinidad respecto a la propia enzima, o añadiendo a la enzima dominios de otras proteínas o colas de histidina por Ingeniería Genética. La enzima de *E. coli* se ha llegado a cristalizar y a analizar por espectrometría de rayos X. También se han realizado estudios microscópicos de las enzimas purificadas, observándose que la enzima de *E. coli* es tetramérica (Wallenfels y Weil, 1972), mientras que otras, como la de *K. fragilis*, parecen tener más subunidades

(Mahoney, 1980). En el caso de la enzima de *E. coli* se ha llegado a determinar su secuencia de aminoácidos e, incluso, su estructura terciaria por RMN (Jacobson, 1994).

Las enzimas son estables a la temperatura según su procedencia. En el caso de mesófilos, las enzimas de hongos suelen ser estables hasta 60°C, las de bacterias hasta 50°C y las de levadura hasta 40-45°C. Para los microorganismos termófilos, sobre todo bacterias, el límite de estabilidad está en 70-80°C. Sucede que tanto la lactosa como la galactosa son estabilizantes de la enzima frente al pH y la temperatura extremos.

El tratamiento con urea lleva a formas inactivas pero que conservan la estructura, lo mismo que cuando no existen determinados iones en el medio (como Mg^{2+}). Entonces, se consigue reactivar la enzima mediante la eliminación del desnaturalizante o la adición de iones al medio (Wallenfels y Weil, 1972).

El peso molecular de las β -galactosidasas suele ser grande, oscilando entre 100 KDa en algunas levaduras hasta los 400 KDa para la enzima de *E. coli*. Son enzimas que suelen tener una estructura cuaternaria, de 2 a 4 subunidades según los métodos cinéticos de contaje de centros activos y la sedimentación en SDS (Mahoney, 1980). La enzima de *E. coli* tiene 4 subunidades iguales, la de *K. fragilis* tiene 2 subunidades distintas, aunque algunas observaciones al microscopio sugieren 10 subunidades (Mahoney, 1980). La enzima de *K. lactis* parece tener varias formas activas, Becerra y col. (1998) demuestran que la forma activa más importante es la dimérica (250 KDa), aunque la forma tetramérica también es activa y, además, es la única que presenta actividad frente a BNG (6-bromo-2-naftil- β -D-galactósido). La enzima de *A.niger* es monomérica, a diferencia de las enzimas procedentes de bacterias y levaduras, y contiene restos glicosídicos unidos a su estructura proteica.

Los iones tienen marcada influencia sobre la actividad y estabilidad de estas enzimas frente a factores externos como la temperatura o el pH. Los iones Na^+ y K^+ suelen ser activadores, aunque en algunas enzimas, como la de *K. fragilis*, el sodio es inhibidor. Los iones divalentes, como el Mg^{2+} y el Mn^{2+} , tienen efecto sobre la actividad y estabilidad de las enzimas procedentes de levaduras. El magnesio actúa también sobre la actividad de la enzima de *E. coli* como activador. Sin embargo, no se trata de

metaloenzimas, ya que no existe unión química entre la enzima y el ión. Parece, sin embargo, que son importantes en la unión del sustrato a la enzima. El ión Mn^{2+} parece tener un efecto estabilizador importante frente a la desactivación térmica en el caso de la enzima de *K. fragilis* (Mahoney, 1978), ya que multiplica por siete la vida media de la enzima a 50°C. El ión Hg^{2+} es un inhibidor irreversible de enzimas de hongos. Estas enzimas requieren para ser activas iones divalentes como magnesio, pero no monovalentes. Algunas características de enzimas con actividad β -galactosidasa se encuentran recogidas en la Tabla 1.3 (López-Leiva y Gekas, 1985).

Tabla 1.3.- Propiedades de algunas β -galactosidasas.

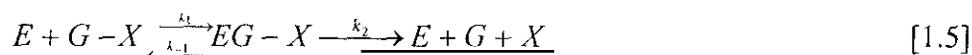
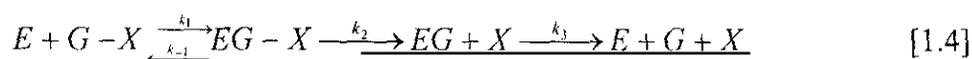
Fuente	pH óptimo	T (°C)	P. Molecular	Activadores
<i>A. niger</i>	3,0-4,0	55-60	124 KD	Mg^{2+}
<i>A. oryzae</i>	5,0	50-55	90	Mg^{2+}
<i>K. fragilis</i>	6,6	37	201	Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+
<i>K. lactis</i>	6,9-7,3	35	135	Mn^{2+} , Na^+
<i>E. coli</i>	7,2	40	540	Na^+ , K^+ , Mg^{2+}
<i>L. thermophilus</i>	6,2-7,1	55-57	530	-
<i>S. thermophilus</i>	7,5	55	500-600	-

1.3.2.- Mecanismo de acción de las β -galactosidasas

Las β -galactosidasas son específicas, en principio, respecto a los enlaces no reductores de los β -D-galactopiranosidos que incluyen O, N y S. La hidrólisis se realiza manteniendo la configuración en el C-1 de la galactosa, que es el carbono de unión a la glucosa. En el centro activo hay zonas para la unión de galactosa y para la unión de glucosa. Los aminoácidos que unen la glucosa en el centro activo de la enzima tienen mayor afinidad por ligandos hidrofóbicos que por la misma glucosa, pero la afinidad por la glucosa aumenta drásticamente cuando se produce el cambio conformacional que

acompaña a la formación del intermedio galactosil-enzima. Los grupos -OH en C-3 y C-4 de la galactosa son fundamentales para que esta se una al centro activo y para la catálisis; los grupos de las posiciones 5 y 6 son importantes para la unión pero, posiblemente, no para la catálisis, la posición 2 parece no tener influencia alguna en la afinidad (estos carbonos se marcan en el ONPG en la Figura 1.4). Como muchas glicosidasas, la β -galactosidasa cataliza la transferencia a varios aceptores además del agua, catalizando la isomerización de lactosa a alolactosa, que es el inductor primario del operón *lac* en *E. coli* (Mooser, 1992).

Diversos trabajos han llevado a la conclusión de que existe un intermedio de reacción galactosil-enzima (Mooser, 1992; Wallenfels y Weil, 1972); varias aproximaciones cinéticas pueden tener en cuenta este hecho. Ciertas glicosidasas tienen un mecanismo ping-pong o ping-pong modificado (Mooser, 1992). Además, la existencia del intermedio está basada también en estudios cinéticos con sustratos que modifican la etapa limitante de la velocidad de reacción, que puede ser la glicosilación o la deglicosilación. En el caso de la β -galactosidasa, hay varios sustratos que pueden actuar como aceptores o donadores del grupo galactósido: agua, metanol, etanol y otros alcoholes son buenos aceptores, mientras que varios arilgalactósidos cromóforos son buenos donadores. Como mecanismos se han propuesto dos, en principio, que responden a los siguientes esquemas:



Estos dos mecanismos son distinguibles utilizando sustratos en cuya hidrólisis la etapa limitante de la velocidad sea la transferencia del grupo glicosídico al disolvente, es decir, el paso gobernado por la constante k_3 . Para aclarar el mecanismo, se puede llevar a cabo la reacción en presencia de dos aceptores que compitan por el grupo galactósido: si el mecanismo es el más sencillo, la relación de las concentraciones de los productos de una adición respecto a la otra será constante e independiente del grupo que salga del centro activo y de cuál sea el paso limitante del proceso (Stokes y Wilson, 1972). Estos

autores encontraron que en las reacciones con metanol 0,247 M y etanol 0,171 M, usando como donadores de galactósido varios sustratos arilgalactósidos, la relación fenol:alquil- β -galactósido permaneció constante, lo que indicaba que se formaba primero un intermedio, el cual podría reaccionar con cualquiera de los dos aceptores de grupo galactósido.

La presencia del intermedio ha sido confirmada en experimentos de cinética no estacionaria tipo “burst”, utilizando reacciones en las que la degradación de dicho intermedio era el paso limitante de la reacción. Aunque se utilicen los sustratos de degradación más lenta, en las condiciones habituales, la liberación del segundo producto es demasiado rápida. La reducción de temperatura por debajo de 0°C, la eliminación de iones activadores como el Mg^{2+} y el uso de disolventes poco polares ha permitido la realización de este tipo de experimentación con la β -galactosidasa de *E. coli* (Fink y Angelides, 1975). También se ha recurrido al uso de mutaciones dirigidas para obtener enzimas modificadas para poder realizar este tipo de experimentación (Deschavanne y col., 1978).

La catálisis por β -galactosidasa coordina un centro activo carboxilado que estabiliza a un ión carbonio que puede transformarse en una especie covalente. En la presencia de Mg^{2+} y con la mayoría de los sustratos, se produce una catálisis ácida que protona el oxígeno exocíclico del grupo saliente.

La generación de un ión oxocarbonio galactosil-enzima es evidente, puesto que la enzima presenta gran afinidad por los análogos de este estado de transición y por el hecho de que la hidrólisis se da aún en condiciones que evitan la catálisis ácida general. El estado de transición durante la transferencia al aceptor puede ser este ión o una forma covalente derivada del mismo. Como el ión tiene una vida media muy corta (es muy inestable) y es muy improbable poder estabilizarle sin que exista la formación de un enlace covalente, se podría dar un equilibrio entre las formas iónica y covalente (Cupples y col., 1990).

De los aminoácidos que actúan durante la catálisis, el primero cuyo papel fue reconocido fue Glu-461 (ácido glutámico, posición 461 de la cadena polipeptídica)

(Legler y Herrchen, 1981). El análisis cinético de enzimas procedentes de mutaciones en ese aminoácido ha corroborado su importancia en el proceso de hidrólisis: todas las sustituciones han supuesto un descenso de la actividad enzimática en más de un 99%. Además, este aminoácido influye de forma notable en la estabilidad de la enzima a la temperatura, de tal forma que las enzimas procedentes de mutaciones son menos estables, excepto en el caso de que el aminoácido sustituyente conserve la estructura del glutámico, por ejemplo, glutamina. La sustitución reduce tanto la velocidad de galactosidación como la de degalactosidación. El glutamato es un estabilizante del ión oxocarbonio pero parece jugar algún otro papel, ya que su sustitución por aminoácidos muy desestabilizantes no supone que la velocidad de galactosidación disminuya, sino que sea proporcional a la acidez del grupo saliente. Es interesante que la sustitución por histidina lleve a velocidades de degalactosidación relativamente rápidas (un 6% de la conseguida con Glu), esta es una demostración más de que existen dos intermedios en equilibrio: la forma oxocarbonio y su derivado covalente (Cupples y col., 1990).

El residuo de β -galactosidasa considerado responsable de la catálisis ácida en la ruptura del enlace glicosídico es Tyr-503 (tirosina, posición 503). También sobre él se han llevado a cabo estudios de mutagénesis dirigida. Inicialmente, el uso de dos sustratos alquilantes llevó a la deducción de que una metionina, Met-502, podría ser el aminoácido responsable de la catálisis ácida. Su sustitución demostró que no era así (Naider y col., 1972). Teniendo en cuenta la localización de Met-502 y la dependencia de la enzima con el pH, se sugirió la hipótesis de que el donador de protones debía ser un aminoácido adyacente, Tyr-503. La modificación química de este aminoácido a un derivado fluorado del mismo produjo una disminución en el pK_a del lado alcalino de 1,5 puntos, equivalente a la diferencia entre la tirosina y su derivado (Ring y col., 1985). La sustitución de Tyr-503 por mutagénesis dirigida por fenilalanina llevó a una actividad mucho menor (Ring y col., 1988; Edwards y col., 1990).

1.4.- HIDRÓLISIS DE LACTOSA CON β -GALACTOSIDASA

La hidrólisis de lactosa, para formar glucosa y galactosa, es una reacción interesante desde diversos puntos de vista. En primer lugar, la insuficiencia intestinal de lactasa, que padece un significativo porcentaje de la población, se traduce en una incapacidad para digerir la leche y/o productos lácteos, sufriendo trastornos gastrointestinales. Por otra parte, tecnológicamente, la lactosa es fácilmente cristalizable y poco soluble, lo que dificulta ciertos procesos en la industria láctea, evitándose estos problemas con la hidrólisis enzimática. Por último, se debe tener en cuenta que la lactosa presente en el suero de la leche, como subproducto en la elaboración de quesos, genera un gran problema de contaminación ambiental por las grandes cantidades de lactosuero que son vertidos por industrias de este tipo, ya que la lactosa no es fácilmente biodegradable. Este material presenta una demanda biológica de oxígeno muy elevada y persistente, siendo costoso de tratar como residuo. Por ello, se han desarrollado numerosos procesos para aprovechar los componentes orgánicos del suero. La primera etapa en estos tratamientos consiste, usualmente, en la recuperación de los compuestos proteicos que no se utilizan después de la preparación del queso. Una vez extraída la proteína, queda una solución que contiene lactosa y sales diversas, y que puede hidrolizarse de forma enzimática (Figura 1.5).

La lactosa se puede hidrolizar también mediante ácidos, aunque, de esta forma, da lugar a la aparición de color y a la precipitación de proteínas y de sales que ensucian las resinas ácidas cambiadoras de iones, por lo que no es adecuado el tratamiento para leche y lactosueros. Muchos de estos problemas pueden eliminarse con la hidrólisis enzimática de la lactosa con β -galactosidasa.

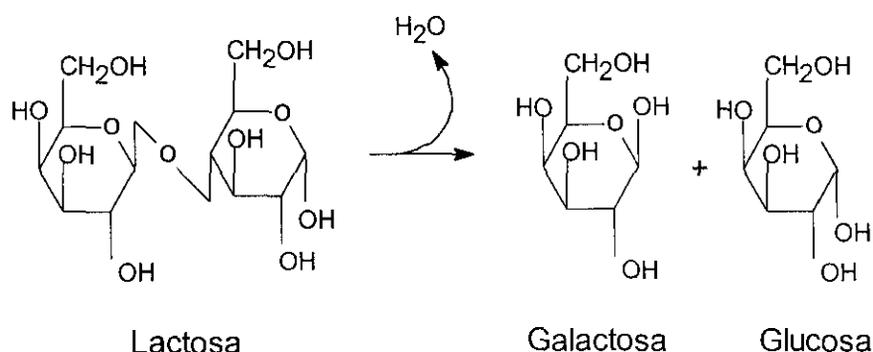


Figura 1.5.- Esquema de hidrólisis de lactosa.

La lactosa o azúcar de la leche es el principal carbohidrato de la leche, en la que se encuentra en concentraciones próximas al 5%. Aunque la lactosa presenta una amplia variedad de usos, incluyendo la alimentación animal, la formulación de productos farmacéuticos y la fermentación alimentaria, tiene una limitada capacidad de digestión y un bajo poder edulcorante, hechos que restringen sus aplicaciones en la industria (Finocchiaro y col., 1980).

El producto hidrolizado, comparado con el poder edulcorante de la sacarosa (tomada como base, con un valor relativo de 100) tiene un valor alrededor de 70, mientras que la lactosa es considerablemente menos edulcorante, con un valor de 40. La reacción de hidrólisis de lactosa genera una mezcla equimolar de glucosa y galactosa. En la práctica, dependiendo de las condiciones, la mezcla equimolar no se presenta siempre, ya que la galactosa puede polimerizar o unirse a la lactosa para formar oligosacáridos. Los monosacáridos que se obtienen en la hidrólisis son fácilmente asimilados en el intestino de los animales.

La hidrólisis enzimática de lactosa se lleva a cabo de dos maneras: utilizando enzimas libres, que generalmente se emplean en procesos discontinuos, o enzimas inmovilizadas. El sistema de enzimas inmovilizadas puede ser de dos tipos: en el primero, la enzima es soluble, pero está retenida en membranas que son de diferente naturaleza, en el segundo, la enzima es insoluble, ya que se ha inmovilizado en un soporte, lo que supone emplear las diferentes técnicas de unión anteriormente mencionadas.

Los productos lácteos tratados con β -galactosidasa pueden ser utilizados en tres tipos de aplicaciones:

- Obtención de productos lácteos dulces (leche, helado de crema).
- Obtención de productos lácteos cultivados (yogurt, requesón).
- Maduración de quesos (Cheddar, Camembert).

Algunos de los procedimientos para la producción de leche con parte de la lactosa enzimáticamente hidrolizada a glucosa y galactosa son:

a) *Proceso en discontinuo* (Guy y Bingham, 1978; Kosikowski y Wierzbicki, 1972). Es el método más sencillo para ser llevado a cabo, la leche es tratada por la vía usual, y después de la pasteurización se añade una dosis controlada de lactasa. La hidrólisis termina bien por que la enzima se desactiva (bajo pH o alta temperatura) o porque el sustrato (lactosa) se acaba. La dosis necesaria de lactasa se calcula teniendo en cuenta de la actividad de la preparación, lo que depende de múltiples variables: grado deseado de hidrólisis, temperatura y pH de la leche, tiempo de reacción y tipo de leche.

Cuando debe obtenerse un alto grado de hidrólisis (DH) en un corto período de tiempo, se recomienda una temperatura de reacción de 30-45°C. Ordinariamente, la pasteurización de la leche no puede ser conseguida a estas temperaturas durante más de 3-6 horas, sin riesgo serio de infección microbiana. Si la temperatura es aproximadamente de 5°C, el tiempo de la reacción puede aumentar a 20-24 horas, siendo la dosis 2-3 veces mayor que a 40°C. Una combinación de baja y alta temperatura de hidrólisis es una buena alternativa en algunos casos, estimándose que tras 17 horas a 5°C seguidos de 3 horas a 35°C se puede producir un 75 % de DH con la misma dosis de enzima que en 4 horas a 40°C.

La hidrólisis discontinua no es viable comercialmente, excepto en el caso de que las lactasa se añadan a los contenedores de la leche durante su envasado, de forma que la lactosa se hidrolice durante el transporte y almacenamiento de la leche. Por esta razón, se han realizado considerables esfuerzos para inmovilizar la lactasa. La β -galactosidasa obtenida de las fuentes anteriores, así como de otras distintas, ha sido inmovilizada en una gran variedad de soportes a escala de laboratorio. La elección de la fuente enzimática viene influida por la aplicación que vaya a darse a la preparación.

El primer proceso de hidrólisis de la lactosa a escala de planta piloto fue el de Snam Progetti en una industria láctea de Milán (Italia) que utilizó β -galactosidasa de levaduras atrapada en fibras de acetato de celulosa para hidrolizar la lactosa en leche desnatada esterilizada. En general, el principal problema en el tratamiento de suero es la obstrucción de las enzimas inmovilizadas por los sólidos no disueltos que deben ser filtrados o centrifugados, lo que resulta caro antes de su tratamiento.

b) *Procesos en continuo*: La enzima β -galactosidasa se ha inmovilizado sobre un gran número de soportes (vidrio poroso, resinas fenol-formaldehído, poliacrilamida, celulosa, alúmina). Además de los procesos en continuo clásicos, con columnas de enzima inmovilizada (Knopf y col., 1979; Prenosil y col., 1984), se han desarrollado otros procesos, tales como:

- Proceso de ultrafiltración en continuo: Roger (1978) describe un proceso de hidrólisis continua de lactosa y reutilización de la enzima (Figura 1.6a). La proteína de la leche es retenida por ultrafiltración y el filtrado se lleva a un reactor enzimático en el cual tiene lugar la hidrólisis. En una segunda ultrafiltración se recupera la enzima y el filtrado se mezcla con la proteína retenida en el primer paso, para obtener una leche con lactosa parcialmente hidrolizada.
- Atrapamiento en membranas (Breslau y Kilcullen, 1975): El componente esencial de este proceso es una membrana semipermeable. La enzima se fija a una cara permeable de un módulo de ultrafiltración situado en el hueco de una fibra, más o menos adherida a la superficie porosa de la membrana. En la Figura 1.6b se representa un esquema del proceso.
- Inmovilización de lactasa en fibras (Pastore, 1977): Aquí la lactasa es inmovilizada en fibras de acetato o de celulosa, las cuales son colocadas longitudinalmente entre los extremos del reactor, o son cortadas en trozos y empaquetadas al azar en el reactor. El mecanismo que pone en contacto la lactosa con la enzima es por simple difusión. En la Figura 1.6c puede verse un esquema del proceso.

En la Tabla 1.4 se presentan algunos de los procesos de hidrólisis de lactosa llevados a cabo a escala industrial o semi-industrial (Gekas y López-Leiva, 1985).

Tabla 1.4.- Procesos de hidrólisis de lactosa.

Enzima	Compañía	Instalación
Libre	Valio	Planta Piloto (Finlandia)
Libre	Novo A/S	Planta Piloto (Dinamarca)
Libre	Tetra Pak	Industrial (Suecia)
Inmovilizada	Snamprogetti	Industrial. Centrale Latteria di Milano (Italia)
Inmovilizada	Corning Glass	Semi industrial ULN Condi (Francia) Dairy Crest (Reino Unido) Kroger (USA)
Inmovilizada	Connecticut-Lehigh University	Planta piloto (USA)
Inmovilizada	Valio	Industrial. Keymenlaaskso Dairy (Finlandia)
Inmovilizada	Gist Brocades	Planta piloto (Holanda)
Inmovilizada	Röhm GmbH	Planta piloto (Alemania)
Inmovilizada	Sumitomo	Planta piloto (Japón)
Inmovilizada	Amerace Corp	Planta Piloto (USA)

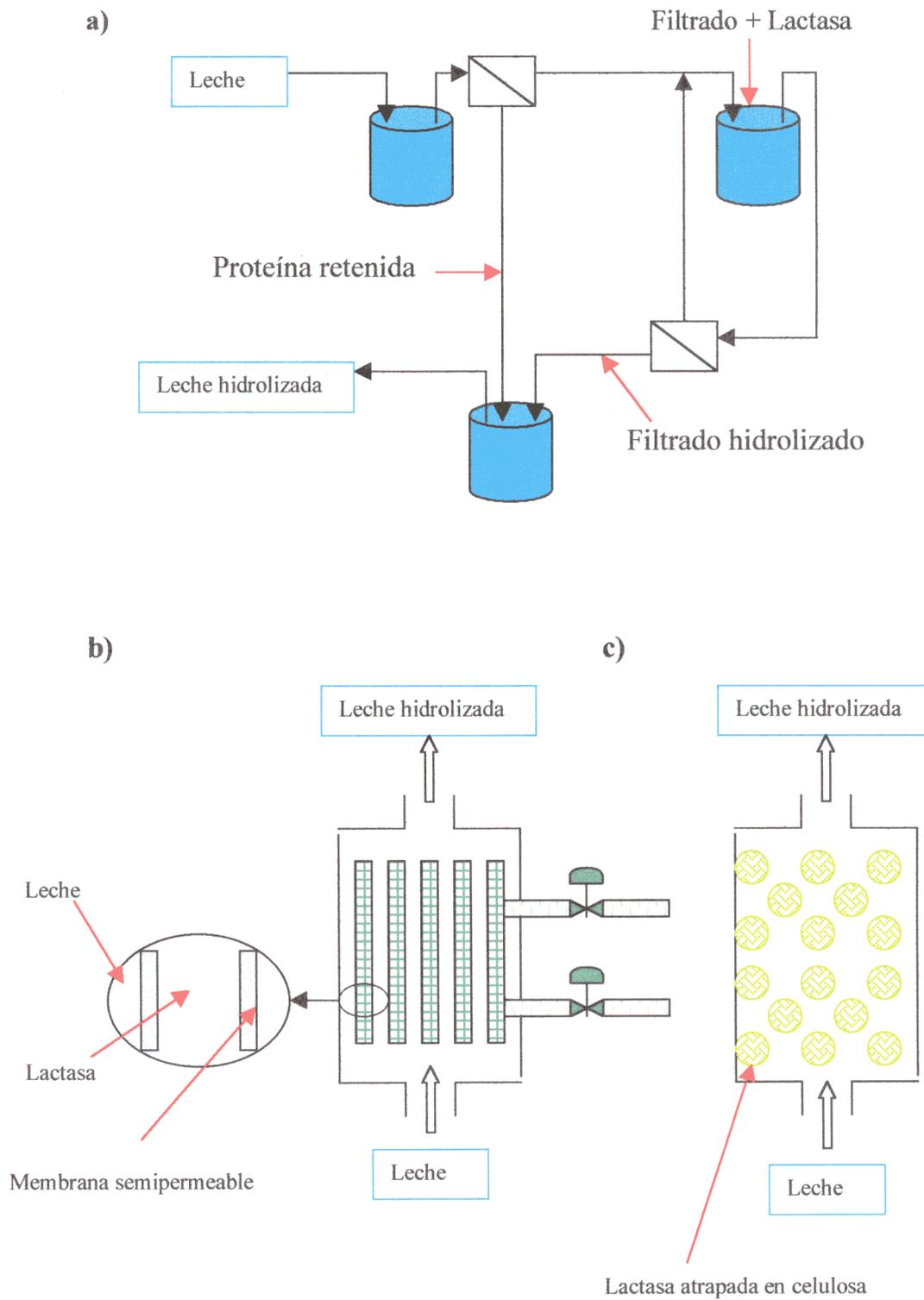


Figura 1.6.- Esquema del proceso de hidrólisis de lactosa en continuo:
 (a) Proceso de ultrafiltración en continuo
 (b) Atrapamiento en membranas
 (c) Inmovilización de lactasa en fibras

1.5.- OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

El objeto general de este trabajo es estudiar los fenómenos que se dan en las reacciones enzimáticas, en particular en las de hidrólisis catalizadas por β -galactosidasas, tanto en disolución como inmovilizadas. Para ello, se estudiarán los siguientes aspectos:

- La cinética de las reacciones de hidrólisis de lactosa y de ONPG catalizadas por dos enzimas β -galactosidasas, una comercial, la de *K. fragilis*, y otra bien conocida por la gran cantidad de estudios de los que ha sido objeto, la enzima de *E. coli*. Se van a analizar los mecanismos posibles y se discriminará entre las cinéticas que de ellos se derivan, comparando los resultados obtenidos con ambas enzimas y para los dos sustratos empleados.
- El análisis de la inmovilización de la enzima y los fenómenos que este proceso introduce en las reacciones enzimáticas. Para ello, se va a realizar el estudio del modelo cinético en ausencia de limitaciones difusionales, con los dos sustratos, y se compararán los resultados con los obtenidos para la enzima libre. Conocida la cinética de la hidrólisis se estudiará la influencia de la difusión interna, tanto en la distribución de la enzima inmovilizada como en la velocidad global de las reacciones de hidrólisis.
- La estabilidad de la enzima con la temperatura cuando se emplea en disolución e inmovilizada. La desactivación de la enzima se modeliza mediante la determinación de la ecuación de velocidad de desactivación, que permite predecir cuál va a ser la actividad de la enzima con el tiempo. En la modelización de la desactivación se van a considerar diversos mecanismos y se discriminará entre las cinéticas que de ellos se deriven.

Para abordar los aspectos anteriores hay que poner a punto equipos y procedimientos, para realizar los experimentos necesarios en los estudios cinéticos, en los de difusión y en los de desactivación, así como desarrollar las técnicas de análisis necesarias para determinar la cantidad y actividad de la enzima y proteína (y su distribución en el caso de la inmovilización) y poner a punto el método de análisis

para determinar la variación de los sustratos (lactosa y ONPG) y productos (galactosa y glucosa o galactosa y o-nitrofenol) de las reacciones de hidrólisis con el tiempo.

Para estudiar la cinética de las distintas reacciones de hidrólisis se van a emplear las dos enzimas citadas, y el soporte de la inmovilización va a ser una sílice-alúmina comercial (KA-3, de SüdChemie). Se estudiarán primero las condiciones de pH, temperatura y composición del tampón que permitan mantener una mayor actividad de la enzima. Los modelos considerados para la obtención de las ecuaciones cinéticas se basan en el mecanismo de Michaelis-Menten, considerando la posible inhibición total por sustrato o por productos, pudiendo ser esta última competitiva, acompetitiva, no competitiva o mixta. Con el ajuste de los datos experimentales que se obtendrán en las reacciones de hidrólisis, se va a discriminar entre los modelos cinéticos propuestos. Para ello se utilizarán los criterios estadísticos y físicos que se aplican en los estudios cinéticos de otras reacciones químicas.

Para estudiar el fenómeno de la difusión interna que se produce cuando se emplean las enzimas inmovilizadas, se modificará el diámetro de partícula y la temperatura, ya que ambas variables producen una modificación de la velocidad relativa de las velocidades química y de difusión. En la velocidad de difusión de los sustratos es necesario conocer el coeficiente de difusión efectivo, que se determinará mediante técnicas de medida en ausencia de reacción química. Para predecir la velocidad de la etapa química es necesario disponer de la ecuación cinética de la enzima inmovilizada y conocer la distribución de enzima en el soporte, distribución que se determinará mediante microscopía de fluorescencia confocal. Los valores del coeficiente de difusión efectivo, de la distribución de enzima y la ecuación cinética obtenidas de forma separada, deberán explicar los resultados del factor de efectividad obtenido en condiciones de reacción química.

Por último, para el estudio de la desactivación térmica de la enzima de *K. fragilis* libre e inmovilizada, y su efecto en la reacción de hidrólisis de lactosa, se considerarán varios modelos cinéticos basados en mecanismos que describen la pérdida de actividad de la enzima debida a la temperatura. Estos mecanismos consideran una o varias formas activas de la enzima que evolucionan en serie o en

paralelo a la forma totalmente inactiva. La discriminación del modelo cinético de desactivación se realizará mediante el ajuste de los datos experimentales actividad vs. tiempo obtenidos con la enzima libre e inmovilizada. Finalmente, tras llevar a cabo experimentos en continuo con la enzima inmovilizada en un reactor tanque continuo agitado con cesta (BSTR), se compararán los datos experimentales con los simulados a partir de los modelos cinéticos elegidos para describir la reacción de hidrólisis de lactosa y la desactivación de la enzima inmovilizada.

2.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1.- ENZIMAS EMPLEADAS

2.1.1.- LACTOZYM: β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* comercial

Esta enzima es producida industrialmente por Novo Nordisk Ltd. Se obtiene por fermentación sumergida de la levadura *Kluyveromyces fragilis*. El nombre comercial del producto es Lactozym 3000 L, tipo HP-G (alta pureza de glicerol). En la Tabla 2.1. se recogen sus principales propiedades físicas y químicas. Conservada en frigorífico a 4°C mantiene la actividad declarada al menos durante 6 meses, según garantiza el fabricante, y se ha comprobado durante el desarrollo de este trabajo.

El producto cumple con las especificaciones recomendadas por la FAO, la OMS, la JECFA y la FCC, relativas a enzimas de uso alimentario, complementadas con niveles máximos totales de microorganismos de $5 \cdot 10^4$ MO/g y de 10^2 esporas/g para hongos. Las especificaciones completas, según el fabricante, se recogen en la Tabla 2.2 (Novo, 1977).

La actividad específica del preparado enzimático respecto a o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) es de 65000 U.I. Si se tiene en cuenta que las enzimas puras de muchas especies presentan una actividad específica respecto a este sustrato de 300000 U.I., se deduce que aproximadamente un 20% de la proteína es enzima. La concentración de proteína total es de 35 mg/mL.

Tabla 2.1.- Propiedades físicas y químicas de Lactozym.

Densidad (g/cm ³)	1,1156
Aspecto	Líquido ambar claro
Olor	Ligero olor a fermentación (a pan)
Rango Temperatura	4-45°C (óptimo a 40-45°C)
Rango pH	6,0-7,0 (óptimo 6,5)
Activadores	K ⁺ , NH ₄ ⁺
Inhibidores	Na ⁺ , Ca ²⁺

Tabla 2.2.- Especificaciones Lactozym 3000 L, tipo HP-G.

ENSAYO	MÉTODO	LÍMITE	
		SUPERIOR	INFERIOR
Lactasa (LAU ^a /cm ³)	NOVO 171	-	3000
Proteasa (RU/cm ³)	NOVO 81	6,0	-
Valor del pH a 25°C	NOVO 49	8,0	6,0
Cantidad total viable / g	NOVO B 5	50000	-
Levadura / g	NOVO B 7	100	-
Hongo / g	NOVO B 7	100	-
Bacteria coliforme / g	NOVO B 6	30	-
<i>E. coli</i> enteropatogénica /g	-	No detectado	
Salmonela / g	NOVO B 10	No detectado	
Aflatoxina	NOVO 109	No detectado	

^a LAU es la actividad de enzima que rinde 1 μmol de glucosa por min a 37°C en tampón BM (un tampón mixto citrato-fosfato con la composición salina que la leche) con una concentración de lactosa de 50 g/L.

2.1.2. β-galactosidasa de *Escherichia coli*

Esta enzima es un producto de Ingeniería Genética que se obtuvo en el laboratorio del Dr. José Luis García López, del Departamento de Microbiología del C.I.B.-C.S.I.C. (Sánchez-Puelles y col., 1992). Esta proteína está constituida por la β-galactosidasa de *E. coli* ligada al extremo C-terminal de la principal autolisina de *Pneumococcus*

pneumoniae, la LYTA. Esta quimera o construcción es sumamente fácil de purificar, ya que el dominio de LYTA añadido es precisamente el que tiene la capacidad de fijarse a la membrana por unión a residuos de colina que hay en la misma. Ahora bien, existen en el mercado gran cantidad de resinas de intercambio iónico que contienen el radical DEAE (dietilamino-etil), de gran similitud química con la colina. El simple paso del extracto por una columna cromatográfica con este tipo de resinas, seguido de dos lavados: uno con un tampón fosfato con NaCl 3M, que sirve para eluir todas las proteínas y otros solutos fijados, menos la de interés, y otro con un tampón fosfato con colina 0,4 M, es suficiente para eluir la proteína pura a homogeneidad, según se demuestra por SDS-PAGE (electroforesis desnaturalizante en presencia de SDS –un surfactante-). Las características de la enzima quedan recogidas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3.- Características de la enzima de *E. coli*.

Fuente	<i>Escherichia coli</i>
Actividad específica	300000 UI/mg ^a
C _{enzima}	2.7 mg/ml

^aUI es la actividad de enzima que rinde 1 nmol de o-nitrophenol por min a 28°C en tampón Z (Na-phosphate 100 mM pH 7.0, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 5mM mercaptoetanol).

2.2.- EXPERIMENTACIÓN CON ENZIMA EN DISOLUCIÓN

2.2.1.- Equipos e instalaciones

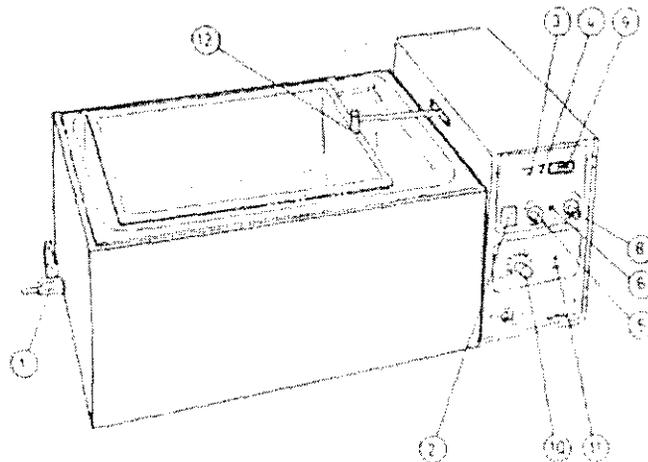
La instalación experimental empleada para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis de lactosa y de ONPG utilizando enzimas en disolución consiste en 2 baños termostáticos con agitación de vaivén, en los que se disponen matraces Erlenmeyer que servirán como reactores discontinuos para los experimentos. Uno de los baños es un Unitronic Orbital, referencia S-320-OR, el otro es un Julabo SW20. En la Figuras 2.1 y 2.2. se muestran los esquemas de los baños y sus características aparecen en la Tabla 2.4.

Otros aparatos utilizados han sido:

- Balanza de precisión Sartorius Handy, modelo H110, (precisión: ± 0.1 mg).
- pH-metro, Crison, Modelo micropH 2002.
- Baño criostático de circulación y de inmersión con unidad de frío TECHNE modelo DIP COOLER RU-200 y baño calefactor TECHNE modelo TEMPETTE TE-8A. Intervalo de temperaturas: -20 a 99.9°C (Figura 2.3.)
- Espectrofotómetro Ultravioleta Visible SHIMAZDU modelo UV-1603.
- HPLC que consta de los siguientes módulos:
 - Bomba: dos bombas de cabezal flotante en serie KONTRON 32X
 - Autoinyector KONTRON 360
 - Horno PERKIN ELMER LC100.
 - Detector de dispersión de luz SEDERE modelo SEDEX 45 (Seita, 1987).
 - Ordenador que dispone del software de adquisición de datos INTEGRATION PACK versión 3.9 de KONTRON

Tabla 2.4.- Características técnicas de los baños termostáticos de vaivén.

Característica	Selecta Unitronic Orbital	Julabo SW20
Intervalo de temperaturas	t.a. +5-99,9°C	t.a. +5-90°C
Máxima variación de temperatura	±0,02°C	±0,1°C
Resolución del termómetro digital	0.1°C	1°C
Potencia del calefactor	1600 W	1500 W
Velocidad máxima de vaivén	150 r.p.m.	200 r.p.m.
Recorrido de vaivén	12 cm	3 cm
Capacidad	27 L	27 L
Voltaje	220 V, 50 Hz	220 V, 50 Hz



DESCRIPCIÓN TÉCNICA

- | | |
|---|--|
| 1) Grifo para el vaciado de la cuba. | 6) Pulsador de TEST |
| 2) Interruptor general. | 7) Grifo de vaciado de la cubeta. |
| 3) Piloto de señalización de alarma | 8) Mando del selector |
| 4) Piloto de señalización del calefactor. | 9) Pantalla display. |
| 5) Mando del OFFSET. | 10) Regulador de velocidad de la cubeta móvil. |
| | 11) Piloto de señalización del motor. |

Figura 2.1.- Esquema del baño termostático de agitación orbital Selecta Unitronic Orbital



Figura 2.2.- Esquema del baño termostático de agitación orbital Julabo SW20

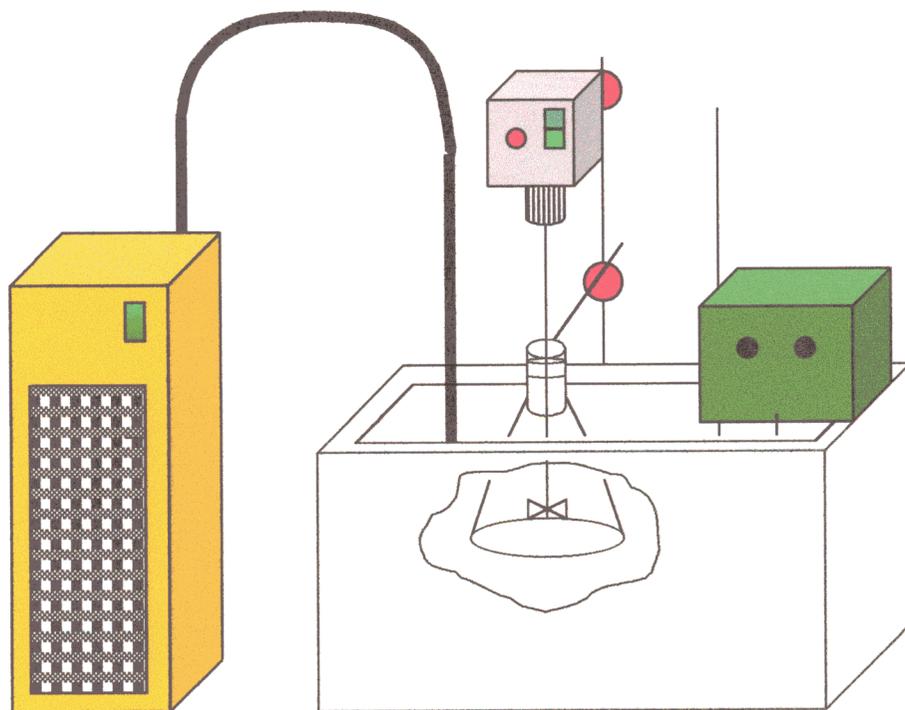


Figura 2.3.- Baño criostático Techne con unidad de frío

2.2.2.- Materiales y reactivos

Para las reacciones de hidrólisis enzimática de lactosa se ha utilizado un tampón cuya composición salina es idéntica a la de la leche (Novo, 1977). En lo sucesivo se denominará tampón BM. En cuanto a los experimentos de hidrólisis de ONPG, estos se han llevado a cabo en un tampón fosfato potásico 0,05 M pH 7, aditivado con dos activadores de β -galactosidasas: $MgCl_2$ y 2-mercaptoetanol. Se llamará tampón BP en los siguientes puntos de este trabajo. En la Tabla 2.5 se detallan las composiciones de ambos tampones. En la Tabla 2.6 se recogen los reactivos, con sus correspondientes especificaciones, que se han utilizado para la hidrólisis de los dos sustratos. Los eluyentes y otros reactivos utilizados en el análisis de los azúcares se muestran en la Tabla 2.7.

Tabla 2.5.- Composición del tampón BM y del tampón BP.

Reactivo	Marca	Pureza (%)	Concentración (mM)
Tampón BM			
Citrato sódico	PANREAC	99,9	2,70
Ácido cítrico.H ₂ O	RIEDEL-deHAEN	99,9	7,91
K ₂ SO ₄	PROBUS	99,9	1,03
K ₂ HPO ₄	RIEDEL-deHAEN	99,9	2,99
KH ₂ PO ₄	RIEDEL-deHAEN	99,9	10,80
KOH	PANREAC	99,9	14,93
MgCl ₂ .6H ₂ O	PANREAC	99,9	4,08
CaCl ₂ anhidro	PROBUS	99,9	5,10
NaOH	PANREAC	97,0	12,50
NaHCO ₃	RIEDEL-deHAEN	99,9	10,00
NaNO ₂	PROBUS	99,9	48,27
Tampón BP			
	Marca	Pureza (%)	Concentración (mM)
K ₂ HPO ₄	RIEDEL-deHAEN	99,9	50,00
KH ₂ PO ₄	RIEDEL-deHAEN	99,9	50,00
2-Mercaptoetanol	SIGMA	14.3 M	5,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	PANREAC	99,9	1,00

Tabla 2.6.- Reactivos empleados en las hidrólisis de ONPG y lactosa.

Reactivo	Marca	Pureza (%)
HCl	PANREAC	35,0
H ₂ SO ₄	PANREAC	98,0
Na ₂ CO ₃	PANREAC	98,0
o-Nitrofenol	SIGMA	>99,0
ONPG	SIGMA	>99,0
D(+) Lactosa.H ₂ O	PANREAC	99,9
D(+) Galactosa	SIGMA	98,0
D(+) Glucosa	RIEDEL-deHAEN	99,9

Tabla 2.7.- Reactivos empleados en el análisis de lactosa.

Reactivo	Marca	Pureza (%)
Sacarosa	PROBUS	99,9
Agua Milli-Q Plus	-----	100
Acetonitrilo grado HPLC-R	RIEDEL-deHAEN	98,5

2.2.3.- Métodos de análisis

Seguimiento de la reacción de hidrólisis de ONPG

El o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) es un sustrato sintético de las enzimas con actividad β-galactosidasa que, al ser hidrolizado por éstas, rinde una molécula de galactosa y otra de o-nitrofenol (ONP). El ONP da coloración amarilla en un medio cuyo pH sea neutro o básico, siendo la absorbancia a 420 nm proporcional a la concentración de dicho producto en un cierto intervalo de concentraciones del mismo. Dado que la reacción es simple, se puede seguir la evolución de reactivo y productos a lo largo del tiempo de reacción mediante un calibrado que relacione la absorbancia a 420 nm con la concentración de ONP. El calibrado se llevó a cabo disolviendo ONP en tampón

fosfato a pH 9 en el intervalo de concentraciones 0,005-0,08 g/L y midiendo su absorbancia a 420 nm, comprobándose la relación lineal absorbancia-concentración ONP en dicho intervalo. El calibrado se muestra en la Figura 2.4. y en la ecuación [2.1].

$$C_{\text{ONP}} \text{ (g/L)} = -0,001 + 0.03 \text{ Abs}_{420} \quad (\text{para Abs} < 2) \quad [2.1]$$

Seguimiento de la reacción de hidrólisis de lactosa

Los azúcares se han analizado por HPLC en fase reversa, utilizando para la separación una columna de base sílicea Kromasil-NH₂ y para la detección de los analitos un detector de dispersión de luz. Las condiciones del análisis se resumen en la Tabla 2.8.

Cada azúcar se cuantifica por el area bajo su pico. Para conocer la relación entre el area del pico y la concentración del analito y para conocer los tiempos de retención de cada analito se realizaron calibrados tanto para el reactivo como para los productos. En estos calibrados se usó sacarosa como patrón interno, ya que el detector es muy sensible a este analito y que su pico sale claramente separado tanto del pico de monosacáridos como del de lactosa. La sacarosa se utilizó en todos los casos, en muestras y en patrones a una concentración constante de 1,88 g/L. Los patrones se prepararon como se detalla a continuación:

- Partiendo de disoluciones madre de lactosa, galactosa y glucosa de concentración 50 g/L, se preparan muestras de 1 ml con concentraciones de lactosa de 50 a 0 g/L y de monosacáridos de 0 a 50 g/L, variando de una a otra la concentración de lactosa o monosacáridos de 5 en 5 g/L. Se prepararon 11 muestras patrón de diversas concentraciones.
- A estas muestras se añaden 0,5 ml de agua destilada.
- Se toman 0,3 ml de estos patrones y se les añade 0,75 ml de una solución de sacarosa a 7,5 g/L y 1,85 ml de agua destilada. Con ello, se obtienen patrones cuya concentración de analito oscila entre 0 y 3,45 g/L. Este intervalo de concentraciones es adecuado para realizar el análisis fijando la ganancia del detector en 7.

Los calibrados se muestran en las Figuras 2.5 y 2.6 y en las ecuaciones [2.2] y [2.3].

Calibrado de lactosa:

$$C_{lac} / C_{sac} = 0,00894 + 1,9777 (A_{lac} / A_{sac}) - 0,5393 (A_{lac} / A_{sac})^2 \quad [2.2]$$

Calibrado de monosacáridos:

$$C_{mon} / C_{sac} = 0,00365 + 2,2056 (A_{mon} / A_{sac}) - 0,6674 (A_{mon} / A_{sac})^2 \quad [2.3]$$

Para conocer las concentraciones de los distintos azúcares durante un experimento de hidrólisis, se toman muestras de 1 mL del medio de reacción. Para parar la reacción, se desactiva la enzima añadiendo a cada muestra 0,5 mL de H₂SO₄ 0,5 M, obteniéndose las muestras que luego se preparan para el análisis. En el caso de que la concentración de lactosa inicial sea de 50 g/L, caso que es el más común en la experimentación realizada, se procede a preparar dichas muestras siguiendo los pasos descritos a continuación:

- Se toman 0,3 mL de muestra de reacción y se neutraliza con 0,7 mL de una disolución de NaCO₃ 0,12 M.
- Se añaden 0,75 mL de una disolución de sacarosa 7,5 g/L.
- Se añaden 1,15 mL de agua destilada
- Se mezclan y la disolución resultante se pincha en el HPLC.

En los casos en que la lactosa estuviera inicialmente en una concentración superior a 50 g/L, se diluye la muestra que se toma del reactor en la proporción $C_{lac0} / 50$ g/L. Luego se procede de igual forma que en el caso de 50 g/L. Si, por el contrario, la concentración inicial de lactosa fuese inferior a 50 g/L, se reajustan los volúmenes y concentraciones de los reactivos y la muestra para que la disolución final a pinchar en el HPLC se encuentre en el intervalo de concentraciones en el que se realizaron los calibrados.

El HPLC dispone de un ordenador conectado con un software que recoge la señal que mide el detector e integra los picos del cromatograma. Con el área de cada pico se calcula, mediante el uso de los calibrados, la concentración de cada analito. En el caso de

que hubiera glucosa o galactosa inicialmente en el medio de reacción, se resta el valor de la relación de áreas de monosacáridos-sacarosa a tiempo cero a los valores obtenidos a lo largo del tiempo de reacción, para poder aplicar el calibrado monosacáridos-sacarosa. Un cromatograma típico se muestra en la Figura 2.7.

Tabla 2.8.- Condiciones del análisis de azúcares por HPLC.

Fase móvil (composición / flujo)	Acetonitrilo:H₂O milli-Q 75:25 / 1 ml/min
Columna / Temperatura columna	Kromasil-NH₂ / 30°C
Detector / Temperatura / Presión aire / ganancia del amplificador	Dispersión de luz SEDERE mod. Sedex 45 / 45°C / 2 atm / 7

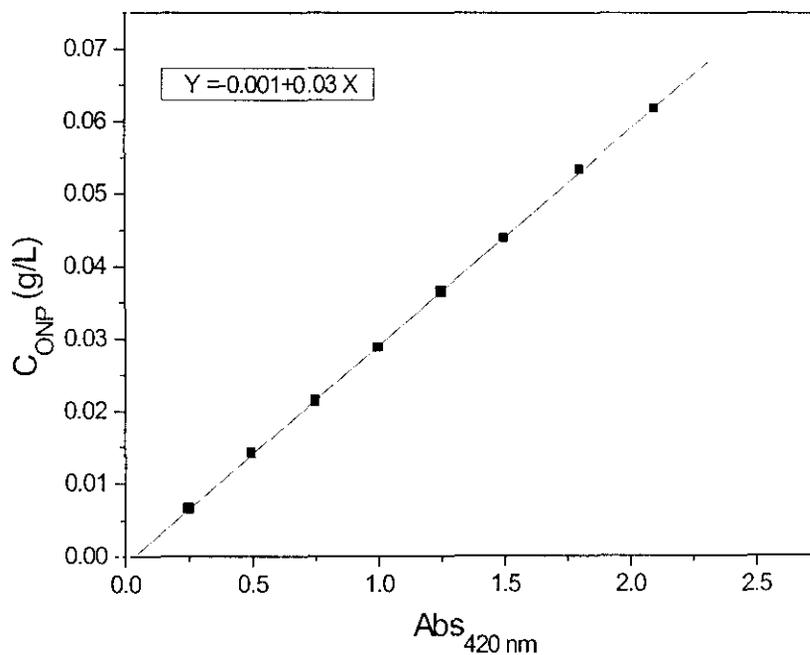


Figura 2.4.- Calibrado de o-nitrofenol a 420 nm y pH 9.

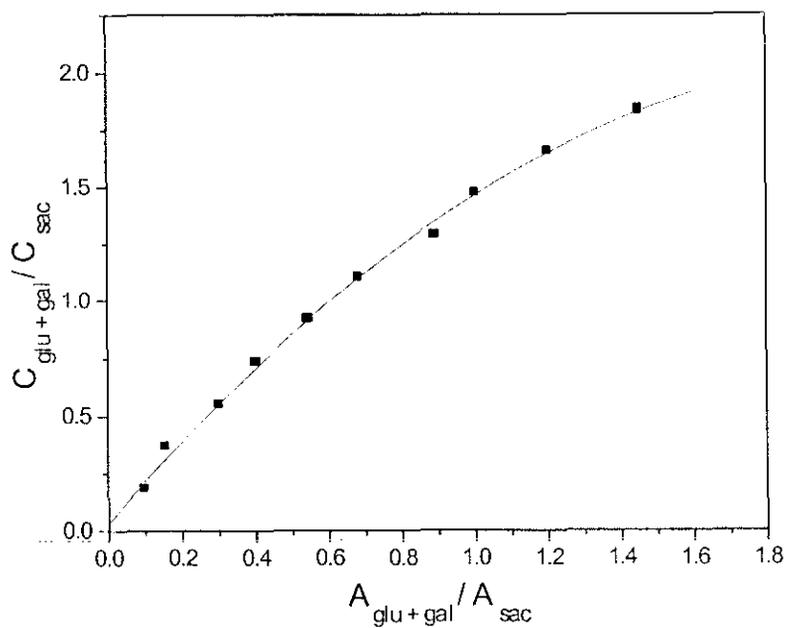


Figura 2.5.- Calibrado de monosacáridos.

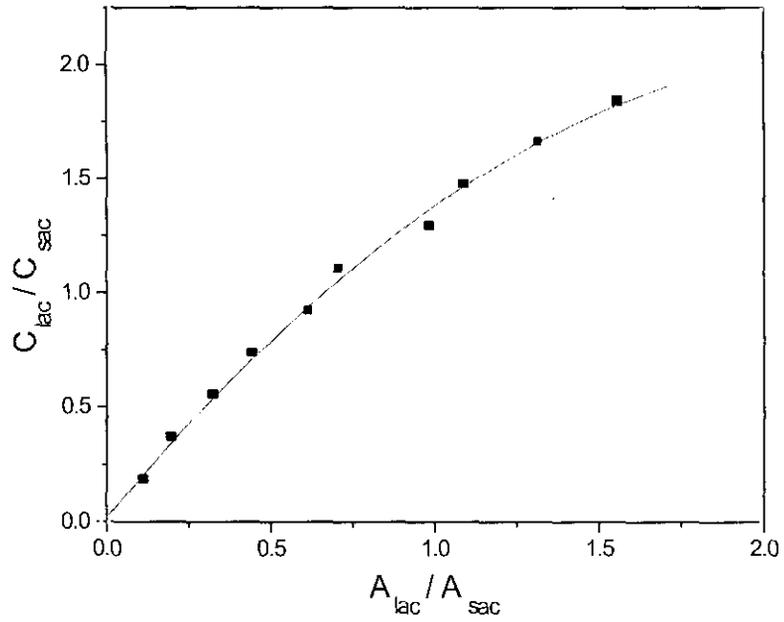


Figura 2.6.- Calibrado de lactosa.

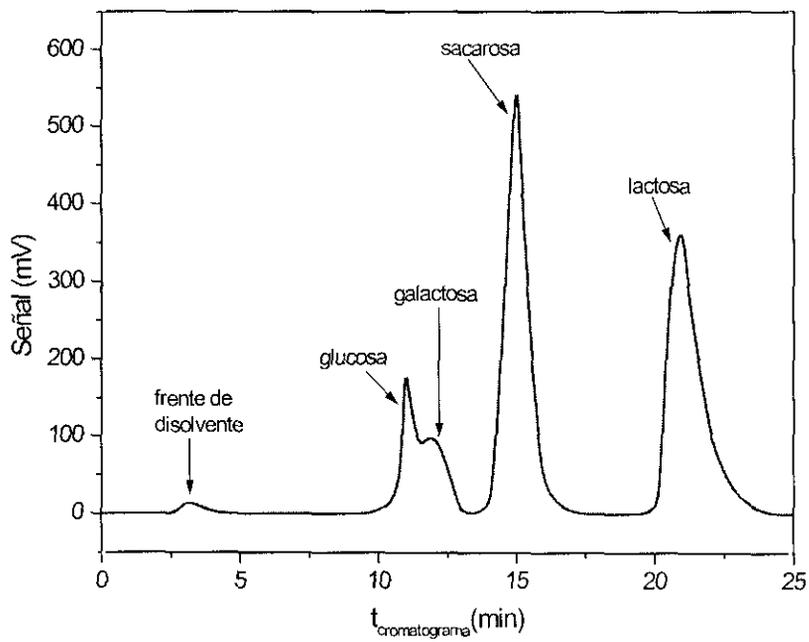


Figura 2.7.- Cromatograma de azúcares obtenido en la columna Kromasil-NH₂

2.2.4.- Desarrollo de experimentos con enzima en disolución

Experimento de hidrólisis de ONPG

La reacción de hidrólisis de ONPG se llevó a cabo en diversas ocasiones con propósitos distintos: determinar los parámetros cinéticos de la reacción, como test de actividad para observar la relación entre la actividad de la enzima y diversas variables, tales como el pH o la presencia de ciertos iones o compuestos en el medio de reacción, así como para estudiar la actividad remanente en un caldo enzimático después de someter a la enzima a procesos de desactivación térmica o por pH. Los experimentos de hidrólisis de ONPG se realizaron por el procedimiento resumido a continuación:

- Se prepara una disolución de ONPG de la concentración adecuada en BP. Se prepara una disolución de enzima en BP: diluida 1/50 si es la β -galactosidasa de *E. coli* o 1/100 si es Lactozym. Esta disolución se puede almacenar a 4°C durante meses sin que pierda actividad. También se ha almacenado en condiciones diversas para estudiar su estabilidad.
- Se toman 50 mL de dicha disolución en un matraz Erlenmeyer y se termostatan a la temperatura deseada en un baño de agitación de vaivén. En este momento se pueden añadir varias sustancias: productos (o-nitrofenol o galactosa), iones u otros compuestos que puedan afectar a la actividad de la enzima. En los experimentos de test de actividad la temperatura del baño se fijó en 25°C, la concentración de ONPG fue de 0,5 g/L y el pH del medio de reacción se ajustó a 7.
- Se añade un volumen de enzima tal que la concentración final de la misma en el medio de reacción sea de 0,7 mg/L. Se ajusta la agitación a 100-150 r.p.m.
- Se toman muestras de 1 mL durante el transcurso de la reacción y se añaden sobre tubos de ensayo en los que, previamente, se habrá mezclado 1 mL de H₂SO₄ 0,5 M con 0,44 mL de BP. De esta forma, la enzima se desnaturaliza por cambio de pH y la reacción se para.
- Se añade a cada tubo de ensayo 1,5 mL de NaCO₃ 1 M, para obtener un pH en la muestra de 9 o 10, y se mide la absorbancia de cada muestra a 420 nm. Finalmente, se utiliza el calibrado para calcular las concentraciones de reactivo y productos.

Experimento de hidrólisis de lactosa

La reacción de hidrólisis de lactosa, como la de ONPG, se estudia con varios fines: para estimar los parámetros cinéticos de la reacción, para analizar la influencia de variables como el pH o para medir la actividad remanente de la enzima tras someter a esta a temperaturas altas a varios tiempos de almacenamiento. El procedimiento se puede resumir en los siguientes puntos:

- Se prepara una disolución de lactosa de la concentración adecuada en BM. Se prepara una disolución de enzima en BM: diluida 1/50 si es la β -galactosidasa de *E. coli* o 1/100 si es Lactozym.
- Se vierten 50 mL de dicha disolución en un matraz Erlenmeyer y se termostatiza a la temperatura del experimento. En este momento, se pueden añadir sustancias tales como los productos de reacción en concentración conocida o bien iones u otros compuestos cuyo efecto sobre esta reacción queramos observar. Cuando se trate de realizar un test de actividad de la enzima tras una desactivación o de medir actividades de la enzima frente a activadores o a inhibidores, se elige siempre una concentración de lactosa de 50 g/L y una temperatura de trabajo de 40°C.
- Se añade un volumen de enzima adecuado a la concentración de enzima requerida (entre 1 y 11 mg/L). Se ajusta la agitación de la cubeta a 100-150 r.p.m. En los experimentos de actividad la concentración de enzima es de 7 mg/L.
- Se toman, en el transcurso de la reacción, muestras de 1 mL, que se añaden a tubos Eppendorf con 0,5 mL de H₂SO₄ cada uno. El pH del medio disminuye a 2 y la reacción queda parada. Estas muestras son posteriormente analizadas por HPLC como se describió en el apartado 2.2.3.

2.3.- EXPERIMENTACION CON LA ENZIMA INMOVILIZADA

2.3.1.- Equipos e instalaciones

Para los experimentos de inmovilización y en el seguimiento de la actividad en el sobrenadante durante el proceso de inmovilización se han utilizado los baños

termostáticos de vaivén ya descritos en el apartado 2.2.1. Para seguir la actividad de los inmovilizados, estudiar la cinética de las reacciones de hidrólisis de ONPG o lactosa de los mismos, estudiar la desactivación térmica o el efecto de ciertas sustancias sobre la actividad o estudiar la difusión en presencia de reacción química se utilizan matraces Erlenmeyer como reactores discontinuos que son sumergidos en un baño termostático y agitados mediante hélices acopladas a agitadores SCHOTT RM 144 D con display digital de la velocidad de giro. Este equipo se esquematiza, junto con el baño criostático TECHNE, en la Figura 2.3.

Para el estudio de la difusión en ausencia de reacción química y para los experimentos de hidrólisis de lactosa en continuo se hace uso de dos instalaciones que se describen a continuación.

Medida de D_c en ausencia de reacción química

Este montaje se realizó utilizando el HPLC según el esquema de la Figura 2.8 Se distinguen varias partes:

- **Depósito de eluyente:** como fase móvil se utiliza agua milli-Q.
- **Bombas:** la del HPLC ya descrita en el apartado 2.2.1.
- **Inyector:** se inyectan 20 μL de muestra con el autoinyector descrito en el apartado 2.2.1.
- **Columna:** la columna, hecha a propósito para el experimento, está dentro de un horno para mantener la temperatura constante durante los experimentos.
- **Detector:** cuando el compuesto inyectado es lactosa se utiliza el detector de dispersión de luz (SEDERE modelo SEDEX 45), si es ONPG se usa el detector de UV (PERKIN ELMER modelo LC 75).
- **Adquisición de datos:** mediante un ordenador que dispone de un programa de adquisición y tratamiento de datos cromatográficos (Integration Pack versión 3.9 de KONTRON) instalado en el mismo se toman datos de tiempo-mV de cada cromatograma, lo que luego se utilizará en los cálculos.

Hidrólisis de lactosa en continuo

Para los experimentos de hidrólisis de lactosa en continuo utilizando enzima inmovilizada se montó una pequeña planta piloto según el esquema de la Figura 2.9, que consta de las siguientes partes:

a) Zona de alimentación:

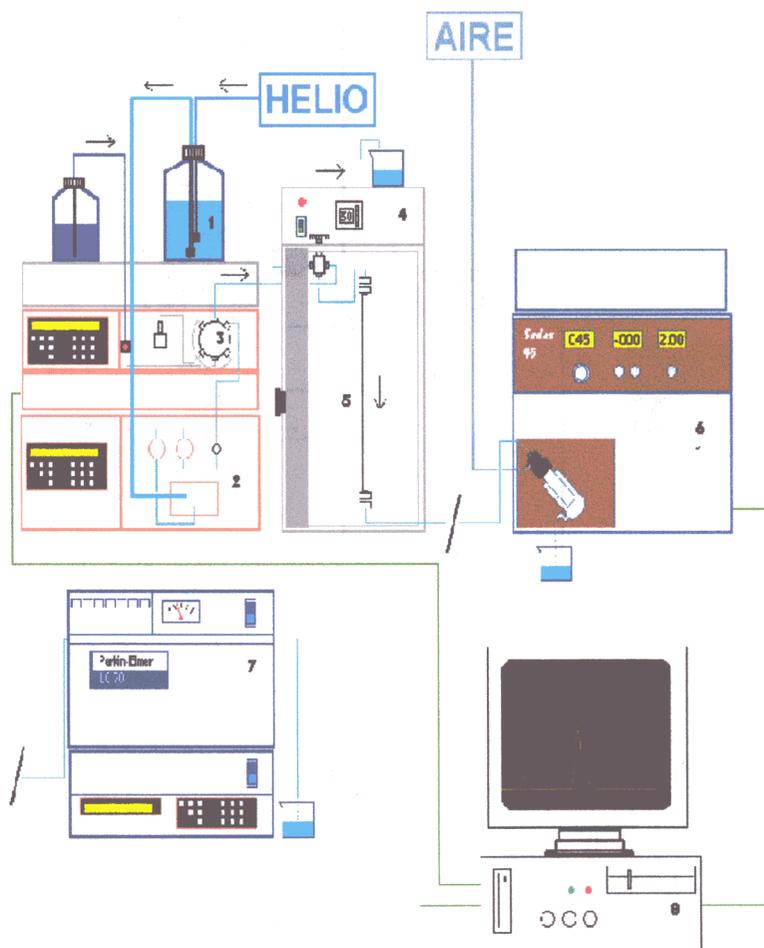
- **Depósito de almacenamiento:** es de acero inoxidable y está provisto de un serpentín para su termostatización y de una tapa con 3 salidas roscadas. Dispone de una válvula para el desagüe en el fondo del recipiente. El serpentín se conecta al baño criostático, con lo que se puede mantener la solución de lactosa a baja temperatura (4°C) en esta zona.
- **Control del caudal de alimentación:** según el caudal de experimentación se dispone de varias bombas dosificadoras de diafragma (marca ALLDOS; modelos M205). Las bombas montadas en el equipo son dos: una da un caudal máximo de 0,8 L/h con una pérdida de presión de 10 atm., la otra da un caudal máximo de 0,2 L/h con la misma pérdida de presión. Se pueden regular estas bombas por frecuencia de bombeo y por recorrido de la carrera del pistón, se utiliza la frecuencia de pulsación como controladora del caudal de bombeo. Estas bombas disponen de un sistema de purgado de aire.
- **Medida del caudal de alimentación:** consiste en orificios medidores unidos a magistrales para medir la pérdida de carga. La diferencia de altura de las ramas está ligada al caudal que pasa por el capilar. Los calibrados para las bombas de 0,2 L/h y de 0,8 L/h se muestran en las Figuras 2.10 y 2.11, relacionando diferencia de altura, frecuencia de bombeo y caudal del bombeo.
- **Termostatización del alimento:** se realiza mediante un refrigerante de espiral conectado a una tubería de 6 mm de teflón mediante uniones de 6 mm en polipropileno. A la salida de esta zona se montan termopares en uniones en T de 6mm en polipropileno y un septum. Esto permite conocer la temperatura de la alimentación a la salida del precalentador.

b) Zona de reacción:

- **Reactor:** es un BSTR (basket stirred tank reactor) encamisado para termostatar el medio de reacción. La alimentación se introduce por la parte superior del reactor y la salida se hace por el fondo. La cesta consiste en dos mallas cilíndricas concéntricas de acero inoxidable de 0,5 mm de luz de malla montadas sobre bastidores, de tal forma que puede contener sólido, o bien usarse como soporte para otras cestas más pequeñas en forma de sobre donde se ha introducido el sólido. Se ha colocado una escala que permite relacionar el nivel con el volumen de líquido en el reactor. El control de nivel se logra por vasos comunicantes, ya que la tubería de salida se acopla a un codo con salida a la atmósfera. La altura de la salida puede ser regulada con ayuda de la escala ya mencionada. El nivel de líquido en el reactor coincidirá con la altura de dicha salida. El efluente del reactor vierte en un depósito de residuos situado al final de la instalación. El reactor está dotado también de una tapa con tres entradas para tubería de 6 mm y otra para un termopar. La capacidad máxima del reactor es de 0,6 L. La agitación se consigue mediante tres turbinas montadas sobre un eje.

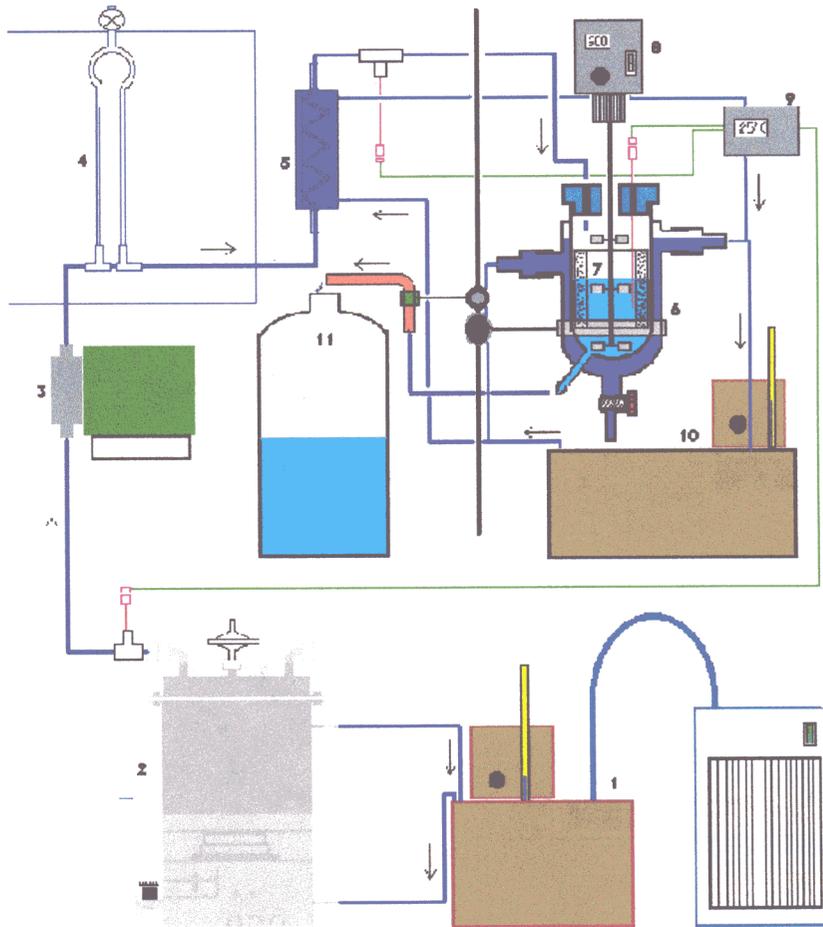
Se colocan termopares en la zona de alimentación, en la zona de precalentamiento y en el reactor. Todos están conectados a un display digital. Tanto la zona de precalentamiento como los reactores están a temperatura constante mediante un baño termostático de 27 L de capacidad dotado de una cabeza calefactora con bomba de circulación SELECTA modelo TECTRON 373100. Otros equipos utilizados, aparte de los ya mencionados en el apartado 2.2.1, son:

- Bomba peristáltica MILLIPORE modelo nº XX8200230.
- Filtro estéril de alta capacidad MILLIPORE modelo MILLIPAK-40 0,22 μm .
- Estufa de desecación con circulación forzada de aire, con regulación electrónica, lectura digital con reloj desconector de 24 horas, KOWELL modelo D2-AF-I (monofásica, 1500 W, 60-300°C \pm 1°C).
- Conductímetro HANNA ATC HI 8820.
- Microscopio confocal de fluorescencia BIORAD MRC-500 (escaneado lento)
- Lupa WILD de 9x a 60x dotada de cámara fotográfica para película de 35 mm.



- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1. Eluyente (agua Milli-Q) | 5. Columna |
| 2. Bomba HPLC | 6. Detector de dispersión de luz |
| 3. Autoinyector | 7. Detector ultravioleta |
| 4. Termostato | 8. Ordenador para toma de datos |

Figura 2.8.- Instalación para la medida de D_e en ausencia de reacción química



- | | | |
|-------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 1. Baño criogénico | 5. Precalentador | 9. Indicador de temperaturas |
| 2. Depósito de alimento | 6. Reactor BSTR | 10. Baño termostático |
| 3. Bomba dosificadora | 7. Cesta | 11. Depósito de residuos |
| 4. Magistral | 8. Motor de agitación | |

Figura 2.9.- Instalación para los experimentos de hidrólisis de lactosa en continuo

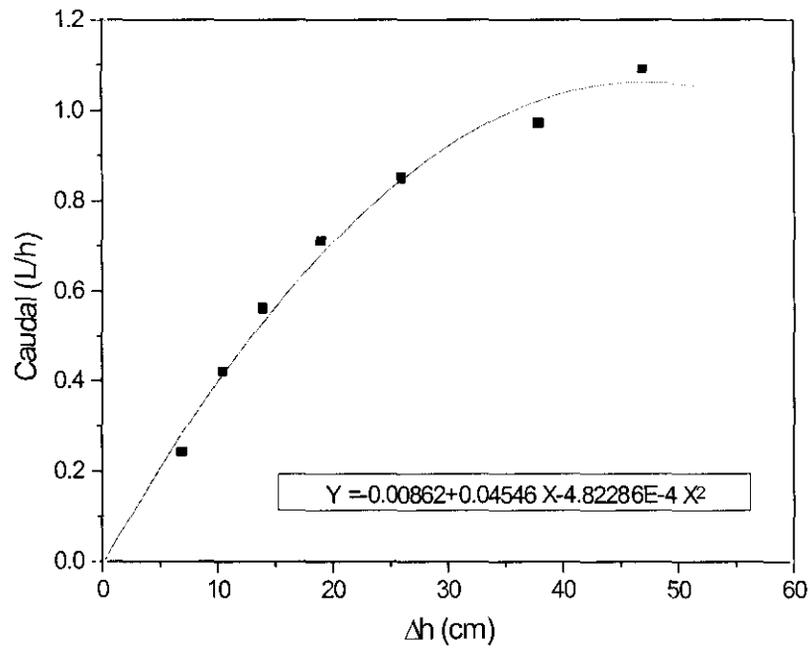


Figura 2.10.- Calibrado del magistral de la bomba de 0,8 L/h

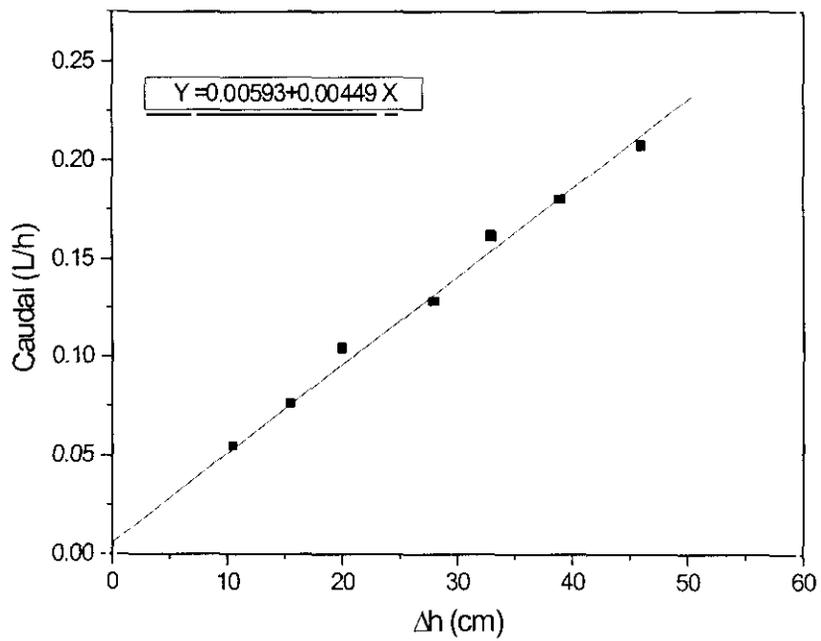


Figura 2.11.- Calibrado del magistral de la bomba de 0,2 L/h

2.3.2.- Materiales y reactivos

Soporte

El soporte utilizado para la inmovilización de la enzima ha sido una sílice-alúmina comercial, de Südchemie (referencia KA-3), de geometría esférica y con un tamaño de 5-6 mm de diámetro. Las partículas de tamaños menores se obtienen por fragmentación y tamizado. Los tamices utilizados, CISA, tienen las siguientes luces (en mm): 0,1; 0,2; 0,32; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 2,0 y 3,0.

Este soporte tiene una estructura porosa bimodal (Santos, 1992), presentando micro y macroporosidad, siendo sus propiedades físicas las que se recogen en la Tabla 2.9. En la Figura 2.12 se presenta la distribución de radio de poros obtenida mediante porosimetría de Hg y desorción de N₂ y en la Figura 2.13 se muestran fotografías del catalizador, obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), en la que se aprecia claramente la estructura bimodal que presenta el sólido (granos porosos).

Reactivos

Los reactivos utilizados en la inmovilización de las enzimas se detallan en la Tabla 2.10. Los reactivos utilizados en las reacciones de hidrólisis de ONPG y lactosa y en las de medida de actividad y de estabilidad de los inmovilizados son idénticos a los utilizados con las enzimas en disolución, ya descritos en el apartado 2.2.2.

Tabla 2.9.- Propiedades del soporte KA-3 de $\text{SiO}_2\text{Al}_2\text{O}_3$

Composición	$\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
V_p	0,587
ρ_p	0,912
ϵ (total)	0,535
ϵ_M	0,219
ϵ_μ	0,316
r_M (amstrongs)	3330
r_μ (amstrongs)	45
S_g ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	126
S_{gM} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	10
$S_{g\mu}$ ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	116

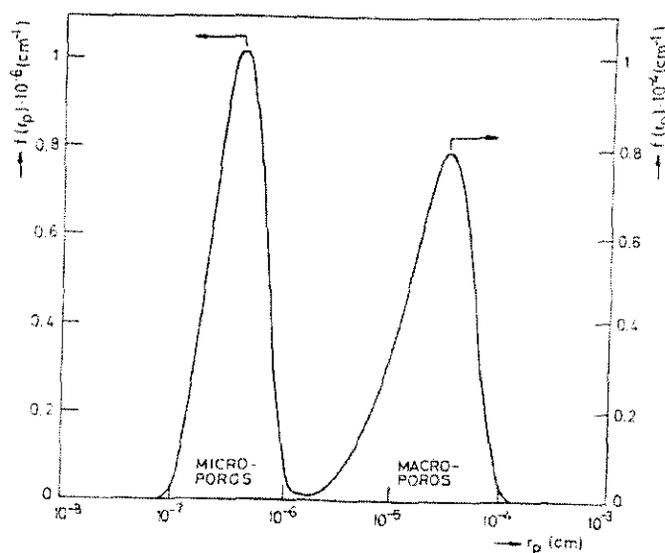


Figura 2.12.- Función de distribución de radio de poros del soporte KA-3.

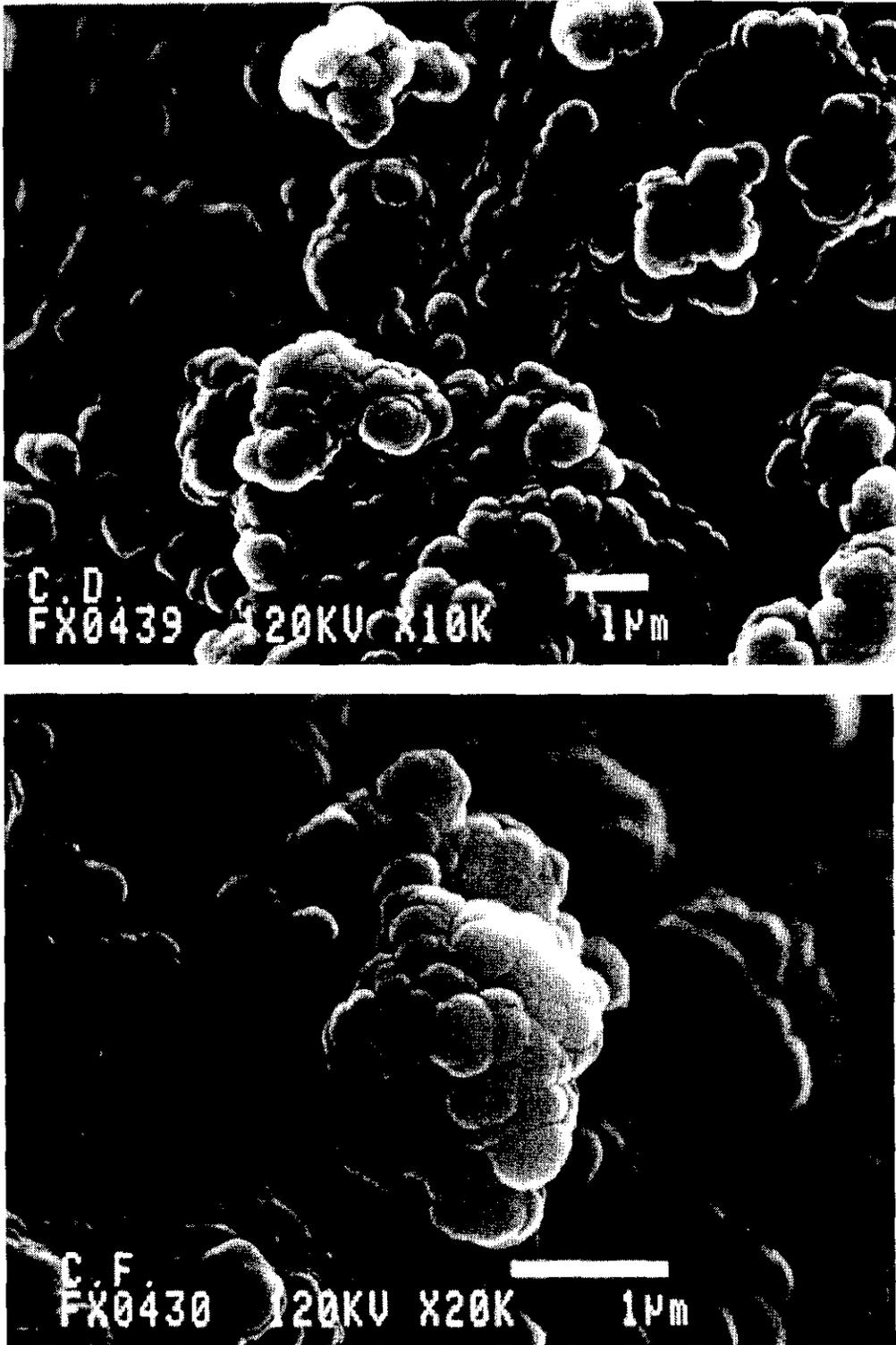


Figura 2.13.- Fotografías de la superficie del soporte KA-3 mediante SEM (10000 y 20000 aumentos, respectivamente)

Tabla 2.10.- Reactivos empleados en la inmovilización de las enzimas (aparte de los de la tabla 2.6)

Reactivo	Marca	Pureza
HNO ₃	PANREAC	99,9%
3-aminopropiltriethoxisilano	FLUKA	99,9%
Glutaraldehido grado II	SIGMA, RIEDEL-deHAEN	25 % (aq)
Glutaraldehido grado fotográfico	SIGMA	50 % (aq)
NaBH ₄	FLUKA	99,9%
Coomassie Brilliant Blue G-250	PANREAC	99,9%
H ₃ PO ₄	RIEDEL-deHAEN	99,9%
Etanol	PANREAC	96,0%
FITC	SIGMA	99,9%

2.3.3.- Métodos de análisis

Seguimiento del proceso de inmovilización y de la reacción con enzima inmovilizada

La inmovilización de la enzima en el soporte se sigue mediante la medida de la actividad de la enzima remanente en el líquido frente a ONPG y la medida de la proteína presente en el mismo líquido. El método de análisis de la actividad es idéntico al descrito en el apartado 2.2.3. El método de análisis de la proteína que queda en el líquido se resume en los siguientes pasos:

- Se toma una cantidad de muestra del sobrenadante y se diluye en BP hasta que la concentración de proteínas en la muestra a analizar no sobrepase los 0,165 mg/mL. Para calcular la dilución necesaria se considera la concentración de proteínas que hay en el medio al comienzo de la inmovilización.
- En un tubo de ensayo se mezclan 0,9 mL de la muestra así preparada y 2,7 mL de reactivo de Bradford; se espera 15 minutos.
- Se mide la absorbancia de la muestra a 595 nm frente a un blanco obtenido mediante la mezcla de 0,9 mL de BP con 2,7 mL de reactivo de Bradford.

La relación entre la Abs a 595 nm y la concentración de proteínas se conoce mediante un calibrado que se hace previamente, tratando con el reactivo de Bradford muestras de proteína de concentración conocida, sea de Lactozym o de la β -galactosidasa de *E. coli*. Los calibrados se presentan en las Figuras 2.14 y 2.15 y en las ecuaciones [2.4] y [2.5].

$$C_{\text{proteína}} (\text{mg Lactozym} / \text{L}) = 0,92 + 126,15 \text{ Abs}_{595} + 68,26 \text{ Abs}_{595}^2 \quad [2.4]$$

$$C_{\text{proteína}} (\text{mg } \beta\text{-gal } E. coli / \text{L}) = -0,51 + 87,54 \text{ Abs}_{595} + 65,76 \text{ Abs}_{595}^2 \quad [2.5]$$

Esta medida de proteínas se realiza siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en la observación de que el colorante Coomassie Brilliant Blue forma complejos con las proteínas. Dicha reacción provoca en el medio un cambio de color, ya que el complejo es de color azul y el colorante libre presenta tonalidad roja. El complejo formado es estable durante, al menos, 1 hora, hasta que precipita en forma de placas azules. El reactivo de Bradford se prepara de la siguiente manera:

- Se mezclan 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol al 96%, 100 mL de H_3PO_4 y se enrasa hasta 1 L con agua destilada.
- Se filtra tras agitar y se mantiene en botella opaca a temperatura ambiente.

Respecto a los experimentos de medida de actividad o de estabilidad de la enzima inmovilizada y a los estudios difusionales en presencia de reacción química, los métodos de análisis de reactivos y productos son los descritos en el apartado 2.2.3. y los aparatos usados para ello son los mismos descritos en el apartado 2.2.1.

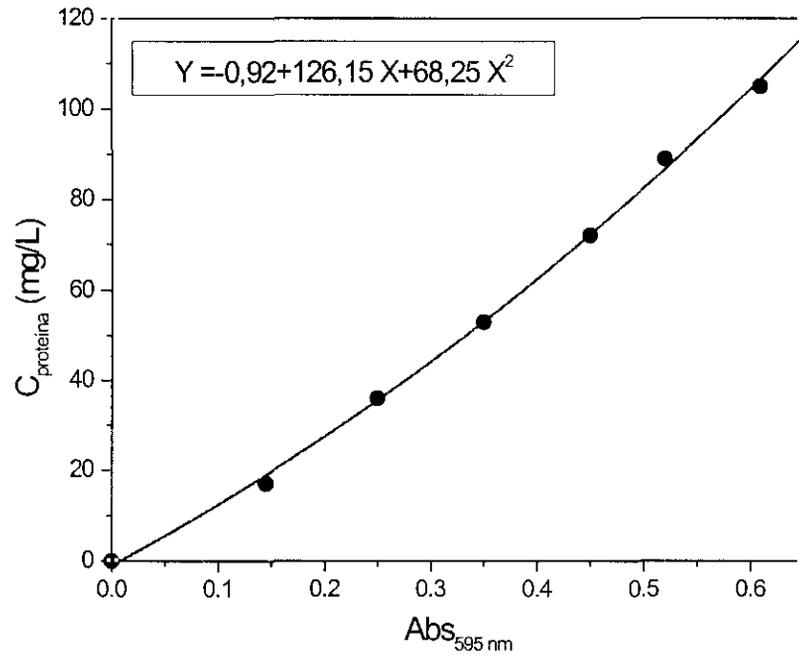


Figura 2.14.- Calibrado C_{proteina} en Lactozym – $Abs_{595 \text{ nm}}$

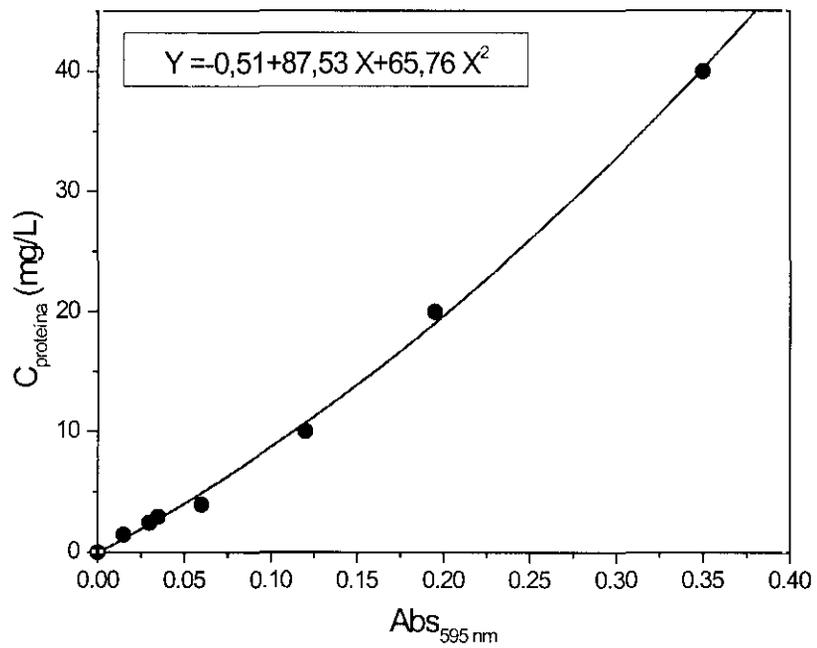


Figura 2.15.- Calibrado C_{proteina} en β -gal *E. coli* – $Abs_{595 \text{ nm}}$

Análisis de la distribución de proteína en un inmovilizado

Para determinar la distribución de proteína en una partícula sólida porosa se pueden utilizar varias técnicas microscópicas, tanto mediante marcaje de la proteína con colorantes como el Naphthol Blue Black, el Coomassie Brilliant Blue u otros tintes (Ampon, 1992; Carleymith y col., 1980) como mediante el marcaje con fluoroforos, como el isotiocianato de fluoresceína –FITC- (Pinto y Macias, 1995; Mullon y col., 1988; Lasch y Kühnau, 1986). Mientras que el marcaje con tintes sirve para determinar de forma cualitativa cómo se distribuye la proteína en la partícula, el marcaje con FITC permite el estudio cuantitativo del perfil de proteína.

Otra posibilidad muy interesante en la obtención de estos perfiles es la posibilidad de utilizar la microscopía de fluorescencia confocal (Pinto y Macias, 1995), que permite realizar cortes ópticos del ejemplar en estudio cuando este es transparente a la radiación de excitación y a la radiación emitida y obtener la fluorescencia correspondiente a un solo plano perpendicular a la radiación, a diferencia de la microscopía de fluorescencia tradicional, que sólo permite la recolección de emisiones procedentes de todos los planos, con lo que se produce una imagen poco nítida. En la Figura 2.16 se esquematiza el funcionamiento de un microscopio confocal. Los modernos programas de tratamiento de imagen permiten una cuantificación eficaz de la radiación emitida, especialmente si se hace uso de un calibrado adecuado del par proteína-FITC. De esta forma, se ha mejorado sensiblemente las técnicas ópticas y de tratamiento de imagen aplicadas en el pasado para obtener la distribución de proteínas inmovilizadas (Mullon y col., 1988).

La obtención de perfiles numéricos de proteína será de utilidad para realizar el acople de reacción-difusión en el interior de la partícula de soporte con la enzima inmovilizada. Como el FITC reacciona tanto con grupos alcohol como, en menor grado, con grupos amino, se debe marcar la proteína a inmovilizar antes de proceder a su fijación en el soporte activado, a no ser que éste no posea este tipo de grupos en la superficie, que no es el caso. El marcaje de la proteína se realiza según el siguiente protocolo:

- Se prepara una solución de FITC, con una concentración de 10 mg/ mL, en tetrahidrofurano.
- Se mezclan 2 mL de Lactozym con 1,8 mL de BP y 0,2 mL de solución de FITC en un recipiente opaco. La solución de FITC conviene añadirla poco a poco y agitando, para evitar que se formen precipitados (el FITC es poco soluble en agua).
- Se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Durante este tiempo se cargan en una columna 12 g de Sephadex G-25-50 ya estabilizado en BP previamente (hervir durante 2 horas o dejar en BP 24 h a temperatura ambiente). Se lava la columna con tampón BP, eliminando con ayuda de una bomba peristáltica el aire retenido en la salida de la columna.
- Se carga el contenido del recipiente opaco en la columna, se deja que penetre en ella y se eluye con BP, recogándose las muestras en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Se obtienen dos picos, uno entre 10 y 22 minutos y otro a los 60 minutos, aproximadamente. El primero corresponde a la proteína marcada, como se puede comprobar diluyendo y midiendo la proteína por Bradford o añadiendo a un tubo con ONPG muestras de este pico (la enzima conserva la actividad aún marcada con FITC). El segundo es el FITC restante y otras pequeñas moléculas marcadas o no. Si se quiere que se conserve la actividad, hay que eluir con BP y no con cualquier tampón fosfato sin mercaptoetanol, porque este quedaría retenido en la columna y la enzima se desactivaría. Un pico de proteína típico se puede observar en la Figura 2.17.
- Se mide la proteína de cada muestra del primer pico mediante el método de Bradford, ya que, dada la cantidad elevada de proteína y FITC en estas muestras, se puede seguir también a 490 nm por el color amarillo que se observa. Conocida la cantidad de proteína de cada muestra, estas se pueden mezclar para obtener una solución concentrada de proteína marcada, de la cual, por dilución en BP, se obtiene la solución de enzima que se aplica en la inmovilización.

Tras realizar la inmovilización con la proteína marcada, se debe preparar la muestra para microscopía confocal. La preparación consiste en cortar por presión el ejemplar en una mordaza y luego pulirlo con una minifresadora. Esta preparación es adecuada para partículas de sílice-alúmina de tamaño superior a 2 mm.

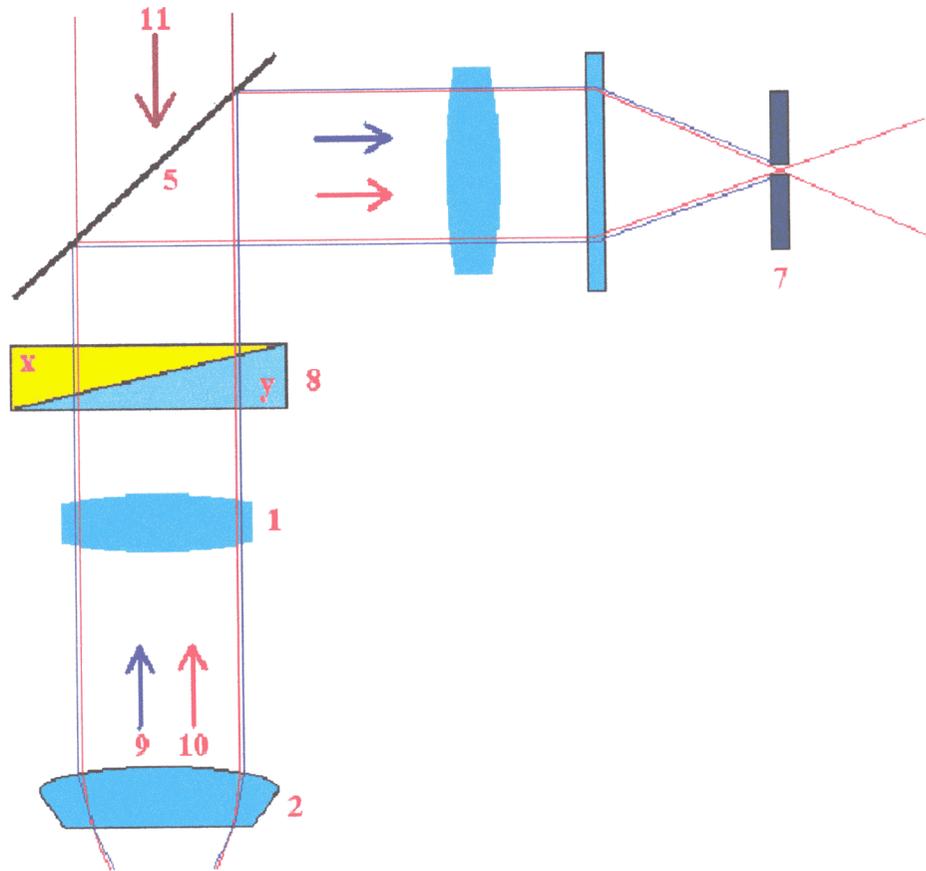
La obtención de diferentes planos en el microscopio confocal permite seleccionar el plano ecuatorial. En el caso de la sílice-alúmina, este plano se obtiene por corte físico de la partícula, cuando se utilizan geles o vidrio de poro controlado (CPG), al ser transparentes a la radiación, se pueden hacer cortes ópticos. La imagen obtenida es analizada con ayuda de un programa de tratamiento de imagen, como el Photoshop 4.0 de Adobe. La imagen es dividida en bits, a cada cual corresponde un grado de verde. El color verde, propio del FITC, varía en la escala RVA desde 0 a 255. Con ayuda del histograma de la imagen y suponiendo que la partícula es esférica (se considera una esfera de radio equivalente) y que la distribución es tal que hay más proteína hacia el exterior de la partícula – lo que se observa visualmente en las imágenes- se puede cuantificar la cantidad de proteína por capa de la esfera y obtener un gradiente de proteína desde la superficie hacia el centro de la partícula. Este gradiente es exacto en cuanto se acopla con un calibrado concentración-fluorescencia-nivel de color, hecho en el mismo microscopio con muestras de proteína marcada. El calibrado se muestra en la Figura 2.18. Además, la fluorescencia es proporcional a la concentración de enzima.

El valor del factor de proporcionalidad se calcula según la ecuación [2.6], donde $I(x)$ es un valor de color RVA, que es como se mide la intensidad de fluorescencia al radio adimensional x y C_{EW} medio es la concentración promedio de enzima en la partícula.

$$b = \frac{\overline{C_{E_w}}}{3 \int_0^1 I(x) x^2 dx} \therefore C_{E_w} = b I(x) \quad [2.6]$$

Durante la activación del soporte, al hacer reaccionar el glutaraldehído con los grupos amino que hay en superficie, se produce un cambio de color blanco a marrón. Se puede apreciar la extensión del frente de reacción por microscopía óptica, al menos cuando la partícula es grande (esferas de 5-6 mm de diámetro). Basta hacer el corte con ayuda de la mordaza para preparar los especímenes. Posteriormente, con ayuda de una lupa con cámara incorporada, se obtienen fotografías de los cortes y se puede calcular el espesor de la capa activada con glutaraldehído, que, como se verá, es la que luego

reacciona con la enzima. La utilización de programas de tratamiento de imágenes permite, además, conocer si hay gradiente de glutaraldehído en la zona activada, al menos de forma aproximada.



- | | |
|------------------------|---|
| 1. Lentes del tubo | 6. Fotodetector |
| 2. Objetivos | 7. Agujero para eliminar señales desenfocadas |
| 3. Plano fuera de foco | 8. Scanner |
| 4. Plano enfocado | 9. Rayo emitido desde plano desenfocado |
| 5. Reflector dicróico | 10. Rayo emitido desde plano enfocado |

Figura 2.16.- Esquema del funcionamiento de un microscopio confocal .

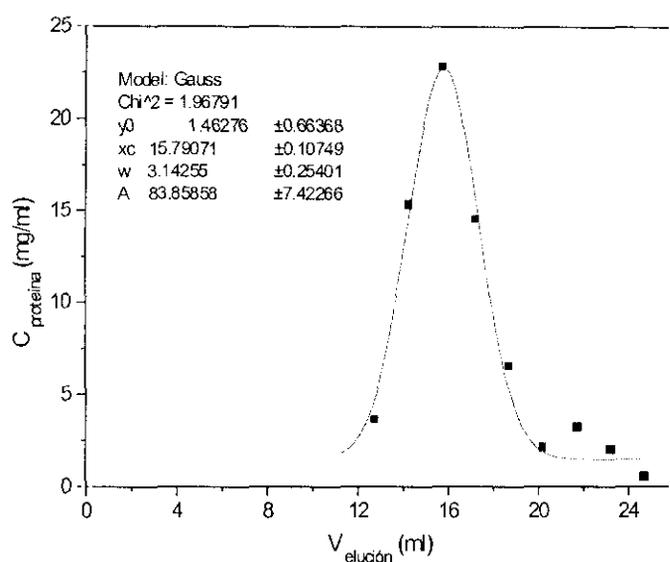


Figura 2.17.- Pico de proteína marcada analizada por el método de Bradford.

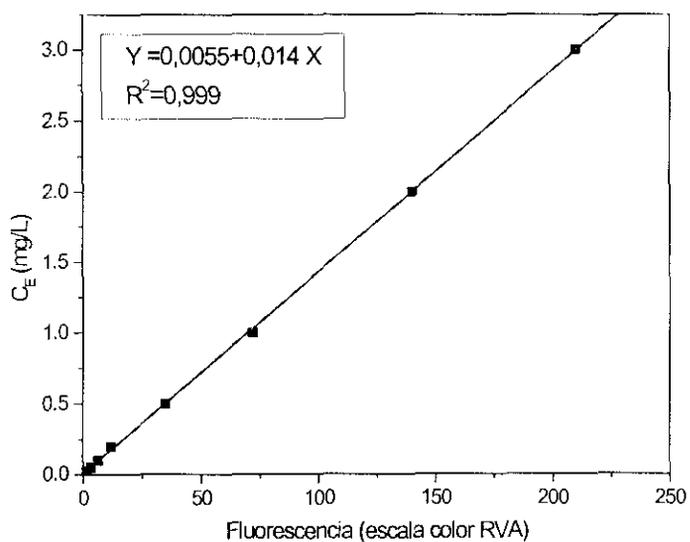


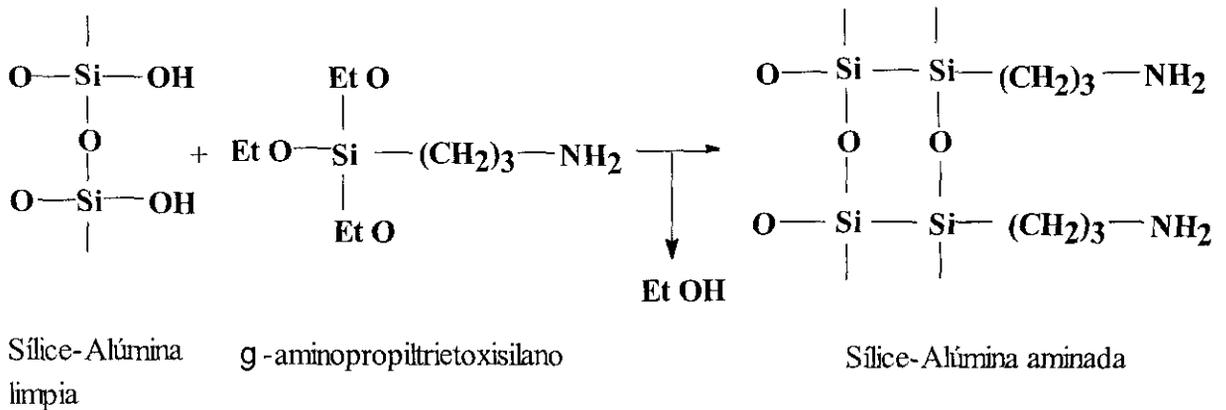
Figura 2.18.- Calibrado de la concentración de proteína vs. fluorescencia.

2.3.4.- Desarrollo de los experimentos

Experimento de inmovilización de enzima

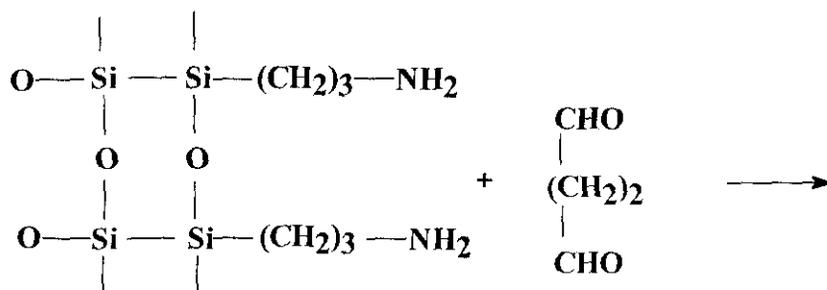
Para llevar a cabo experimento hay que seguir las siguientes etapas:

- Las partículas esféricas del soporte de sílice-alúmina son fragmentadas y tamizadas, recogiendo las fracciones del tamaño de partícula adecuado.
- Se limpia el soporte de todo adsorbato mediante el uso de ácido nítrico al 5%. Se sumerge en la solución ácida en una proporción 1 g/10 mL y se calienta a 85°C durante 2 horas, utilizándose para ello el baño termostático con agitación de vaivén. La agitación se fija en 72 r.p.m..
- Se decanta el líquido sobrenadante y se lava el soporte con abundante agua destilada. Se deja secar 24 horas en estufa a 110°C.
- El soporte es tratado con γ -aminopropiltriétoxissilano (γ -APTES). Se utiliza una relación 20 mL de disolución de silano, de la concentración elegida en agua destilada a pH 3-4 por cada gramo de soporte. El tratamiento se realiza a 75°C, durante 2 a 3,5 horas y con agitación de vaivén (72 r.p.m.). La reacción que tiene lugar es:



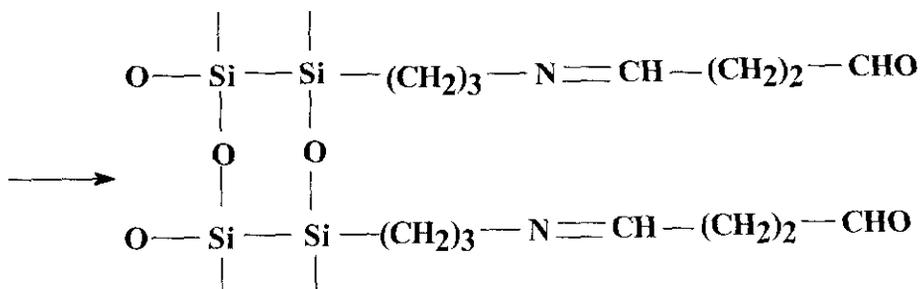
- Se lava de nuevo con abundante agua destilada y se deja secar en estufa a 110°C durante 12-18 horas. El soporte silanizado puede guardarse para su uso posterior.

- Se trata el soporte silanizado con glutaraldehído, en la concentración adecuada en BP, a 25°C durante 2-3 horas en el baño termostático de vaivén con agitación de 72 r.p.m. En este paso, la relación utilizada es 15 mL de solución por cada gramo de soporte, de acuerdo a:



Sílice-Alúmina aminada

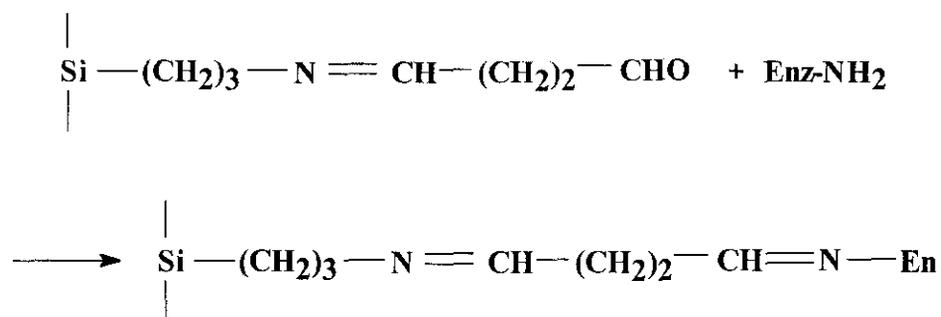
Glutaraldehído



Formación de imina, Sílice-alúmina activada

- Se lava el sólido con abundante BP hasta que no huelga a glutaraldehído y se almacena el sólido en 25 mL de dicho tampón.
- Se prepara una disolución de la enzima de Novo en 25 mL de BP, al doble de la concentración final requerida en el proceso de inmovilización.
- Se termostatan en el baño de incubación a 25°C por separado la solución enzimática y la que contiene el sólido.

- Se mezclan y se ajusta la velocidad de agitación a 72 r.p.m. La relación final sólido/volumen de líquido de inmovilización es 1 g/10 mL.



- De forma simultánea se prepara un blanco con la enzima en la misma concentración pero en ausencia de sólido en el Erlenmeyer.

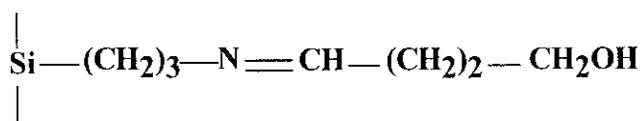
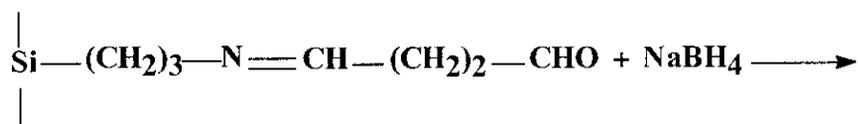
Para seguir la inmovilización de la enzima se realizan las siguientes operaciones:

- Se toman volúmenes de muestra de 1 a 1,5 mL a distintos tiempos de inmovilización para medir la actividad y la proteína remanentes en el sobrenadante. Esta operación se hace hasta que no haya variación apreciable en los valores de estas variables.
- De esta muestra se toma un cierto volumen, calculado para que la concentración máxima de enzima en el medio de reacción no sobrepase un valor fijado (0,7 mg/L), calculado respecto a la concentración de enzima al comienzo de la inmovilización, añadiéndose a un Erlenmeyer que contiene 50 ml de ONPG 0,5 g/L, ya termostatizado a 25°C. Se toman muestras de la reacción a varios tiempos. El procedimiento es idéntico al ya explicado para los experimentos de determinación de la cinética de la hidrólisis de ONPG con la enzima en solución.
- Para medir proteínas en las muestras de líquido sobrenadante, se toma un cierto volumen de muestra que es diluido con BP para que la concentración de proteínas esté en el intervalo de concentraciones del calibrado. A continuación, se mezclan 0,9 mL de esta solución y 2,7 mL de reactivo de Bradford. Se mide la absorbancia a 595 nm frente a un blanco hecho con BP y el reactivo de Bradford, una vez hayan transcurrido unos 15 minutos desde la mezcla.

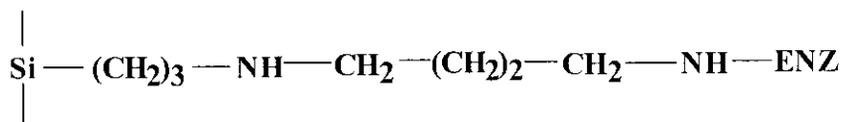
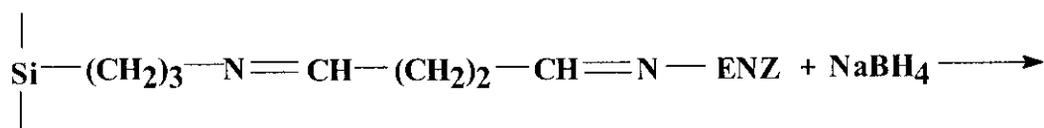
Cuando varias medidas de actividad y de proteína en el sobrenadante a tiempos consecutivos de inmovilización sean constantes, se puede dar por finalizada la inmovilización. Para finalizar esta operación hay que utilizar el siguiente procedimiento:

- Se lava el sólido con BP, guardándose las aguas de lavado para medir posteriormente la concentración de proteínas y la actividad enzimática. En este caso, para medir la actividad, se mezclan 10 mL de aguas de lavado y 40 mL de una solución de ONPG, en una concentración de 0,625 g/L en BP, tras termostatar ambas a 25°C.
- Se deja el sólido en BP (proporción 10 mL BP/g de soporte) y se añade NaBH₄ en concentración 1 mg/ m, se deja reaccionar durante 1 hora. El NaBH₄ es un agente reductor que estabiliza los enlaces imina, transformándolos en enlaces amina. Además, también actúa sobre los grupos aldehído de la superficie que no hayan reaccionado con la enzima, transformándolos parcialmente en grupos alcohol.

1)



2)



- Se decanta y se lava el sólido 2 veces con BP y se almacena en dicho tampón a 4°C.

Experimento de hidrólisis de ONPG en discontinuo

Este tipo de experimento se lleva a cabo cuando se estudia la cinética de la hidrólisis de ONPG por las enzimas inmovilizadas, cuando se caracterizan las mismas o cuando se hacen experimentos previos a los estudios cinéticos (los que llevan a asegurar que la reacción química es la que controla la velocidad del proceso). Se puede resumir el procedimiento experimental en los siguientes pasos:

- Se prepara una disolución de ONPG y de los productos de reacción u otros compuestos, si estos se van a adicionar a tiempo cero, al doble de concentración que la que se desea en el medio de reacción.
- Se pesa una determinada cantidad de sólido húmedo, a la que se añaden 25 mL de BP y se termostatiza a la temperatura del experimento junto con el otro Erlenmeyer. El sólido debe ser suficientemente pequeño cuando se realizan experimentos cinéticos y de tamaños superiores en los experimentos de reacción-difusión interna.
- Se termostatizan los Erlenmeyer con la enzima inmovilizada y con los reactivos y se mezclan en el Erlenmeyer que contiene el sólido. Se enciende el motor de agitación y se agita el medio a una velocidad superior o igual a 300 r.p.m.
- Se toman muestras de 1 mL a varios tiempos durante el transcurso de la reacción y se añaden sobre tubos de ensayo, previamente preparados, que contienen 1 ml de H_2SO_4 0,5 M y 0,44 mL de BP.
- Se añade 1,5 mL de Na_2CO_3 1 M a cada tubo de ensayo y se mide la absorbancia a 420 nm.
- Se lava el sólido empleado en cada reacción con agua destilada y se deja secar 12 horas a 110°C . Se pesa una vez seco; como se conoce la cantidad de enzima inmovilizada (en mg enzima por g de soporte) y se conoce el peso seco de soporte, se puede obtener la cantidad de enzima empleada en el experimento.

Experimento de hidrólisis de lactosa en discontinuo

La hidrólisis de lactosa con enzima inmovilizada se ha estudiado para determinar la cinética de la hidrólisis de lactosa con el inmovilizado y para realizar tests de actividad. El procedimiento seguido se resume en los siguientes pasos:

- Se pesa una cantidad adecuada de sólido con la enzima inmovilizada y se añade al Erlenmeyer, en el que se va a llevar a cabo la reacción, con 25 mL de BM. Este sólido es de un tamaño pequeño cuando se realizan experimentos cinéticos para eliminar problemas difusionales; para el estudio del acople reacción-difusión se emplean tamaños mayores.
- Se preparan disoluciones de lactosa, galactosa y glucosa de las concentraciones deseadas en 25 mL de BM.
- Se termostatan las disoluciones anteriores a la temperatura a la cual se va a llevar a cabo la reacción y se mezclan en el Erlenmeyer que contiene el sólido. Este es agitado mediante hélice a una velocidad superior a 300 r.p.m.
- Se toma 1 mL de muestra a varios tiempos durante el transcurso de la reacción. Para parar la reacción, se añade esta muestra a tubos Eppendorf donde hay 0,5 mL de H_2SO_4 0,5 M. En principio, no sería necesario parar la reacción, ya que esta se para en el momento en que el líquido de la muestra deja de estar en contacto con el sólido que contiene la enzima, pero se evita así que continúe la reacción si parte de la enzima hubiera pasado del sólido al medio de reacción.
- Se analizan las muestras tomadas por HPLC como se describió en el apartado 2.2.3.

Estudio de la estabilidad del inmovilizado

- Se preparan viales de centelleo de 10 mL en los que se pone una cantidad de inmovilizado (de 0,06 a 0,1 g) y se añade 5 mL de BP cuyo pH ya ha sido ajustado al valor deseado. Después, se incuban los viales a la temperatura adecuada.
- Se preparan varios Erlenmeyers con 25 mL de una disolución de ONPG y se termostatan. A cada tiempo de incubación, se toma un vial y se arrastra el sólido del vial con ayuda del líquido del Erlenmeyer, midiéndose la actividad remanente de la enzima inmovilizada (apartado 2.3.4.).
- Se lava y se seca el sólido, se pesa el sólido seco y se calcula la concentración de enzima en el Erlenmeyer en el que se midió la actividad.

Para calcular la concentración de enzima por litro de medio de reacción, C_{EL} , se emplea la relación siguiente:

$$C_{EL} [\text{mg enzima} / \text{L}] = C_{EW} [\text{mg enzima} / \text{g de soporte}] \rho_L [\text{g de soporte} / \text{L}] \quad [2.7]$$

donde C_{EW} es la concentración de enzima por gramo de soporte y ρ_L la concentración másica en el medio de reacción.

Experimento de hidrólisis de lactosa en continuo

Estos experimentos permiten analizar la estabilidad de los inmovilizados a tiempos suficientemente largos, muy superiores al tiempo de reacción en reactor discontinuo. Además de este objetivo, los experimentos en continuo sirven para validar el modelo cinético obtenido en discontinuo.

Se realizaron experimentos previos de estímulo-respuesta para determinar las condiciones de agitación que eliminaban volúmenes muertos en el reactor. En los estudios de estabilidad del inmovilizado se empleó un tamaño de partícula lo suficientemente bajo para eliminar resistencias difusionales internas y una agitación suficiente para eliminar resistencias difusionales externas.

Las etapas seguidas durante un experimento de hidrólisis de lactosa en continuo se describen a continuación:

- Para calcular la cantidad de enzima inmovilizada que debe introducirse en la cesta del reactor se realiza un balance de materia al reactor CSTR donde se sustituye en el término de velocidad la ecuación cinética obtenida en discontinuo. Se fija el caudal de alimentación, la conversión deseada, la concentración inicial de lactosa y el volumen de líquido en el reactor, con lo que se puede despejar el peso de inmovilizado necesario.
- Se preparan 4 L de una disolución de lactosa 50 g/L en BM.
- Se esteriliza el depósito de acero inoxidable utilizado como depósito de alimentación y el filtro MILLIPORE en un autoclave a 120°C durante 20 minutos. Se limpia con isopropanol la bomba que se vaya a usar (generalmente, la que proporciona un caudal de 0,2 L/h), las conducciones y el reactor, tapa incluida. Es importante asegurar una asepsia suficiente, ya que no se puede esterilizar el reactor (se desactivaría la enzima).

- Se introducen 3 L de la solución de lactosa en el depósito de alimentación con ayuda de una bomba peristáltica y de un filtro estéril de 0,2 μm que se acopla en una entrada del depósito de alimentación. De esta forma se esteriliza el medio por filtración.
- Se encienden los baños termostáticos: el que regula la temperatura de la zona de precalentamiento y reacción y el que regula la temperatura de la zona de alimentación a 5°C para mantener el alimento en condiciones lo más asépticas posibles.
- La misma bomba y el mismo filtro utilizados para llenar el depósito de alimentación se utilizan para cargar el volumen adecuado de solución de lactosa en el reactor. Antes se ha colocado el codo de salida a la altura adecuada para que el volumen cargado coincida con el calculado previamente para el experimento. Se coloca la tapa del reactor y se deja agitando a 600 r.p.m.
- Se fija el caudal de operación y se empieza a bombear la solución de lactosa, purgando el isopropanol de la tubería que conecta el depósito de alimentación y el reactor hasta que no haya olor al mismo a la salida de la misma. Esta salida está conectada en ese momento al depósito de residuos.
- Se pesa la cantidad requerida del inmovilizado en una cesta en forma de sobre (de 0,5 mm de luz de malla).
- Cuando la temperatura del medio de reacción sea la adecuada y el caudal sea estable, se introduce la cesta con el inmovilizado con ayuda de unas pinzas estériles en la cesta soporte que hay en el reactor. Se cierra la tapa, se fija la velocidad de agitación en 600 r.p.m. y se coloca a la entrada del reactor la tubería de alimentación con la solución de lactosa pasando al caudal fijado. A los pocos minutos, comienza a salir líquido por el codo de salida, actuando el reactor durante cierto tiempo como reactor semicontinuo que irá progresando hacia un cierto estado estacionario que a su vez se puede ir modificando con la desactivación.
- Se toman muestras de mL durante el experimento, añadiéndolas a tubos Eppendorf con 0,5 mL de H_2SO_4 0,5 M. En viales de centelleo de 20 mL, se toman pequeñas muestras del sólido (para que no afecte a la reacción en marcha). Para ello, se extrae la cesta-sobre con ayuda de pinzas estériles, se toma una punta de espátula del sólido y se vuelve a colocar la cesta dentro del reactor con las pinzas. Estas muestras se utilizan para ver la evolución de la actividad del sólido frente a lactosa, para lo que se añade a cada vial de centelleo con su inmovilizado 1 mL de solución de lactosa 50 g/L

y se incuba en el baño de agitación JULABO SW20 a 40°C, fijando la agitación en 200 r.p.m.

- El experimento se mantiene mientras haya una conversión alta (seguida por HPLC) y una actividad importante en el sólido. Si es necesario, se añade más solución de lactosa al depósito de alimentación con ayuda de la bomba peristáltica y del filtro estéril de gran capacidad.

Medida del coeficiente de difusión en ausencia de reacción química

Las técnicas de medida del coeficiente de difusión en ausencia de reacción química o métodos físicos de medida pueden clasificarse en dos grupos: técnicas en las que se trabaja en condiciones estacionarias y técnicas en las que la medida se efectúa en régimen dinámico. Dentro de los métodos dinámicos, el más aceptado es el método cromatográfico en columna. Consiste, básicamente, en introducir en impulso un trazador en la corriente de fluido portador que atraviesa la columna que contiene el sólido problema y medir la salida de dicho trazador de la columna. Las etapas seguidas durante un experimento de este tipo se resumen en el siguiente esquema:

- Se calculan las dimensiones de la columna que se va a usar (volumen, diámetro y longitud). El volumen se mide introduciendo agua en la columna tras haberla tarado, se pesa la columna llena y el peso indica el volumen de la columna. El diámetro interno de la columna se calcula a partir del volumen de columna pues se conoce ya la longitud de esta.
- Para rellenar la columna se conecta un extremo a la trompa de vacío y por el otro se va introduciendo el sólido con la ayuda de un embudo. Según se va introduciendo el sólido en la columna, se hace vibrar para que el sólido se reparta de forma homogénea.
- Se coloca la columna en el horno y se hace pasar agua milli-Q a un caudal alto (> 5 mL/min). Se saca la columna y se observa si hay huecos en la zona de entrada del líquido, en cuyo caso se rellena con más sólido. Se calcula el peso total de sólido introducido y se determina la porosidad del lecho.

- Se enciende el horno y se deja que la columna se termostaticice. Se fija el caudal de líquido en el caudal mínimo de experimentación y se comienza a pasar eluyente por la columna a dicho caudal.
- Se enciende el detector que se vaya a usar. Si se emplea ONPG como trazador, el detector es de UV y necesita 60 minutos de estabilización y que el agua esté perfectamente desgasificada. En el caso de utilizar lactosa, el detector es de dispersión de luz y se mide a 45°C, estando la ganancia fijada en un valor adecuado para la concentración de trazador inyectada.
- Se conecta el ordenador y se carga el programa de toma de datos.
- Se prepara la muestra de trazador a la concentración adecuada y se colocan 2 mL de dicha solución en un vial de inyección, colocándolo en el autoinyector bajo el punto de inyección.
- Se inyecta. El ordenador comienza a tomar datos del cromatograma. Cuando termina el cromatograma, el programa integra el pico de trazador y lo almacena en un archivo.
- Se cambia al siguiente caudal de experimentación y se repite el procedimiento.

**3.- CINETICA DE LAS REACCIONES
DE HIDRÓLISIS CON LAS ENZIMAS
EN DISOLUCIÓN**

3.1.- INTRODUCCIÓN

En este capítulo se determinan los modelos cinéticos de las reacciones de hidrólisis de lactosa y de ONPG mediante el empleo de las dos enzimas con actividad β -galactosidasa en estudio. Se consideran primero aspectos generales de la cinética enzimática, como son los mecanismos propuestos para la acción de las enzimas. Estos mecanismos dan lugar a los modelos cinéticos que permiten cuantificar la velocidad de obtención de productos a partir de los sustratos.

Los modelos cinéticos que se generan a partir de los diversos mecanismos considerados se han particularizado para las reacciones de hidrólisis de lactosa y de ONPG. Las variables que aparecen de forma explícita en estos modelos son las concentraciones de sustrato y de productos y la concentración de enzima, y de forma implícita, la temperatura. Los parámetros cinéticos del modelo varían con las condiciones ambientales en las que se produce la reacción enzimática: pH, fuerza iónica y la presencia de ciertos cationes y de algunos compuestos orgánicos, con actividad represora o activadora de la actividad enzimática.

3.1.1.- Mecanismos de acción enzimática

Existen varios mecanismos que explican la acción de las enzimas. Los más sencillos se basan en el mecanismo de Michaelis-Menten, del que se derivan ecuaciones cinéticas de tipo hiperbólico. Para las enzimas de acción más controlada y

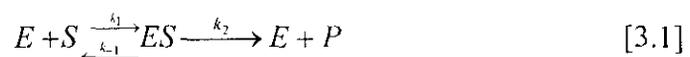
específica, propias del metabolismo primario, la cinética puede ser una función sigmoideal. Sin embargo, la mayoría de las reacciones llevadas a cabo mediante enzimas de aplicación industrial, farmacéutica y analítica actualmente en el mercado siguen cinéticas de tipo hiperbólico.

Mecanismos tipo Michaelis-Menten sin inhibición

Este mecanismo, propuesto en 1913 por Michaelis y Menten, ha sido muy aceptado y aplicado para describir la cinética de numerosas reacciones enzimáticas, como, por ejemplo, las de tipo hidrolítico, entre las que se encuentran las estudiadas en este trabajo. Dentro del mecanismo de Michaelis-Menten hay diversos grados de complejidad que se consideran a continuación.

I.- Reacción irreversible con un sustrato

Existen dos aproximaciones para desarrollar este mecanismo, y ambas suponen la existencia de un complejo enzima-sustrato cuya concentración es constante. Michaelis y Menten postularon que este complejo se encuentra en equilibrio, mientras que Briggs y Haldane suponen un estado pseudoestacionario para la formación de este complejo, es decir, que la velocidad de formación del complejo es igual a la de su desaparición. Estas dos aproximaciones parten del hecho de que, cuando en el medio de reacción hay mucho más sustrato que enzima, la concentración del complejo ES es constante. Aunque las dos aproximaciones dan lugar a la misma ecuación cinética, el desarrollo de Briggs y Haldane es más general, porque no implica que la especie intermedia evolucione mayoritariamente hacia los reactivos que la formaron y sólo una parte muy pequeña de esta especie pase a productos (es decir, $k_2 \ll k_{-1}$), lo que no está garantizado para todas las enzimas. El mecanismo que se plantea es el siguiente:



El estado pseudoestacionario supone que la velocidad de formación del complejo ES es nula, es decir:

$$R_{ES} = \frac{dC_{ES}}{dt} = k_1 C_{E_I} C_S - k_{-1} C_{ES} - k_2 C_{ES} = 0 \quad [3.2]$$

de donde se despeja que la concentración del complejo ES es:

$$C_{ES} = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} C_{E_I} C_S \quad [3.3]$$

Reordenando la ecuación [3.3], se puede definir una nueva constante K_M , denominada constante de Michaelis:

$$\frac{C_{E_I} C_S}{C_{ES}} \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = K_M \quad [3.4]$$

La concentración total de la enzima introducida al medio de reacción C_E , se encuentra como enzima libre y como enzima que forma parte del complejo ES, siendo C_{E_I} y C_{E_S} sus concentraciones respectivas. Por tanto:

$$C_E = C_{E_{libre}} + C_{ES} \quad [3.5]$$

Despejando C_{E_I} de la ecuación [3.5], sustituyéndola en la ecuación [3.4], y reordenando esta última, se obtiene la siguiente expresión para la concentración del complejo ES:

$$C_{ES} = \frac{C_E C_S}{K_M + C_S} \quad [3.6]$$

Multiplicando la ecuación [3.6] por k_2 , se obtiene la velocidad de formación de producto P con el tiempo.

$$\frac{dC_P}{dt} = k_2 C_{ES} = \frac{k_2 C_E C_S}{K_M + C_S} \quad [3.7]$$

velocidad que, habitualmente, se escribe como:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_M + C_S} \quad [3.8]$$

siendo μ_{\max} la velocidad máxima que puede obtenerse para unas condiciones dadas de temperatura y de concentración de enzima.

La ecuación [3.8] se conoce como ecuación de Michaelis-Menten, según la cual la velocidad de la reacción enzimática es una función hiperbólica de la concentración de sustrato. Se puede demostrar, a partir de la ecuación [3.8], que cuando la concentración de reactante es igual a la de K_M , se obtiene una velocidad neta mitad de la máxima, μ_{\max} , y que, a valores suficientemente elevados de la concentración de sustrato, la velocidad máxima que se obtiene es $\mu_{\max} (k_2 \cdot C_E)$.

La constante cinética del numerador es k_2 y se suele expresar como moles de sustrato/s que reaccionan por mg de enzima y por unidad de tiempo. Si se expresa como moles de sustrato/s modificados por mol de enzima y por unidad de tiempo coincide con una constante cinética, de uso común en bioquímica, conocida como k_{cat} o número de recambio, cuando la enzima sólo tiene un centro activo. Si la enzima tiene n centros activos, k_2 es igual a $n \cdot k_{\text{cat}}$. El número de recambio indica el número de moléculas de sustrato que pueden reaccionar con la enzima por unidad de tiempo y por centro activo.

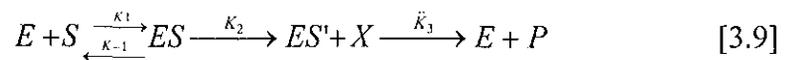
La constante de Michaelis-Menten, K_M , es un parámetro que engloba varias constantes cinéticas. Es importante por varias razones:

- i) El valor de K_M caracteriza la interacción de la enzima con un sustrato dado. De forma que:
 - Si $k_{-1} \gg k_2$, es decir, $K_M \cong k_{-1}/k_1$ (que es la hipótesis de Michaelis-Menten), la enzima, el sustrato y el complejo ES están en equilibrio, y la formación del producto es mucho menos probable que la evolución del complejo ES hacia el

sustrato y la enzima libre de partida. En este caso, K_M es, aproximadamente, la inversa de la afinidad de las enzimas por el sustrato. Cuanto menor sea K_M , mayor será la afinidad y viceversa.

- Si $k_{-1} \ll k_2$, la hipótesis de Michaelis-Menten no tiene validez y K_M ya no tiene relación con la afinidad de la enzima por el sustrato.
- ii) Los valores de K_M de muchas reacciones enzimáticas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos. Considerando que la velocidad de reacción es muy sensible a la concentración de sustrato cuando ésta es similar a K_M , pequeñas variaciones de las concentraciones de algunos sustratos pueden traducirse en la modificación de la velocidad de toda una ruta metabólica.

En el mecanismo de la ecuación [3.1] también se puede considerar que el intermedio covalente ES evoluciona hacia un producto X y un intermedio de reacción ES' , que es el que finalmente se transforma en producto y enzima libre. El mecanismo viene ahora representado por:



La velocidad de reacción, que se obtiene considerando el estado estacionario para el complejo, resulta ser:

$$r = \frac{(K_2 K_3) / (K_2 + K_3)}{(K_S K_3) / (K_2 + K_3) + C_S} C_{E_t} C_S \quad [3.10]$$

Las constantes de la ecuación [3.10] se pueden englobar en dos constantes, K_M y k_2 , de acuerdo a las ecuaciones [3.11] y [3.12].

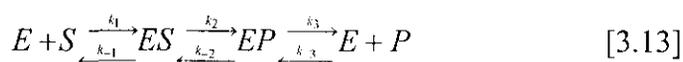
$$K_M = K_S \frac{K_3}{K_2 + K_3} \quad [3.11]$$

$$k_2 = K_2 \frac{K_3}{K_2 + K_3} \quad [3.12]$$

Con lo que la ecuación [3.10] tiene la misma expresión que la cinética de Michaelis-Menten de la ecuación [3.7].

II.- Reacción reversible con un sustrato

Si la descomposición del complejo enzima-sustrato es reversible a través de la formación de un complejo EP, el esquema de reacción es el siguiente:



Con la aproximación del estado pseudoestacionario se llega a una forma de la ecuación de velocidad similar a la de Michaelis-Menten, aunque aquí existen dos constantes, una referida al equilibrio que forma ES con la enzima y el sustrato (K_{M1}) y otra referida al equilibrio que forma EP con la enzima y el producto (K_{M2}). La ecuación cinética resulta ser:

$$r = \frac{k_2 C_E C_S / K_{M1} - k_{-2} C_E C_P / K_{M2}}{1 + C_S / K_{M1} + C_P / K_{M2}} \quad [3.14]$$

donde:

$$K_{M1} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad [3.15]$$

$$K_{M2} = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad [3.16]$$

Esta ecuación se simplifica a la de Michaelis-Menten simple cuando la concentración de producto es cero. Cuando va aumentando la concentración de producto, cobra importancia el segundo término del numerador y disminuye el primero, hasta que, en el equilibrio, se igualan.

III.- Reacciones con más de un sustrato

Hay enzimas que catalizan reacciones en las que interviene más de un sustrato. Particularmente, las enzimas que utilizan cofactores (como el NADH) suelen utilizarlos como uno de los sustratos de la reacción.

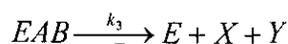
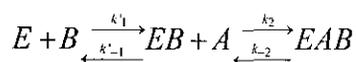
La acción de estas enzimas se ha intentado explicar por dos aproximaciones: una considera que todos los sustratos se unen a la enzima antes de la catálisis, y la otra supone que puede liberarse un producto antes de la unión del segundo sustrato.

Considerando el caso de dos sustratos, A y B, y asumiendo la hipótesis del estado pseudoestacionario de los intermedios, las ecuaciones cinéticas que se obtienen son del siguiente tipo:

$$r = \frac{r_m C_A C_B}{K_A K_B + K_A C_B + K_B C_A + C_A C_B} \quad [3.17]$$

Se puede formar un complejo ternario ABE, donde un sustrato forma un complejo con la enzima y este complejo luego se une al otro sustrato (mecanismo ordenado) o donde cualquiera de los sustratos puede formar el complejo inicial con la enzima y luego entraría el otro (mecanismo aleatorio). Una vez se han unido los dos sustratos se produce la reacción. Los esquemas de los mecanismos antes citados y las ecuaciones cinéticas que se derivan de ellos se resumen a continuación:

-Formación de un complejo ternario. Mecanismo aleatorio



$$r = \frac{k_3 C_E C_A C_B}{K'_A K_B + K_A C_B + K_B C_A + C_A C_B} \quad [3.19]$$

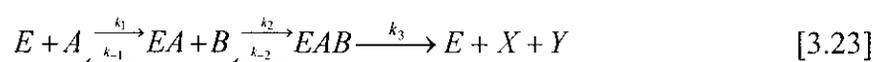
donde:

$$K'_A = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad [3.20]$$

$$K_A = \frac{k_{-2}}{k_2} \quad [3.21]$$

$$K_B = \frac{k'_{-2}}{k'_2} \quad [3.22]$$

- *Formación de un complejo ternario. Mecanismo ordenado*



$$r = \frac{k_3 C_E C_A C_B}{K_A K_B + K_A C_B + K_B C_A + C_A C_B} \quad [3.24]$$

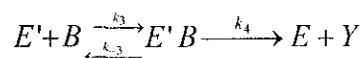
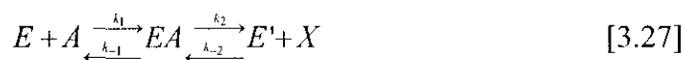
donde:

$$K_A = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad [3.25]$$

$$K_B = \frac{k_{-2}}{k_2} \quad [3.26]$$

Otra posibilidad implica que reaccione primero A, que se libere un producto X, para entrar posteriormente B en el complejo EA' y liberar otro segundo producto (mecanismo de sustitución). Es decir, se produce la *reacción enzimática con dos sustratos sin formación de complejo ternario*.

Las reacciones enzimáticas más importantes dentro de esta categoría siguen el mecanismo de sustitución o mecanismo ping-pong (Price y Stevens, 1980; Gòdia y col., 1998). Este mecanismo y las ecuaciones cinéticas que se derivan se presentan a continuación:



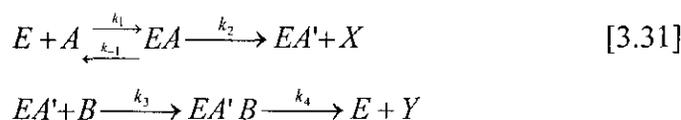
$$r = \frac{k_2 C_E C_B C_A}{K_B C_A + K_A C_B + C_A C_B} \quad [3.28]$$

donde:

$$K_A = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad [3.29]$$

$$K_B = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad [3.30]$$

En algunos casos, especialmente en reacciones de hidrólisis, se puede simplificar el mecanismo. El esquema de reacción queda como:



Mecanismo del que se deriva la ecuación cinética siguiente:

$$r_X = \frac{k_2 C_E C_A}{K_M + C_A} \quad [3.32]$$

$$r_Y = \frac{k_4 k_3 k_2 C_E C_A C_B}{K_M + C_A} \quad [3.33]$$

Este mecanismo se transforma en uno de tipo Michaelis-Menten simple sin más que considerar que C_B es constante y que el producto $k_4 k_3$ vale la unidad, puesto que K_M es la constante definida en la ecuación 3.4. Esto equivale a decir que las velocidades de formación de los dos productos son las mismas y que la descomposición del complejo EA' es instantánea.

Como ejemplo de mecanismo ping-pong de interés industrial, se puede citar la síntesis de péptidos que transcurre a través de un intermedio acil-enzima. Se considera un mecanismo en el que entra un tercer sustrato, el agua, siendo los otros dos un aminoácido y un derivado esterificado de otro aminoácido. Sobre este mecanismo se pueden considerar algunas simplificaciones que llevan a expresiones cinéticas sencillas: la reacción de formación de EA' es muy rápida comparada con las demás, la concentración

de agua es constante y se dan ciertas relaciones entre constantes cinéticas ($k_{-1} \ll k_1$; $k_4 \gg k_1$ y $(k_3 C_B/k_1) + (k_4/k_1) \gg C_A$). Se llega a dos velocidades de formación de producto, una para el péptido producto de la síntesis (X) y otra para el ácido (Y):

$$r_X = \frac{k_3 C_E C_A C_B}{k_3 C_B + k_4} \quad [3.34]$$

$$r_Y = \frac{k_4 C_E C_A}{k_3 C_B + k_4} \quad [3.35]$$

Mecanismos tipo Michaelis-Menten con inhibición

La velocidad de una reacción enzimática y la actividad de la enzima pueden modificarse por la presencia de otros compuestos diferentes al sustrato. Estos pueden clasificarse en dos categorías:

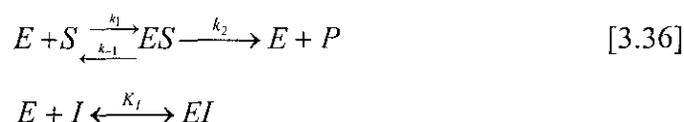
- Los activadores, que aumentan la velocidad de la reacción enzimática.
- Los inhibidores, tanto reversibles como irreversibles, que la reducen.

A partir del mecanismo de Michaelis-Menten simple, se consideran cuatro tipos principales de inhibición: competitiva, no competitiva, acompetitiva y mixta, dependiendo de a cual de las especies implicadas en la reacción se una el inhibidor. Según como se comporte la especie a la que está unida el inhibidor, la inhibición puede ser total o lineal, o bien parcial o hiperbólica (Whiteley, 1997). En el primer caso, al unirse el inhibidor a la enzima, da lugar a un intermedio de reacción que no evoluciona hacia productos. En el segundo caso, la especie a la que está unida el inhibidor evoluciona hacia productos con una velocidad inferior a la de la reacción de descomposición del complejo ES hacia los mismos. A continuación, se considera la inhibición total en sus posibles casos, ya que es la más frecuente. Posteriormente, se desarrolla el mecanismo aplicable a todos los tipos de inhibición citados.

I. Inhibición total

1.- Inhibición Competitiva

El inhibidor es una sustancia cuyas estructuras química y espacial son similares a las del sustrato que interacciona con el centro activo de la enzima, impidiendo así la fijación de dicho sustrato, tal como se muestra en el esquema siguiente:



donde:

$$K_I = \frac{C_E C_I}{C_{EI}} \quad [3.37]$$

Se sigue asumiendo el estado pseudoestacionario para la formación del complejo ES y se considera que el complejo EI está en equilibrio con la enzima libre y el inhibidor. Mediante un nuevo balance de enzima se obtiene la siguiente expresión para la velocidad de formación del producto y, por tanto, para la velocidad de la reacción global:

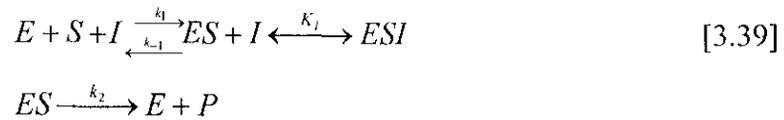
$$r = \frac{k_2 C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_I}{K_I} \right) + C_S} \quad [3.38]$$

Comparando las ecuaciones [3.7] y [3.38], se observa que no se modifica la velocidad máxima por la presencia del inhibidor, pero podría considerarse una nueva constante K_M aparente que aumenta al aumentar la concentración del inhibidor.

2.- Inhibición Acompetitiva

Esta es una inhibición por bloqueo del complejo ES. Se supone que en la enzima existen dos tipos de centros, uno que interacciona con el sustrato y el otro con el inhibidor, pero éste último sólo puede fijarse en forma reversible sobre el complejo

intermedio, ES. El complejo ternario ESI no puede evolucionar a producto, llegándose a un punto ciego, tal como se muestra en el esquema de la ecuación [3.28].



La ecuación cinética que se obtiene de este mecanismo es:

$$r = \frac{k_2 C_E C_S}{K_M + C_S \left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right)} \quad [3.40]$$

donde:

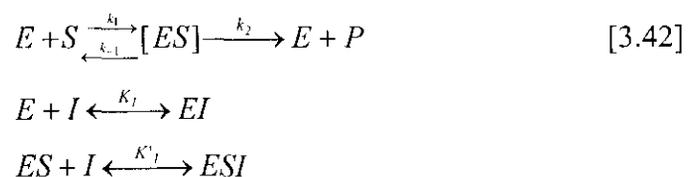
$$K_I = \frac{C_{ES} C_I}{C_{ESI}} \quad [3.41]$$

En este tipo de inhibición, la velocidad máxima μ_{\max} y la constante K_M aparentes son menores que en ausencia de inhibidor. El inhibidor favorece la formación del complejo ES.

El sustrato puede actuar como un inhibidor acompetitivo cuando se encuentra en concentraciones elevadas, uniéndose al complejo ES en un centro alostérico de la enzima. En este caso, la velocidad máxima disminuye al aumentar la concentración de sustrato.

3.- Inhibición mixta

El inhibidor puede formar complejos con la enzima libre y con el complejo ES. El mecanismo es:



donde:

$$K_I = \frac{C_E C_I}{C_{EI}} \quad [3.43]$$

$$K'_I = \frac{C_{ES} C_I}{C_{ESI}} \quad [3.44]$$

La ecuación cinética que se deriva de este mecanismo es:

$$r = \frac{k_2 C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right) + C_S \left(1 + \frac{C_I}{K'_I}\right)} \quad [3.45]$$

Se observa que, respecto a la ecuación [3.7], μ_{\max} y K_M aparentes varían con la concentración de inhibidor. La velocidad máxima aparente disminuye al aumentar la concentración de inhibidor. La constante de Michaelis aparente disminuye o aumenta con el aumento de temperatura según la relación de las constantes K_I y K'_I .

4.- Inhibición no Competitiva

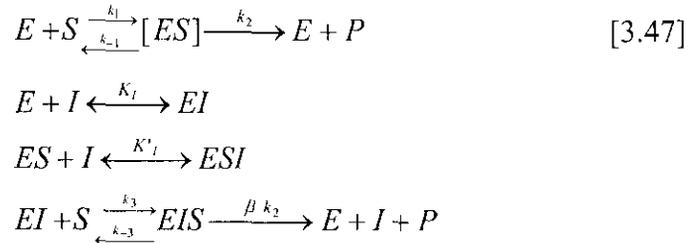
Es una simplificación de la inhibición mixta que sólo se presenta cuando actúan como inhibidores moléculas pequeñas, como, por ejemplo, iones (Cornish-Bowden, 1995). Se considera que las dos constantes de inhibición K_I y K'_I son iguales. La ecuación cinética que se obtiene entonces es:

$$r = \frac{k_2 C_E C_S}{(K_M + C_S) \left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right)} \quad [3.46]$$

En la inhibición no competitiva la velocidad máxima aparente disminuye al aumentar la concentración de inhibidor, mientras que K_M aparente permanece inalterada.

II. Mecanismo general de inhibición

Se puede considerar un mecanismo que tiene en cuenta todas las posibilidades de inhibición posibles, tanto totales como parciales:



donde β es un parámetro comprendido entre 0 y 1 (0 indicaría inhibición total y 1 ausencia de inhibición) y K_I y K'_I están definidas en las ecuaciones [3.43] y [3.44]. Las constantes cinéticas de los equilibrios se pueden englobar en dos constantes K_S y K'_S . La ecuación cinética que se obtiene ahora es:

$$r = \frac{dC_p}{dt} = \frac{k_2}{K_S} \left(1 + \frac{\beta C_I}{K'_I} \right) \frac{C_E C_S}{1 + \frac{C_I}{K_I} + \frac{C_S C_I}{K'_I K_S} + \frac{C_S}{K_S}} \quad [3.48]$$

donde:

$$K_S = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad \therefore K'_S = K'_I \quad [3.49]$$

La igualdad de K'_S y K'_I supone que no importa el orden de entrada del inhibidor o el sustrato en el complejo previamente formado, sea éste EI o ES.

3.1.2.- Modelos cinéticos de las reacciones de hidrólisis con β -galactosidasas

La mayoría de los estudios desarrollados en la literatura para las reacciones de hidrólisis con β -galactosidasas se refieren a la reacción de interés industrial, que es la hidrólisis de lactosa. A la hidrólisis de ONPG, que se utiliza para ciertos estudios de actividad, se le aplica habitualmente el mecanismo de Michaelis-Menten ningún tipo de inhibición. En cualquier caso, todos los modelos cinéticos propuestos para cuantificar la

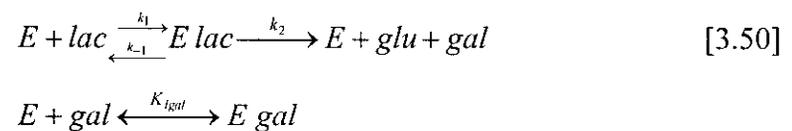
hidrólisis enzimática de lactosa tienen como punto de partida el mecanismo de Michaelis-Menten considerando diversos tipos de inhibición:

- a) Inhibición competitiva por galactosa.
- b) Inhibición competitiva por los anómeros α - y β - de la galactosa.
- c) Inhibición competitiva por β -galactosa y mixta por α -galactosa.
- d) Inhibición competitiva de galactosa, con una liberación secuencial de los dos productos de hidrólisis.
- e) Inhibición no competitiva por galactosa.
- f) Inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa.
- g) Inhibición competitiva por α - y β - galactosa y formación de oligosacáridos como reacción lateral.

Estos mecanismos y su aplicación se desarrollan a continuación:

Modelo de Michaelis-Menten considerando inhibición competitiva por galactosa

Este modelo ha sido el más aplicado para describir la hidrólisis de lactosa por β -galactosidasas, ha sido propuesto por varios autores (Yang y Okos, 1989; Papayannakos y col., 1993; Carrara y Rubiolo, 1996; Santos y col., 1998). Se ha utilizado con enzimas de diferentes microorganismos: *A. niger* y *K. fragilis*. El esquema de reacción implicado es el siguiente:



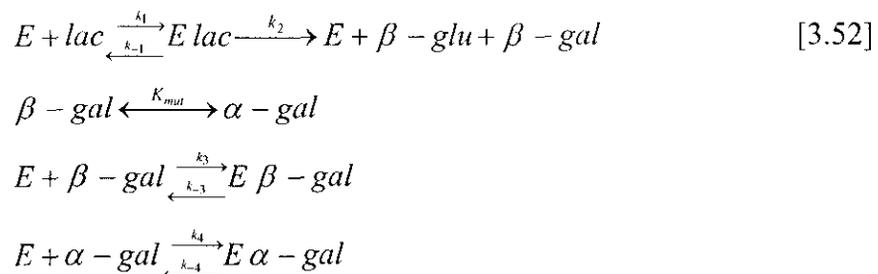
La ecuación cinética que corresponde a este mecanismo es:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} \right) + C_{lac}} \quad [3.51]$$

Donde $K_{I \text{ gal}}$ es la constante de inhibición competitiva debida a la galactosa, definida según la ecuación [3.37], donde el inhibidor I es la galactosa.

Modelo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por anómeros de α - y β -galactosa

A diferencia del mecanismo anterior, en este mecanismo se distingue entre los dos anómeros, α - y β -, de la galactosa, que pueden presentar distinto efecto inhibitor. Estudios anteriores con la enzima de *A. niger* (Flaschel y col., 1982) demostraron que el anómero α - de la galactosa inhibía más que el anómero β -. Este último es el que se produce inicialmente en la hidrólisis de lactosa. La mutarrotación de la forma β - a la α - es rápida, lo que obliga a tener en cuenta la presencia de este último anómero en el medio de reacción (Faschel y col., 1982; Bakken y col., 1992). Los parámetros cinéticos de la mutarrotación de α - a β -galactosa se estiman independientemente de la hidrólisis de lactosa. El mecanismo propuesto es el siguiente:



siendo K_{mut} la constante de equilibrio de la reacción de mutarrotación de α -gal a β -gal. Con este mecanismo, la ecuación cinética que rige la velocidad es:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M \left(1 + \frac{C_{\beta - gal}}{K_{\beta - gal}} + \frac{C_{\alpha - gal}}{K_{\alpha - gal}} \right) + C_{lac}} \quad [3.53]$$

Donde $K_{I \beta - gal}$ y $K_{I \alpha - gal}$ son constantes de inhibición competitiva definidas según la ecuación [3.37].

La mutarrotación es una reacción reversible de primer orden. La velocidad de reacción se expresa en función de concentraciones de equilibrio a un tiempo determinado. En los experimentos para estudiar esta reacción (Flaschel, 1982) se parte de α -galactosa pura, que se transforma en el anómero β . La ecuación cinética que cuantifica este proceso es:

$$r = k_{mut} (C_{\alpha e} - C_{\alpha}) \quad [3.54]$$

donde k_{mut} es la constante cinética de primer orden de la conversión de α -gal en β -gal y $C_{\alpha e}$ la concentración de la especie α -galactosa en el equilibrio.

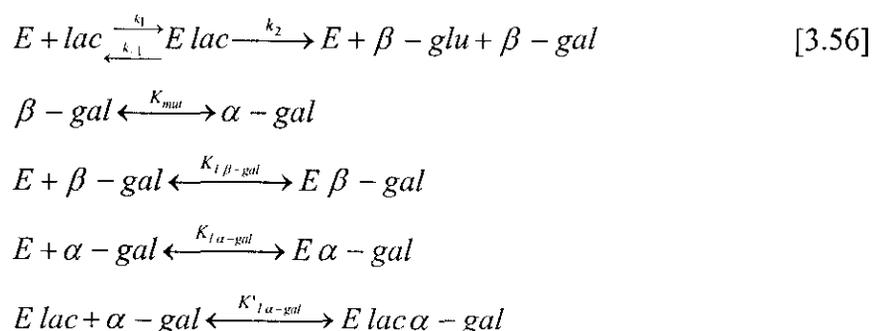
Considerando el balance de galactosa en el equilibrio se obtiene la concentración de α -galactosa:

$$C_{\alpha-gal}^e = (C_{s0} - C_s - C_{gal0}) \frac{K_{mut}}{1 + K_{mut}} \quad [3.55]$$

Tanto k_{mut} como K_{mut} son parámetros que se determinan en experimentos donde sólo se produce la reacción de mutarrotación.

Modelo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por β -galactosa y mixta por α -galactosa

Este modelo fue propuesto por Flaschel y col. (1982) y utilizado posteriormente por Bakken y col. (1989) en sus estudios sobre reactores enzimáticos. El esquema de reacción en este caso es similar al anterior, pero incluye, además, un término en el que el anómero α - de la galactosa forma un nuevo complejo con el complejo E lac, según:



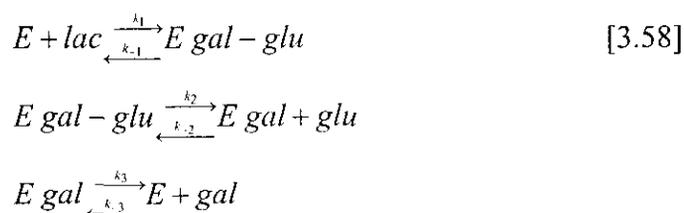
La ecuación cinética que resulta es:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M \left(1 + \frac{C_{\beta-gal}}{K_{I \beta-gal}} + \frac{C_{\alpha-gal}}{K_{I \alpha-gal}} \right) + C_{lac} \left(1 + \frac{C_{\alpha-gal}}{K'_{I \alpha-gal}} \right)} \quad [3.57]$$

Donde $K_{I \beta-gal}$ y $K_{I \alpha-gal}$ son constantes de inhibición competitiva definidas en la ecuación [3.37] y $K'_{I \alpha-gal}$ es la constante de inhibición acompetitiva, que está definida en la ecuación [3.41].

Michaelis-Menten con inhibición competitiva de galactosa, con una liberación secuencial de los dos productos de hidrólisis

Este modelo, propuesto por Yang y Okos (1989), se basa en el mecanismo de acción de las β -galactosidasas, el cual sostiene que se libera primero un producto, en este caso la glucosa, dejando un residuo galactósido unido a la enzima. Este residuo reacciona posteriormente con un electrófilo que queda unido al oxígeno del antiguo enlace β -1,4-. Este electrófilo suele ser el agua, ya que el disolvente se encuentra en mayor proporción (55 M). El esquema de reacción es el siguiente:



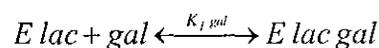
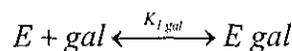
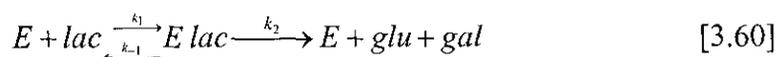
Las constantes k_1 a k_3 son constantes de velocidad de la reacción primaria. Si la glucosa no tiene efecto sobre la velocidad de reacción de la hidrólisis, k_{-2} es cero. La ecuación cinética de la reacción viene expresada por:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{I gal}} \right) + C_{lac} \left(1 + \frac{k_2}{k_3} \right)} \quad [3.59]$$

donde $K_{i\ gal}$ es la constante de inhibición competitiva por galactosa. Definida de nuevo por la ecuación [3.37].

Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa

Este mecanismo ha sido propuesto por Shukla y Chaplin (1993) para la β -galactosidasa del hongo *A. oryzae*. En su representación se observa únicamente disminución del número de recambio (k_{cat}). El mecanismo de reacción propuesto y la ecuación cinética que se obtiene son los siguientes:

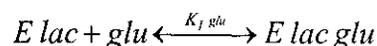
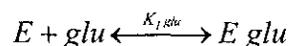
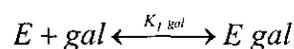
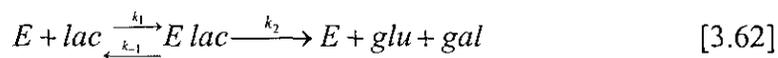


$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{(K_M + C_{lac}) \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{i\ gal}} \right)} \quad [3.61]$$

Donde $K_{i\ gal}$ es una constante de inhibición, definida por las ecuaciones [3.37] y [3.41], ya que, para esta inhibición, ambas constantes, K_i y K'_i , son iguales.

Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa

Chen y col. (1985) ajustaron a este modelo sus datos experimentales, obtenidos con células de *K. fragilis* como catalizador permeabilizadas con acetona. Se propone el siguiente esquema de reacción y se obtiene la ecuación cinética de la expresión [3.63]:



$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{I gal}} \right) + (K_m + C_{lac}) \left(1 + \frac{C_{glu}}{K_{I glu}} \right)} \quad [3.63]$$

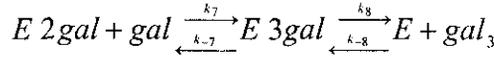
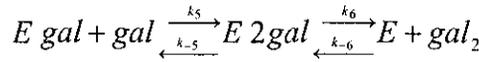
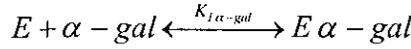
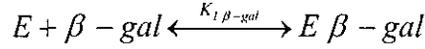
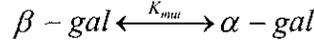
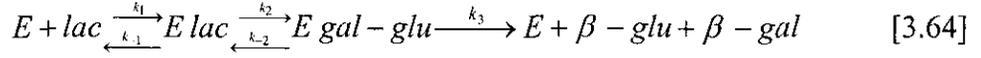
Donde $K_{I gal}$ es una constante de inhibición competitiva, según la ecuación [3.37], y $K'_{I glu}$ es la constante de inhibición no competitiva por glucosa, que está definida según las ecuaciones [3.37] ó [3.41].

Michaelis-Menten con inhibición competitiva por α - y β - galactosa y formación de oligosacáridos como reacción lateral

Este modelo fue propuesto por Bakken y col. (1992) para la β -galactosidasa de la bacteria *Bacillus circulans*. Considera que se produce la reacción de transgalactosidación de la β -galactosidasa como reacción lateral. Esta es una reacción que sucede cuando hay más de un aceptor del grupo galactósido. En la hidrólisis de lactosa, la glucosa y la galactosa pueden ejercer como aceptores de tales grupos. En el caso de la galactosa, esta reacciona con ellos formando moléculas de 2, 3, 4 y 5 moléculas de galactosa, siendo los que están en mayor concentración los oligogalactósidos de 2 y 3 moléculas de galactosa. Estos son productos que, dejando que la reacción transcurra el suficiente tiempo, también son hidrolizados, por lo que presentan un máximo de concentración durante el transcurso de la reacción. No todas las enzimas tienen la misma capacidad de formarlos y su concentración es mayor a concentraciones elevadas de lactosa y del aceptor de galactósido que compite con el agua (Stevenson, 1993). Esta reacción lateral parece ser importante para la síntesis de numerosos compuestos de interés farmacológico (Menzler, 1997).

El modelo introduce algunas simplificaciones: sólo se consideran trisacáridos como producto de la transgalactosidación y se asume que las reacciones de inhibición por α - y β - galactosa son mucho más rápidas que las reacciones de formación de los complejos E lac, E3gal y E2gal. Se asume el estado estacionario para los complejos y se derivan las ecuaciones cinéticas, siguiendo el procedimiento propuesto por King y Altman (1956). El modelo considera la reacción de mutarrotación independientemente de la reacción de hidrólisis. Al final, se obtiene un grupo de ecuaciones diferenciales que

expresan la velocidad de formación de las distintas especies químicas presentes en el medio. El esquema de reacción y las ecuaciones cinéticas que corresponden a este modelo se presentan a continuación:



$$\frac{dC_{lac}}{dt} = \frac{-P_1 C_{lac} - 2P_2 C_{lac}^2 + P_3 C_{tri} - P_4 C_{lac} C_{gal} - P_5 C_{lac} C_{di} + P_6 C_{gal} C_{tri}}{1 + K_{1\alpha-gal} C_{\alpha-gal} + K_{1\beta-gal} C_{\beta-gal}} \quad [3.65]$$

$$\frac{dC_{glu}}{dt} = \frac{P_1 C_{lac} + P_2 C_{lac}^2 + P_4 C_{lac} C_{gal}}{1 + K_{1\alpha-gal} C_{\alpha-gal} + K_{1\beta-gal} C_{\beta-gal}} \quad [3.66]$$

$$\frac{dC_{gal}}{dt} = \frac{P_1 C_{lac} - 2P_7 C_{di} + P_3 C_{tri} - P_4 C_{lac} C_{gal} + P_5 C_{lac} C_{di} - P_6 C_{gal} C_{tri}}{1 + K_{1\alpha-gal} C_{\alpha-gal} + K_{1\beta-gal} C_{\beta-gal}} \quad [3.67]$$

$$\frac{dC_{di}}{dt} = \frac{P_4 C_{lac} C_{gal} - P_7 C_{di} - P_5 C_{lac} C_{di} + P_6 C_{gal} C_{tri}}{1 + K_{1\alpha-gal} C_{\alpha-gal} + K_{1\beta-gal} C_{\beta-gal}} \quad [3.68]$$

$$\frac{dC_{tri}}{dt} = \frac{P_2 C_{lac}^2 - P_3 C_{tri} + P_5 C_{lac} C_{di} - P_6 C_{gal} C_{tri}}{1 + K_{1\alpha-gal} C_{\alpha-gal} + K_{1\beta-gal} C_{\beta-gal}} \quad [3.69]$$

$$\frac{dC_{\alpha-gal}}{dt} = k_{mut} \left(\left(\frac{C_{gal} K_{mut}}{1 + K_{mut}} \right) - C_{\alpha-gal} \right) \quad [3.70]$$

Donde $K_{1\beta-gal}$ y $K_{1\alpha-gal}$ son constantes de inhibición competitiva y quedan definidas de acuerdo con la ecuación [3.37] y los parámetros P_1 a P_6 son agrupaciones de constantes cinéticas que incluyen la concentración total de enzima C_E .

En la Tabla 3.1 se resumen los modelos cinéticos utilizados en la literatura para la reacción de hidrólisis enzimática de lactosa (desarrollados en los puntos anteriores), así como las condiciones en las que se ha llevado a cabo la experimentación y se recogen los valores obtenidos de parámetros cinéticos de estos modelos.

Tabla 3.1.- Modelos propuestos en la literatura sobre la hidrólisis de lactosa.

Referencia	Fuente de la enzima	T (°C)	C _{lactosa} (mM)	C _{enzima} (mg/l)	Tampón	Modelo cinético	T (°C)	Parámetros cinéticos		
								k ¹	K _m ²	K _i ³
Berrueta y García, 1988	<i>E. coli</i>	37	23-58	19	Fosfato, pH 7.3	Michaelis- Menten simple (Ecuación 3.7)	37	112	57	
Ohmiya y col., 1977	<i>E. coli</i>	25-37	0.5-3	3.08	Fosfato 0.1 M pH 7.0	Inhibición competitiva por galactosa (Ecuación 3.51)	37	2.88	14	15
Papayannakos y col., 1993	<i>A. niger</i>	40-60	14.4-144	47.2-472 UI	pH 3.6	Inhibición competitiva por galactosa (Ecuación 3.51)	40	0.040 ⁴	18.9	0.468
							60	0.085 ⁴	38.7	2.36
Yang y Okos, 1989	<i>A. niger</i>	8-60	73-584	10-10000	Tampón ácido láctico pH 4.0	Inhibición competitiva por galactosa (Ecuación 3.51)	8	3.98	83.3	0.470
							60	75.8	78.2	0.600
Carrara y Rubiolo, 1996	<i>K. fragilis</i> (Lactozym)	43	146-292	21-88 (proteína)	Fosfato 0.025 M pH 6.86	Inhibición competitiva por galactosa (Ecuación 3.51)	43	2	43.6	51.9
Shukla y Chaplin, 1983	<i>A. oryzae</i>	37	25-500	-	pH 5.0	Inhibición no competitiva por galactosa (Ecuación 3.61)	37	10 UI/mg	96	40
Chen y col., 1985	<i>K. fragilis</i>	37	139	2-2.5 mg/ml células secas	Tris-maleato-NaOH pH 7.0	Inhibición competitiva por galactosa y no competitiva por glucosa (Ecuación 3.63)	37	0.58	62.5 (gal)	77 (glu) 278
Bakken y col., 1989	<i>B. circulans</i>	20-50°C	146	1,7 mg/cm ² membrana	Leche desnatada	Inhibición competitiva por α- y β-galactosa y formación de oligosacáridos (Ecuaciones 3.65 a 3.69)	-		-	
Flaschel y col., 1982	<i>A. niger</i>	50	25-500	250-5000	Sin tamponar	Inhibición competitiva por β-galactosa y mixta por α-galactosa (Ecuación 3.57)	50	12.2	53.9	0.92 (α) 11(β)

¹ μmol .(mg min)⁻¹ / ² mmol.l⁻¹ / ³ mmol.l⁻¹ / ⁴ (μmol/ U. min)

3.1.3.- Discriminación del modelo cinético y obtención de los parámetros cinéticos

La discriminación del modelo cinético de una reacción enzimática y el cálculo de los parámetros que en él aparecen se puede hacer mediante la metodología bien conocida y aplicada en otras reacciones químicas (Raghavan y Doraiswamy, 1977; Doraiswamy y Sharma, 1984; García-Ochoa y col., 1989 a, 1989 b, 1990 a y 1990 b; García-Ochoa y Santos, 1995). Las etapas a seguir son:

Obtención de datos experimentales

La experimentación debe realizarse teniendo en cuenta todas las variables que puedan influir en la velocidad de reacción. Hay que seleccionar las variables a considerar y determinar el intervalo experimental para cada una de ellas. Posteriormente se llevan a cabo experimentos para distintos valores de las variables, dentro de los intervalos seleccionados.

Antes de realizar el estudio de una reacción enzimática es necesario conocer la actividad y la estabilidad de la enzima frente a variables intrínsecas al medio de reacción como la temperatura, fuerza iónica, presencia de iones y compuestos orgánicos. Para ello, se deben llevar a cabo lo que se denominará experimentos previos. Se seleccionan las condiciones óptimas del medio para que la enzima sea más activa durante el mayor tiempo posible y, fijadas estas condiciones, se lleva a cabo el estudio cinético. Se seleccionan las variables que afectan a la cinética de la reacción: en este caso, concentraciones de sustrato, productos y enzima, y temperatura en fase líquida, y se delimita el intervalo experimental de cada variable.

Una vez seleccionadas las variables y el intervalo de variación se debe elegir el equipo donde se llevará a cabo la reacción. Estos equipos pueden ser:

- Reactores discontinuos, en los que se obtienen datos integrales (C_s frente a tiempo).
- Reactores continuos tubulares o tanques de mezcla completa, donde se obtienen datos de C_s frente a V/Q , o de la velocidad de reacción (r) frente a C_s , respectivamente.

La mayoría de los estudios cinéticos de reacciones enzimáticas con las enzimas en la misma fase que los sustratos y productos (enzimas en disolución) se han llevado a cabo en reactores discontinuos.

Métodos de interpretación de los datos de reactor discontinuo

Existen dos métodos generales de interpretación de datos cinéticos: el diferencial y el integral.

I. Método diferencial

En este método es necesario calcular, para unos valores de las concentraciones de reactivos y productos, la velocidad de reacción. En el reactor discontinuo, los datos experimentales son concentración de producto o reactivo frente a tiempo, es decir, datos integrales. La velocidad de reacción para cada tiempo se calcula como derivada de la curva C_S frente al tiempo.

$$r = - \frac{dC_S}{dt} \quad [3.71]$$

Calculados los valores de velocidad de reacción a cada tiempo, se proponen diversos modelos cinéticos, y se ajustan los valores de velocidad y los valores de concentración de reactivo o producto de acuerdo a los modelos considerados. Para ajustar los datos experimentales a los modelos propuestos se utilizan métodos numéricos de regresión lineal o no lineal.

1.- *Linealización de las ecuaciones cinéticas. Ajuste por regresión lineal*

No siempre la velocidad de reacción es una función lineal de las concentraciones. En este caso, para aplicar este método hay que manipular la ecuación cinética, convirtiéndola en una función lineal. Por ejemplo, la ecuación cinética del mecanismo Michaelis-Menten simple (ecuación [3.7]) se puede linealizar de tres formas diferentes: la

linealización de Lineweaver-Burk, la de Hanes y la de Eadie-Hofstee, cuyas ecuaciones son las siguientes:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{k_2 C_E} + \frac{K_M}{k_2 C_E} \frac{1}{C_S} \quad [3.72]$$

$$\frac{C_S}{r} = \frac{K_M}{k_2 C_E} + \frac{1}{k_2 C_E} C_S \quad [3.73]$$

$$r = k_2 C_E - K_M \frac{r}{C_S} \quad [3.74]$$

Los parámetros se obtienen por regresión lineal simple de la variable independiente (primer término de las ecuaciones [3.72] a [3.74]) frente a la variable independiente que corresponda.

La linealización más utilizada es la de Lineweaver-Burk. Sin embargo, esta linealización tiende a dar más importancia a los errores en los valores de r más bajos, lo que la hace adecuada para calcular k_2 , pero no tanto para calcular K_M . Una forma de solventar este problema es dar distinta significación estadística a cada punto, normalmente variándola de forma lineal. Esta técnica se conoce como “weighting”: dar un peso en la regresión a cada punto. De esta manera se puede compensar estadísticamente el error en cada punto a lo largo de la recta de regresión. Esta técnica es, en sí misma, tendenciosa, porque discrimina los puntos estadísticamente, sin tener en cuenta errores experimentales aleatorios.

La linealización de Hanes es más adecuada desde el punto de vista estadístico, porque distribuye mejor los errores en los puntos a lo largo de la recta de regresión. Aún así, se necesita el uso de pesos para una determinación más exacta de los parámetros, pero la variación de significación estadística entre los puntos experimentales extremos es mucho menor que con la linealización de Lineweaver-Burk. La linealización de Eadie-Hofstee es útil para observar desviaciones del comportamiento cinético de Michaelis-Menten.

Cuando hay términos de inhibición, por sustrato o por productos u otros inhibidores, las ecuaciones cinéticas son funciones más complejas de las concentraciones

que la ecuación [3.7], pero se pueden linealizar por los mismos procedimientos, llegando a ecuaciones similares a las ecuaciones [3.72] a [3.74]. En estos casos, hay más de una variable independiente, por lo que la regresión lineal utilizada debe ser múltiple.

Cuando se ajustan datos diferenciales o r vs C_s mediante regresiones lineales, sólo se pueden considerar datos a temperatura constante. Conocidos los parámetros a cada temperatura, se les aplica la ecuación de Arrhenius para conocer la energía de activación y el término preexponencial. El empleo de las linealizaciones ha sido cuestionado por diversos autores por la manipulación a que se somete a la ecuación diferencial (Froment y Bischoff, 1990).

2.- *Ajuste de datos diferenciales por Regresión no lineal*

Para evitar la manipulación de las variables que supone linealizar la ecuación cinética y el error que ello conlleva en los parámetros obtenidos, se puede recurrir a una técnica de regresión no lineal. En este caso, la temperatura puede ser una constante o puede incluirse como una variable más. Uno de los métodos de regresión no lineal más frecuentemente aplicado es el de Marquardt (Marquardt, 1963). Una de las dificultades que plantea la aplicación de la regresión no lineal es que es necesario introducir unos valores iniciales de los parámetros que se pretenden calcular. Estos parámetros iniciales deben ser suficientemente próximos a los finales para que la regresión no dé problemas de convergencia.

La regresión no lineal se puede aplicar directamente a ecuaciones diferenciales en las que se haya desglosado cada parámetro cinético según la ecuación de Arrhenius. Así, se pueden ajustar datos r vs C_s obtenidos a distintas temperaturas y obtener los parámetros en función de la temperatura.

II. Método integral

En este método no se calcula la velocidad r como etapa previa, si no que se analizan directamente los datos de concentración vs. tiempo. Por ello, en el balance de materia, se sustituye la velocidad de reacción por el modelo cinético a ensayar, resultando

así una expresión donde las variables son concentraciones y tiempo y los parámetros a determinar las constantes cinéticas del modelo. Para un reactor discontinuo, el balance de materia, una vez sustituido r por una $f(T, C_s)$ resulta ser una integral del tipo:

$$t = \int_{C_{s0}}^{C_s} - \frac{dC_s}{f(T, C)} \quad [3.75]$$

según sea $f(T, C)$, la integración de la ecuación [3.75] es más o menos compleja. En ciertos casos, se puede resolver analíticamente y en otros es más sencillo hacerlo numéricamente. En el primer caso, el cálculo de los parámetros cinéticos se realiza por regresión –lineal o no lineal según sea la ecuación integrada- o mediante regresión no lineal acoplada a un método numérico de integración- por ejemplo, Runge-Kutta-.

Se pueden ajustar los datos obtenidos a una temperatura, y calcular los parámetros cinéticos de cada modelo propuesto para esa temperatura. También se puede considerar la temperatura como una variable y analizar a la vez todos los datos obtenidos a todas las temperaturas.

III.- Criterios aplicados en la discriminación del modelo cinético

Cualquiera que sea la regresión que se utiliza, esta tiene una función objetivo que minimizar. Esta función siempre es una relación entre valores experimentales y valores calculados y, al hacerla mínima, se busca el mejor ajuste posible para el modelo aplicado. Tanto en la regresión lineal como en la no lineal, la función objetivo es la suma de residuos al cuadrado.

Para cualquiera de las dos regresiones consideradas (lineal o no lineal), la discriminación del modelo cinético se realiza teniendo en cuenta criterios físicos y estadísticos que se aplican a los parámetros cinéticos calculados en cada modelo. Estos criterios son (Raghavan y Doraiswamy, 1977; García-Ochoa y col., 1989):

a) Criterios estadísticos:

a1) En la regresión lineal son:

- La F de Fischer, que indica la significación del modelo y que debe tener un valor superior a un cierto valor tabulado para una probabilidad determinada (95%, usualmente)
- La t de Student de cada parámetro, que indica el intervalo de confianza de dicho parámetro, debe tener valores superiores a los tabulados para una probabilidad determinada (95%).

a2) En la regresión no lineal son:

- El valor de la suma de residuos al cuadrado (SQR), que debe ser lo menor posible.
- La F de Fischer.
- La t de Student de cada parámetro, que indica el intervalo de confianza de dicho parámetro. Los parámetros no deben incluir el cero en el intervalo de confianza.

b) Criterios físicos:

- Los parámetros cinéticos y las constantes de equilibrio no pueden ser negativos.
- La variación de los parámetros cinéticos con la temperatura debe ser consistente: las constantes cinéticas deben tener una energía de activación positiva. Otros parámetros, como K_M y K_I , pueden seguir otra tendencia con la temperatura.

Para discriminar entre los modelos cinéticos, podría utilizarse únicamente el método diferencial, empleando regresión lineal o no lineal, o el método integral. Cuando se emplea la regresión no lineal, en cualquiera de los dos métodos, se puede considerar la temperatura como una constante o como una variable. Independientemente del método elegido, hay que aplicar los criterios físicos y estadísticos a los parámetros obtenidos.

El grado de validez de cada uno de los métodos puede ser cuestionado, siendo, en general, más fiables (reproducen mejor los datos) los parámetros obtenidos utilizando el método integral, concretamente, la regresión no lineal con la temperatura como variable

(es decir, ajustar todos los datos experimentales a los modelos cinéticos propuestos). Una posibilidad es combinar los métodos anteriores en la siguiente secuencia:

- Aplicar el método diferencial y, mediante las linealizaciones de los modelos cinéticos, obtener valores de los parámetros cinéticos que puedan utilizarse como valores iniciales de la regresión no lineal.
- Aplicar, en segundo lugar, el método integral. En este caso, dado que se utiliza la regresión no lineal generalmente, los parámetros iniciales pueden ser los obtenidos en el método diferencial.

En cualquier caso, tanto en la aplicación del método diferencial como en la del método integral, hay un momento en el que hay que elegir los modelos cinéticos a considerar. En el caso de las reacciones de hidrólisis de lactosa y de ONPG, los modelos cinéticos que se van a analizar son los que se presentan en las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4.

Tabla 3.2. - Modelos cinéticos considerados para la hidrólisis de ONPG y lactosa por β -galactosidasa.
Inhibición por un solo compuesto

Modelo	MECANISMO	ECUACIÓN CINÉTICA	REFERENCIA
Orden 1	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$	$r = k C_E C_S$	Modelo 1
Michaelis-Menten simple	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M + C_S}$	Modelo 2
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por sustrato	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $ES + S \xrightleftharpoons{K_I} ESS$	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M + C_S \left(1 + \frac{C_S}{K_I}\right)}$	Modelo 3
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $E + P \xrightleftharpoons{K_I} EP$	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_S}{K_I}\right) + C_S}$	Si P=ONP o glu Modelo 4 Si P=gal Modelo 8
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por producto	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $ES + P \xrightleftharpoons{K_I} ESP$	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M + C_S \left(1 + \frac{C_P}{K_I}\right)}$	Si P=ONP o glu Modelo 5 Si P=gal Modelo 9

Nota: gal = galactosa; glu = glucosa y ONP = o-nitrofenol

Tabla 3.2.(cont.) - Modelos cinéticos considerados para la hidrólisis de ONPG y lactosa por β -galactosidasa.
Inhibición por un solo compuesto

Modelo	MECANISMO	ECUACIÓN CINÉTICA	REFERENCIA
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por producto	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $E + P \xrightleftharpoons{K_I} EP$ $ES + P \xrightleftharpoons{K_I} ESP$	$r = \frac{k C_E C_S}{(K_M + C_S) \left(1 + \frac{C_P}{K_I}\right)}$	Si P=ONP o glu Modelo 6 Si P=gal Modelo 10
Michaelis-Menten con inhibición mixta por producto	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $E + P \xrightleftharpoons{K_I} EP$ $ES + P \xrightleftharpoons{K'_I} ESP$	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_P}{K_I}\right) + C_S \left(1 + \frac{C_P}{K'_I}\right)}$	Si P=ONP o glu Modelo 7 Si P=gal Modelo 11

Nota: gal = galactosa; glu = glucosa y ONP = o-nitrofenol

Tabla 3.3.(cont.) - Modelos cinéticos considerados para la hidrólisis de ONPG y lactosa por β -galactosidasa. Inhibición por dos productos.

MODELO	ECUACIÓN CINÉTICA	REFERENCIA
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por producto 2 y no competitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} \right) + C_S \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right)}$	Modelo 17
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por producto 2 y competitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right) + C_S \left(1 + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right)}$	Modelo 18
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por producto 2 y acompetitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right) + C_S \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right)}$	Modelo 19
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por producto 2 y no competitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right) + C_S \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right)}$	Modelo 20

Nota: Producto 2= o-nitrofenol en la hidrólisis de ONPG y glucosa en la hidrólisis de lactosa



Tabla 3.3- Modelos cinéticos considerados para la hidrólisis de ONPG y lactosa por β -galactosidasa.
Inhibición por dos productos.

MODELO	ECUACIÓN CINÉTICA	REFERENCIA
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto 2 y competitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right) + C_S}$	Modelo 12
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto 2 y acompetitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right) + C_S \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} \right)}$	Modelo 13
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto 2 y no competitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right) + C_S \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} \right)}$	Modelo 14
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por producto 2 y competitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} \right) + C_S \left(1 + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right)}$	Modelo 15
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por producto 2 y acompetitiva por galactosa	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M + C_S \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{p2}}{K_{I2}} \right)}$	Modelo 16

Nota: Producto 2= o-nitrofenol en la hidrólisis de ONPG y glucosa en la hidrólisis de lactosa

Tabla 3.4- Modelos cinéticos considerados para la hidrólisis de ONPG y lactosa por β -galactosidasas. Inhibición por sustrato y un producto.

MODELO	ECUACION CINETICA	REFERENCIA
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por sustrato y competitiva por un producto	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_P}{K_{IP1}}\right) + C_S \left(1 + \frac{C_S}{K_{IS}}\right)}$	Modelo 21
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por sustrato y acompetitiva por un producto	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M + C_S \left(1 + \frac{C_P}{K_{IP1}} + \frac{C_S}{K_{IS}}\right)}$	Modelo 22
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por sustrato y no competitiva por un producto	$r = \frac{k C_E C_S}{K_M \left(1 + \frac{C_P}{K_{IP1}}\right) + C_S \left(1 + \frac{C_P}{K_{IP1}} + \frac{C_S}{K_{IS}}\right)}$	Modelo 23

3.2.- MODELOS CINÉTICOS DE LAS REACCIONES DE HIDRÓLISIS CON β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces fragilis* EN DISOLUCIÓN

Esta enzima está contenida en un preparado comercial suministrado por Novo Nordisk Ltd., denominado Lactozym, que ya fue descrito en el apartado 2.1.1. Primero han realizado algunos experimentos previos para determinar las condiciones en que la enzima es más estable y activa. En esas condiciones, y en el intervalo de variables seleccionado, se abordó el estudio cinético de las reacciones de hidrólisis de lactosa y ONPG, discriminando para cada una de estas reacciones el modelo cinético que mejor reproduce los resultados experimentales y calculando los correspondientes parámetros cinéticos.

3.2.1.- Experimentos previos

Estos estudios tienen como finalidad determinar la influencia de ciertas variables intrínsecas del medio de reacción en la actividad y la estabilidad de la enzima. Estas variables son: composición del tampón, pH del medio y temperatura. Conocidos sus efectos, se pueden acotar intervalos experimentales de estas variables en los que la enzima tenga una actividad máxima y sea estable durante un periodo razonable (al menos, de un orden superior a la duración de un experimento cinético). Estudios similares han sido realizados para la misma enzima por otros autores, empleando también enzima procedente de *K. fragilis* (Mahoney, 1978), para conocer el comportamiento de la enzima frente a iones del medio y frente a la concentración de los iones propios del medio y de proteínas y otras sustancias contenidas en la leche.

Los experimentos de hidrólisis de lactosa se han llevado a cabo en tampón M, que tiene la composición salina de la leche y su pH (6,5). En este caso, no se ha modificado la composición del medio ni el pH.

Para la experimentación con ONPG, se ha utilizado un tampón fosfato, estudiando la influencia de su composición en la actividad de la enzima.

Influencia de la composición del tampón en la actividad de la enzima

Para optimizar el tampón fosfato, se midió la actividad de la enzima Lactozym (*K. fragilis*) utilizando como sustrato ONPG y llevando a cabo la reacción en unas condiciones previamente fijadas (Herrero, 1995): 25°C y una concentración del ONPG de 0,5 g/L. La concentración de enzima añadida fue de 0,7 mg/L. En cada experimento se variaron las concentraciones de los distintos compuestos que forman el tampón fosfato.

El tampón fosfato está formado por las siguientes especies: monohidrógenofosfato dipotásico (K_2HPO_4), dihidrógenofosfato potásico (KH_2PO_4), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) y mercaptoetanol ($HS-CH_2-CH_2OH$). Se utilizó un tampón de pH 7, que es el pH óptimo para la hidrólisis enzimática de ONPG según la literatura (Wallenfelds y Weil, 1972). Los experimentos realizados para seleccionar la composición del tampón se resumen en la Tabla 3.5. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 3.1 a 3.3

En la Figura 3.1 se muestra el efecto de la concentración de ión potasio sobre la actividad de la enzima. Este ión, que procede del K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y KOH añadido para ajustar el pH (si se necesita), parece inhibir a la enzima a concentraciones altas, por lo que se elige la menor concentración ensayada: 50 mM.

En la Figura 3.2 se puede observar el efecto del mercaptoetanol en la actividad de la enzima. La ausencia de mercaptoetanol (ME) lleva a una desactivación rápida de la enzima, ya que la reacción se para a conversión muy baja. Su presencia evita esta desactivación, que es probablemente debida a una oxidación. A concentraciones de mercaptoetanol entre 1 y 10 mM, se observa que esta variable afecta poco a la velocidad de reacción. Para asegurar una presencia suficiente de este reactivo durante la reacción en el medio, ya que es relativamente volátil, se ha elegido la concentración de 5 mM.

La Figura 3.3 muestra el efecto del ión magnesio en la actividad de la enzima. Se observa que la presencia de este ión activa la enzima, pero que esta actividad no varía a partir de una concentración de 1 mM, por lo que se elige esta concentración en la experimentación posterior.

Para estudiar la estabilidad con el tiempo de las disoluciones de enzima en los tampones ensayados, se dejó almacenada la enzima en cada uno de ellos durante una semana y se midió la actividad de la misma tras este tiempo, mediante el protocolo standard de hidrólisis de ONPG (Herrero, 1995). Los experimentos realizados se muestran en la Tabla 3.6 y los resultados obtenidos en la Figura 3.4.

Como se observa en la Figura 3.4, las disoluciones de enzima conservan su actividad durante una semana, al menos, en todos los tampones ensayados. Quizás hay una pequeña desactivación en el tampón BP 100 mM (experimentos 2 y 2').

Tabla 3.5 -. Experimentos previos para determinar la composición del tampón BP.

	$C_{KH_2PO_4}$	$C_{K_2HPO_4}$	C_{KOH}	C_{K^+}	$C_{Mercaptoetanol}$	$C_{Mg^{2+}}$
PLD-1	50	50	2,8	200	10	1
PLD-2	25	25	0,98	92,5	10	1
PLD-3	25,5	24,5	-	74,5	10	1
PLD-4	25,5	24,5	-	74,5	5	1
PLD-5	25,5	24,5	-	74,5	2,5	1
PLD-6	25,5	24,5	-	74,5	1	1
PLD-7	25,5	24,5	-	74,5	0,5	1
PLD-8	25,5	24,5	-	74,5	0	1
PLD-9	25,5	24,5	-	74,5	5	10
PLD-10	25,5	24,5	-	74,5	5	5
PLD-11	25,5	24,5	-	74,5	5	0,1
PLD-12	25,5	24,5	-	74,5	5	0

Nota: las concentraciones son mM

Tabla 3.6 -Experimentos previos. Influencia de la composición del tampón en la estabilidad de la actividad de la enzima con el tiempo.

	t (h)	$C_{KH_2PO_4}$	$C_{K_2HPO_4}$	C_{KOH}	C_{K^+}	$C_{Mercaptoetanol}$
LD-2	0	25	25	0,98	92,5	10
PLD-2'	168	25	25	0,98	92,5	10
LD-3	0	25,5	24,5	-	74,5	10
LD-3'	168	25,5	24,5	-	74,5	10
LD-4	0	25,5	24,5	-	74,5	1
LD-4'	168	25,5	24,5	-	74,5	1
LD-6	0	25	25	0,98	92,5	1
LD-6'	168	25	25	0,98	92,5	1

Nota: las concentraciones son mM. La concentración de Mg^{2+} es de 1 mM en todos.

Otra forma de analizar cómo influye la composición del tampón en la actividad y estabilidad de la enzima es comparar como varía la velocidad inicial en cada experimento. Esta velocidad se calcula como:

$$r_0 = - \left. \frac{dC_{ONPG}}{dt} \right|_{t=0} = C_{ONPG0} \left. \frac{dX_{ONPG}}{dt} \right|_{t=0} \quad [3.76]$$

los resultados se muestran en las Tablas 3.7 y 3.8.

Tabla 3.7.- Resultados de los experimentos de la Tabla 3.5.

Experimento	PLD-1	PLD-2	PLD-3	PLD-4	PLD-5	PLD-6	PLD-7	PLD-8
r ₀ (mM/min)	0,34	0,62	0,63	0,66	0,67	0,64	0,61	0,14

Experimento	PLD-9	PLD-10	PLD-11	PLD-12
r ₀ (mM/min)	0,68	0,67	0,24	0,02

Tabla 3.8.- Resultados de los experimentos de la Tabla 3.6.

Experimento	PLD-2	PLD-2'	PLD-3	PLD-3'	PLD-4	PLD-4'	PLD-6	PLD-6'
r ₀ (mM/min)	0,62	0,45	0,63	0,62	0,64	0,63	0,46	0,46

Como ya se había indicado, los resultados de la Tabla 3.7 confirman que la disminución de la concentración de ión potasio de 100 a 50 mM aumenta la velocidad de reacción, coincidiendo con los resultados de Mahoney (1978); mientras que la concentración de mercaptoetanol, en el intervalo 1-10 mM, no afecta excesivamente a la velocidad de reacción y que la presencia de ión magnesio no afecta a la actividad de la enzima por encima de una concentración 1 mM, pero su ausencia implica la pérdida de la actividad.

Los resultados de estabilidad de las soluciones enzimáticas en diferentes tampones (Tabla 3.8) confirman que la actividad se conserva en todos los casos, excepto a concentración alta de mercaptoetanol (experimentos 2 y 2'), donde disminuye levemente.

Con los resultados obtenidos se eligió el siguiente tampón para realizar los experimentos cinéticos: tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0 ($C_{HPO_4^{2-}}=25,5$ mM y $C_{H_2PO_4^-}=24,5$ mM) al que se le añade $MgCl_2$ 1 mM y mercaptoetanol 5 mM. En este tampón (blanco) se realizaron varios experimentos, añadiendo varios cationes divalentes y

trivalentes, para analizar cuál era su influencia sobre la actividad de la enzima. Estos cationes se añadieron al medio seleccionado en una concentración 0,1 mM. Cada experimento se realizó siguiendo el procedimiento estándar de medida de actividad (Herrero, 1995). La actividad relativa se calcula como el cociente de velocidades iniciales de reacción; los resultados se muestran en la Figura 3.5.

Los resultados que muestra la Figura 3.5 indican que el manganeso y, en menor medida, el cobalto y el zinc activan la enzima Lactozym. En el caso del manganeso, esa activación llega al 50%; de hecho, todos los iones probados activan en mayor o menor grado la enzima, excepto el hierro.

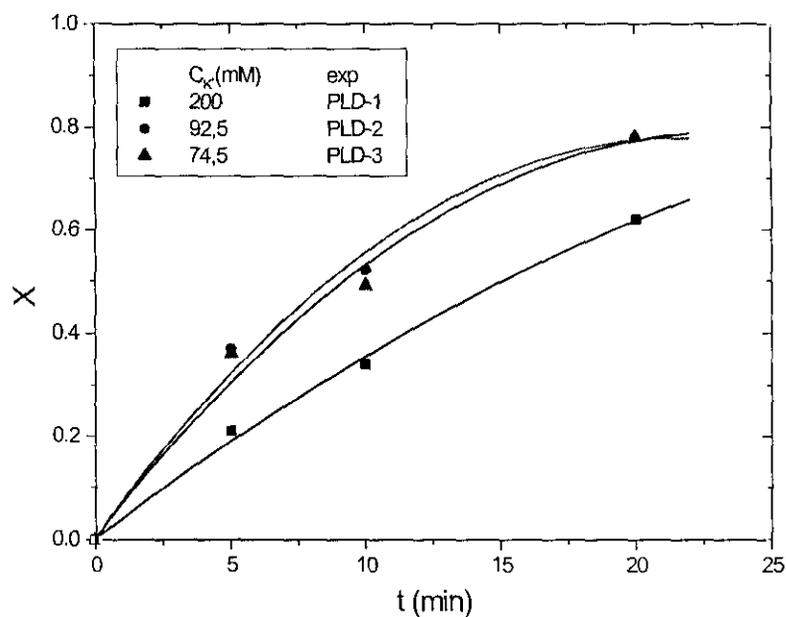


Figura 3.1.- Efecto de la concentración de ión K^+ sobre la actividad de la β -galactosidasa de *K. fragilis*. $C_{Mg^{2+}} = 1\text{mM}$; $C_{ME} = 10\text{mM}$

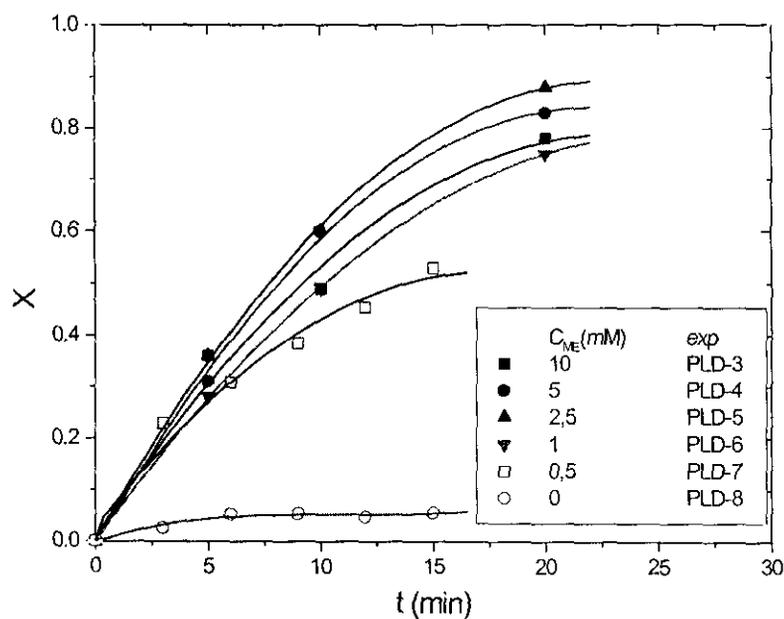


Figura 3.2.- Efecto de la concentración de mercaptoetanol sobre la actividad de la β -galactosidasa de *K. fragilis*.
 $C_{KH_2PO_4} = 25,5\text{mM}$; $C_{K_2HPO_4} = 24,5\text{mM}$; $C_{K^+} = 74,5\text{mM}$; $C_{Mg^{2+}} = 1\text{mM}$

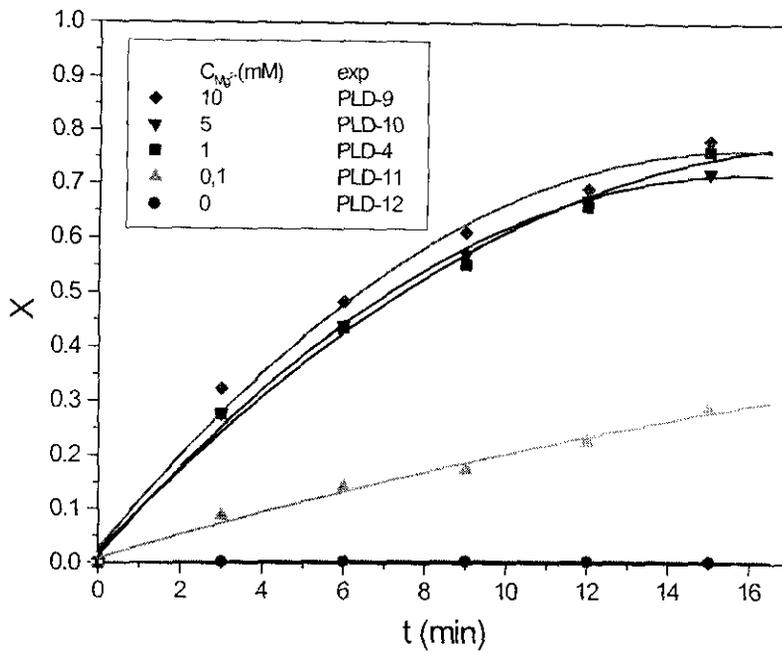


Figura 3.3.- Efecto de la concentración de ión Mg^{2+} sobre la actividad de β -galactosidasa de *K. fragilis*. $C_{K_1H_2PO_4} = 25,5$ mM; $C_{K_2HPO_4} = 24,5$ mM; $C_{K^+} = 74,5$ mM; $C_{ME} = 5$ mM

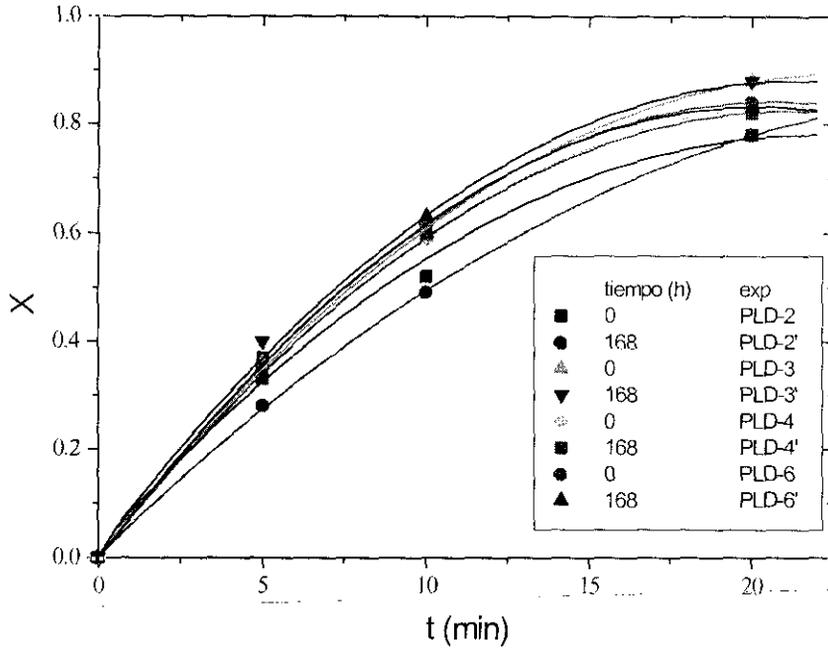


Figura 3.4.- Estabilidad de las disoluciones de la β -galactosidasa de *K. fragilis* en varios tampones.

Influencia del pH en la actividad de la enzima

Para analizar la influencia de esta variable en la actividad de la enzima se han realizado una serie de experimentos modificando el pH del medio entre 5 y 9. Se han utilizado como reactivos ONPG y lactosa, tanto en el tampón fosfato seleccionado en el apartado anterior como en el tampón denominado BM, de composición descrita en el apartado 2.2.1. El intervalo de pH se ha estudiado entre 5 y 9 (ajustando el pH con NaOH y H₂SO₄). Este estudio es necesario para determinar el pH óptimo (al cual la enzima muestra una máxima actividad) tanto para la reacciones de hidrólisis de ONPG como de lactosa.

Los datos de concentración de producto vs. tiempo, obtenidos en cada experimento, se han ajustado a funciones matemáticas tipo doble exponencial. Derivando dichas curvas, se han obtenido los datos de velocidad inicial de reacción, r_0 , de acuerdo a la ecuación [3.2]. Este parámetro ha sido utilizado para determinar el pH óptimo de la enzima en cada tampón y con cada reacción.

En las Figuras 3.6 y 3.7 se representa la variación de la velocidad de reacción inicial con el pH, al emplear como medios de reacción BP y BM.

En la Figura 3.6 se observa que la actividad del Lactozym en la hidrólisis de lactosa es mayor en BP que en BM, y que, en ambas, el valor óptimo de pH está próximo a 6,5. La actividad de la enzima en la hidrólisis de ONPG (Figura 3.7) apenas varía con el tampón utilizado y es máxima a un pH en torno a 6,5. Por tanto, puede decirse que ni el sustrato ni los tampones empleados afectan al pH óptimo de esta enzima en las reacciones de hidrólisis consideradas, que puede fijarse entre 6,5 y 7.

Influencia del pH en la estabilidad de la enzima

Para conocer el afecto del pH en la estabilidad de la enzima se ha seguido el protocolo descrito en el punto 2.2.4.3. La Figura 3.8 muestra cómo varía la actividad de Lactozym con el tiempo de almacenamiento a cada pH. Se observa que la enzima es poco estable a pH ácido, mientras que es relativamente estable entre pH 6 y 9. Su máxima

estabilidad se observa a pH 7, que es muy próximo al pH óptimo encontrado para la actividad enzimática.

Influencia de la temperatura en la estabilidad de la enzima

El efecto de la temperatura en la desactivación de las enzimas se analiza siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.4.3. Para llevar a cabo este estudio con Lactozym se han empleado temperaturas de 20, 30, 40, 45 y 50 °C. La concentración de enzima se ha fijado en 70 mg/L, realizando los experimentos en Erlenmeyers que contienen tampón BP y que se han termostatizado a las temperaturas indicadas. La actividad residual se calcula como el cociente entre la velocidad inicial, r_0 , obtenida a un cierto tiempo de incubación de la enzima a la temperatura considerada y su valor a tiempo cero de incubación. En la Figura 3.9 se han representado los resultados de actividad residual vs. tiempo. Se observa que la temperatura máxima a la que Lactozym es estable es 40°C. Por encima de esta temperatura, la enzima sufre una pérdida de actividad considerable. Por otra parte, cuanto más baja sea la temperatura, la reacción de hidrólisis será más lenta, por lo que, para su aplicación industrial, habrá que llegar a un compromiso para la elección de la temperatura más conveniente en cada caso.

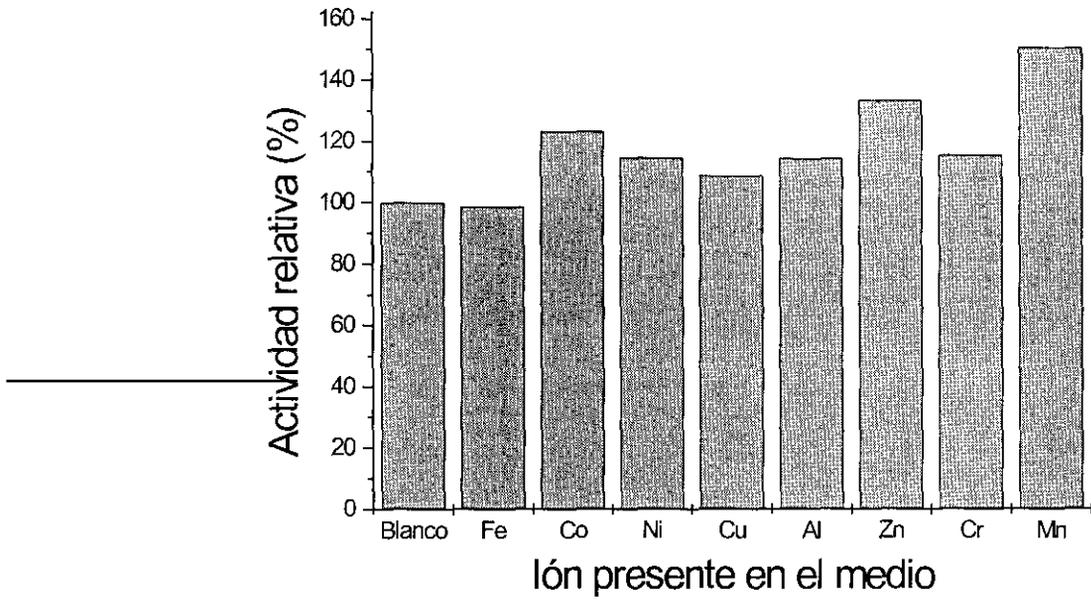


Figura 3.5.- Actividad de β -galactosidasa de *K. fragilis* frente a distintos cationes metálicos. Actividad relativa vs. ión añadido al BP.

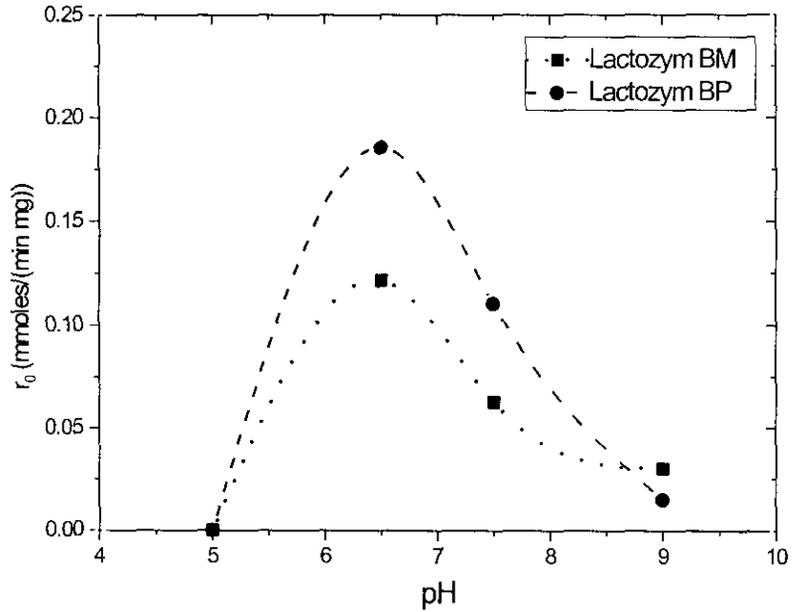


Figura 3.6.- Efecto del pH en la hidrólisis de lactosa por la β -galactosidasa de *K. fragilis*. Velocidad inicial vs pH en distintos tampones. $T=40^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{lac } 0}=50 \text{ g/L}$; $C_E=7 \text{ mg/L}$

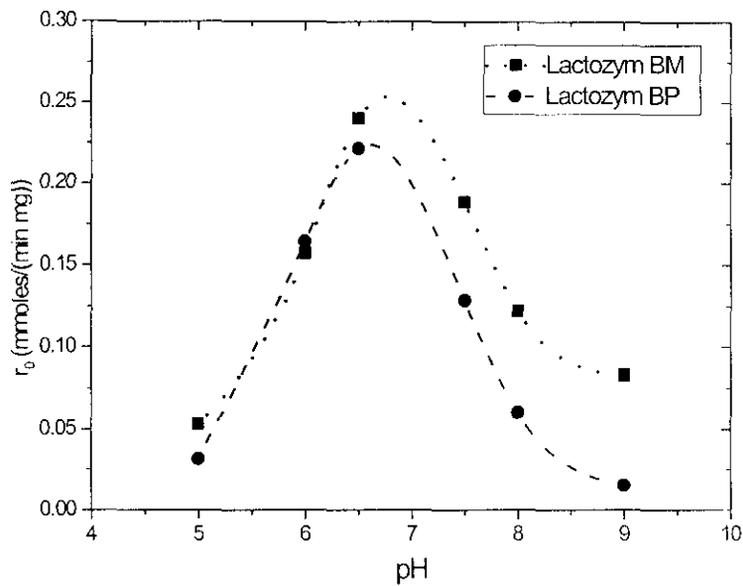


Figura 3.7.- Efecto del pH en la hidrólisis de ONPG por la β -galactosidasa de *K. fragilis*. Velocidad inicial vs pH en distintos tampones. $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG } 0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_{\text{E}}=0,7 \text{ mg/L}$

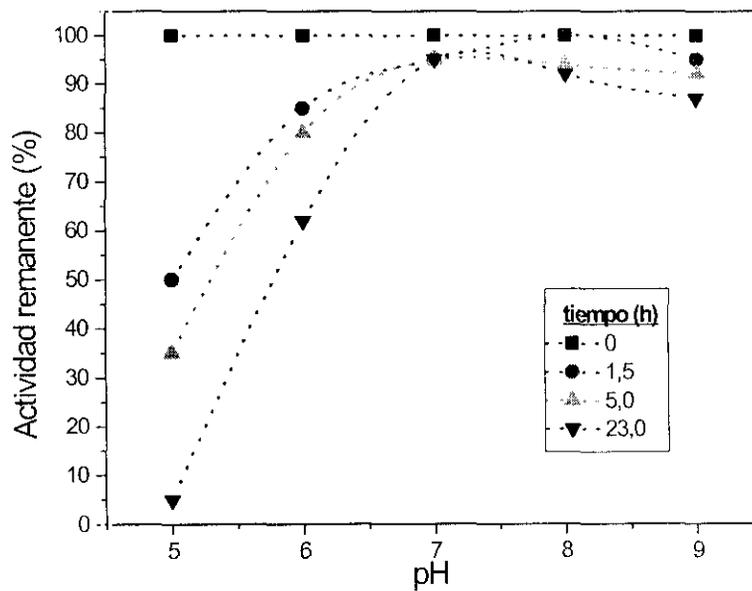


Figura 3.8.- Efecto del pH en la estabilidad de la β -galactosidasa de *K. fragilis*. Actividad residual vs pH en BP.

Medida de actividad estándar: $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG } 0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_{\text{E}}=0,7 \text{ mg/L}$

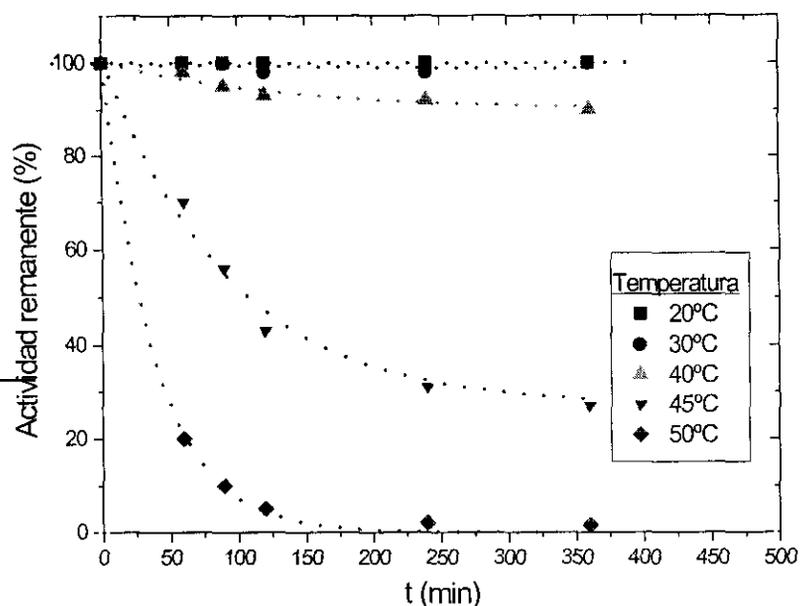


Figura 3.9.- Estabilidad de la β -galactosidasa de *K. fragilis* en BP frente a la temperatura. Actividad residual vs tiempo de incubación.
 Medida de actividad estándar: $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG } 0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_E=0,7 \text{ mg/L}$

3.2.2.- Modelo cinético de la reacción de hidrólisis de lactosa

El estudio cinético se realiza en las condiciones de pH y temperatura seleccionadas en el punto 3.2.1., para que la enzima tenga mayor actividad y la mantenga durante un periodo de tiempo razonable. En este caso, la composición del tampón (BM) y su pH (6,5) vienen fijados por las condiciones del medio salino de la leche (Novo, 1979) y se detallan en la Tabla 2.5. La máxima temperatura a la que se van a realizar los experimentos cinéticos es de 40°C , para evitar la desactivación de la enzima durante el tiempo que dura el experimento.

3.2.2.1.- Resultados experimentales

El estudio de la cinética de la reacción de hidrólisis de lactosa con Lactozym se llevó a cabo variando la temperatura entre 5 y 40°C , la concentración de enzima entre 2,3 y 7 mg/L, la concentración de lactosa entre 25 y 75 g/L y las concentraciones de los productos de la reacción (galactosa y glucosa) entre 0 y 15 g/L. Los experimentos

realizados se recogen en las Tablas 3.9 a 3.13. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 3.16 a 3.22, expresados como X_{lac} vs. el producto tiempo-concentración de enzima. En todos los casos, la conversión de lactosa a trisacáridos se mantuvo por debajo del 3%, por lo que la transgalactosidación es una reacción lateral que apenas es importante en la cinética del sistema de reacción aquí considerado.

Tabla 3.9.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 5°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL1	LL2	LL3	LL4	LL5	LL6	LL7	LL	LL9	LL10
$C_{lac}(g/L)$	75	50	50	50	50	50	25	50	50	50
$C_{gal}(g/L)$	0	0	7,5	15	0	0	0	0	7,5	15
$C_{glu}(g/L)$	0	0	0	0	7,5	15	0	0	0	0
$C_E(mg/L)$	7	7	7	7	7	7	7	4,6	4,6	4,6
tiempo(min)	X_{lac}									
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0,12	0,12	0,10	0,1	-	0,1	0,28	0,17	0,06	0,09
120	0,2	0,26	0,23	0,21	0,3	0,14	0,52	0,26	0,1	0,16
180	-	0,38	0,35	0,29	0,35	0,31	-	0,33	0,22	0,22
300	0,45	0,55	0,49	0,46	0,58	0,44	0,82	0,46	0,31	0,35
420	0,62	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
480	-	0,8	0,62	0,59	0,71	0,66	-	0,56	0,54	0,48
660	-	0,87	0,73	0,67	0,85	0,67	-	0,67	0,6	0,6
780	0,78	--	-	-	-	-	-	-	-	-
900					0,77	-	-	-	-	-
990	0,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1080	-	-	0,83	0,8	0,86	0,82	-	0,81	0,78	0,77
1200	0,92	-	-	-	-	-	-	-	-	--

Tabla 3.9.(cont.)- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 5°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL11	LL12	LL13	LL14	LL15	LL16	LL17
$C_{lac}(g/L)$	50	50	50	50	50	50	25
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0	7,5	15	0	0
$C_{glu}(g/L)$	7,5	15	0	0	0	7,5	15
$C_E(mg/L)$	4,6	4,6	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33
tiempo(min)	X_{lac}						
0	0	0	0	0	0	0	0
60	-	0,05	0,09	0,06	0,04	-	0,04
120	0,11	0,1	0,15	0,11	0,07	0,08	0,08
180	0,15	-	-	-	-	-	-
300	0,31	0,27	0,24	0,16	0,13	0,21	0,23
420	-	0,4	-	-	-	-	-
480	0,52	-	-	-	0,25	0,4	0,41
600	-	-	0,46	0,39	0,34	0,46	0,43
660	0,63	0,59	-	-	-	-	-
900	-	-	0,54	0,56	0,46	0,62	0,58
1200	0,8	0,76	0,7	0,64	0,59	0,71	0,65

Tabla 3.10.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 25°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL24	LL25	LL26	LL27	LL28	LL29	LL30	LL31	LL32
$C_{lac}(g/L)$	75	50	50	50	50	25	50	50	50
$C_{gal}(g/L)$	0	0	7,5	15	0	0	0	7,5	15
$C_{glu}(g/L)$	0	0	0	0	15	0	0	0	0
$C_E(mg/L)$	7	7	7	7	7	7	4,6	4,6	4,6
tiempo(min)	X_{lac}								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0,09	-	-	-	-	0,26	-	-	-
30	0,19	0,27	0,27	0,14	0,24	0,50	0,17	0,15	0,1
60	0,39	0,47	0,39	0,38	0,44	0,78	0,35	0,29	0,23
120	0,68	0,75	0,58	0,61	-	0,91-	0,57	0,5	0,44
180	0,8	0,84	0,77	-	0,73	-	0,68	0,63	0,56
240	0,9	0,93	-	-	0,76	-	0,71	0,72	0,66
300	-	-	-	0,8	0,81	-	0,77	0,74	0,68
360	-	-	0,85	0,83	-	-	0,82	0,79	0,77

Tabla 3.10.(cont.)- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 25°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL33	LL34	LL35	LL36	LL37	LL38	LL39	LL40	LL41
$C_{lac}(g/L)$	50	50	25	50	50	50	50	50	25
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0	0	7,5	15	0	0	0
$C_{glu}(g/L)$	7,5	15	0	0	0	0	7,5	15	0
$C_E(mg/L)$	4,6	4,6	4,6	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33
tiempo(min)	X_{lac}								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	-	-	0,15	-	-	-	-	-	0,07
30	0,16	0,15	0,29	0,09	0,07	0,06	0,06	0,07	0,15
60	0,32	0,31	0,53	0,17	0,17	0,13	0,13	0,17	0,26
120	0,55	0,55	0,75	0,33	0,32	0,23	0,23	0,32	0,48
180	0,68	0,65	0,88	0,52	0,45	0,35	0,35	0,58	0,64
240	0,76	0,71	0,94	0,63	0,56	0,44	0,44	0,62	0,81
300	0,78	0,74	-	0,7	0,6	0,49	0,49	0,63	0,89
360	0,84	0,75	-	0,77	0,67	0,56	0,56	0,7	-

Tabla 3.11.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 15°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL18	LL19	LL20	LL21	LL22	LL23
$C_{lac}(g/L)$	50	50	50	50	50	50
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0	0	15	0
$C_{glu}(g/L)$	0	0	15	0	0	15
$C_E(mg/L)$	7	7	7	2,33	2,33	2,33
tiempo(min)	X_{lac}					
0	0	0	0	0	0	0
60	0,28	0,19	0,25	0,09	0,06	0,09
120	0,49	0,37	0,45	0,19	0,13	0,15
180	0,66	0,49	0,59	0,3	0,2	0,23
240	0,74	0,58	0,66	0,35	0,25	0,29
300	0,77	0,65	0,72	0,44	0,33	0,37
360	0,79	0,69	0,75	0,48	0,35	0,4
420	0,82	0,72	0,79	0,51	0,4	0,45

Tabla 3.12.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 30°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL42	LL43	LL44	LL45	LL46	LL47
$C_{lac}(g/L)$	50	50	50	50	50	50
$C_{gal}(g/L)$	0	15	0	0	15	0
$C_{glu}(g/L)$	0	0	15	0	0	15
$C_E(mg/L)$	7	7	7	2,33	2,33	2,33
tiempo(min)	X_{lac}					
0	0	0	0	0	0	0
30	0,34	0,3	0,26	0,12	0,04	0,1
60	0,4	0,47	0,53	0,20	0,13	0,24
120	0,79	0,68	0,71	0,42	0,29	0,4
180	0,85	0,77	0,78	0,55	0,43	0,55
240	0,88	0,8	0,81	0,63	0,54	0,62
300	0,91	0,84	0,83	0,7	0,59	0,68
360	-	0,84	0,87	0,72	0,64	0,72

Tabla 3.13.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 40°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL48	LL49	LL50	LL51	LL52	LL53	LL54	LL55	LL56	LL57
$C_{lac}(g/L)$	75	25	75	50	50	50	50	50	25	50
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0	0	7,5	15	0	0	0	0
$C_{glu}(g/L)$	0	0	0	0	0	0	7,5	15	0	0
$C_E(mg/L)$	11,65	11,65	7	7	7	7	7	7	7	4,6
tiempo(min)	X_{lac}									
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,14	0,26	0,06	0,08	0,1	0,06	0,09	0,1	0,18	0,06
10	-	-	0,15	-	-	-	-	-	0,35	-
15	0,4	0,56	-	0,29	0,22	0,19	0,27	0,26	-	0,18
20	-	-	0,29	-	-	-	-	-	0,63	-
30	0,67	0,85	-	0,52	0,46	0,39	0,46	0,47	-	0,36
40	-	-	0,53	-	-	-	-	-	0,86	-
60	0,81	-	0,71	0,75	0,64	0,62	0,69	0,7	-	0,62
90	-	-	0,81	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	0,86	0,87	0,84	0,75	0,86	0,86	-	0,81
180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,84

Tabla 3.13.(cont.)- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 40°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LL58	LL59	LL60	LL61	LL62	LL63	LL64	LL65	LL66
$C_{lac}(g/L)$	50	50	25	50	50	50	50	50	25
$C_{gal}(g/L)$	15	0	0	0	5	15	0	0	0
$C_{glu}(g/L)$	0	15	0	0	0	0	5	15	0
$C_E(mg/L)$	4,6	4,6	4,6	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33
tiempo(min)	X_{lac}								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	-	-	0,12	-	-	-	-	-	0,07
15	0,17	0,2	0,33	0,09	0,05	0,04	0,08	0,07	0,19
30	0,3	0,35	0,55	0,17	0,14	0,11	0,19	0,17	0,36
60	0,46	0,55	0,81	0,33	0,3	0,22	0,32	0,31	0,59
90	-	-	-	0,44	0,43	0,3	0,45	0,4	-
120	0,66	0,72	0,82	0,51	0,53	0,4	0,5	0,5	0,82
180	0,8	0,83	-	0,65	0,6	0,51	0,62	0,62	-
270	-	-	-	0,71	0,73	0,6	0,82	0,66	-

3.2.2.2.- Análisis de las velocidades iniciales de reacción

Teniendo en cuenta la influencia de las variables analizadas en la velocidad inicial de reacción, r_0 , se puede realizar una discriminación cualitativa del modelo cinético. En las Figuras 3.10 a 3.12 se muestra la variación de r_0 con las concentraciones iniciales de lactosa, de galactosa y de glucosa, respectivamente, a diferentes temperaturas.

Los resultados de la Figura 3.10 muestran que, al aumentar la concentración de sustrato aumenta muy poco la velocidad inicial, por lo que se está cerca de la zona donde la enzima está saturada de sustrato, existiendo el complejo ES en una concentración mucho mayor que la de la enzima libre. El sustrato debe aparecer en el denominador del modelo cinético. Las concentraciones de sustrato utilizadas están próximas o coinciden con las de la leche de vaca y el suero, que son de 50 y 75 g/L, respectivamente. Se observa, también, que según disminuye la temperatura, las velocidades iniciales obtenidas a distintas concentraciones de sustrato se aproximan más entre sí, es decir, el orden de la reacción se aproxima cada vez más a cero. En un modelo de Michaelis-Menten simple, esto supondría que la constante de Michaelis, K_M , aumenta al aumentar la temperatura, es decir, que la afinidad de la enzima por el sustrato es menor a mayor T.

En los resultados que se muestran en la Figura 3.11 se observa que a todas las temperaturas estudiadas la adición de galactosa hace que disminuya la velocidad inicial de la reacción. Por tanto, la galactosa actúa como inhibidor. La Figura 3.12 muestra el efecto de añadir glucosa al comienzo de la reacción; se observa que la glucosa no parece inhibir la reacción, ya que se obtienen los mismos valores para la velocidad inicial cuando este monosacárido se añade o no al medio. Sólo en los experimentos a 5°C aparece cierta inhibición por glucosa.

Como consecuencia del análisis realizado, los modelos cinéticos a considerar serían modelos basados en el mecanismo de Michaelis-Menten que incluyeran inhibición por galactosa. En principio, podría descartarse la inhibición por glucosa.

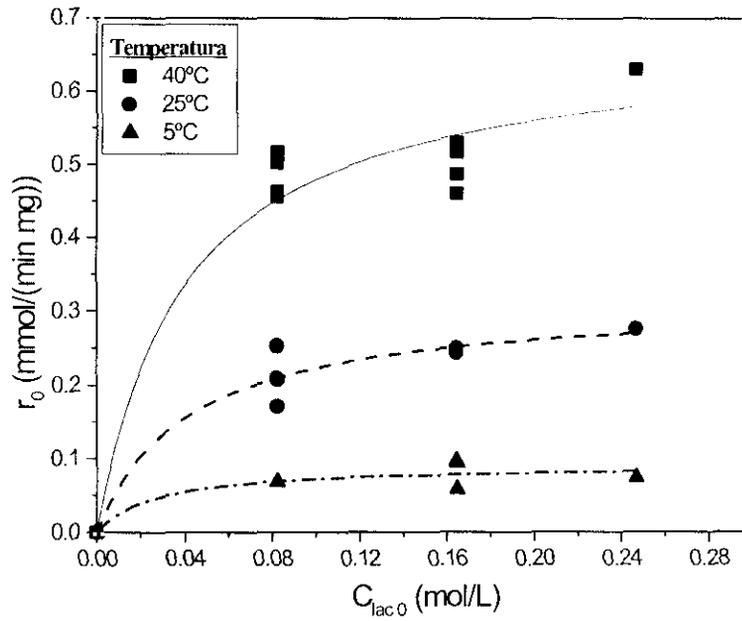


Figura 3.10. - Hidrólisis de lactosa con la β -galactosidasa de *K. fragilis*: r_0 vs $C_{lac\ 0}$ a varias temperaturas. $C_{gal\ 0} = 0$ g/L; $C_{glu\ 0} = 0$ g/L.

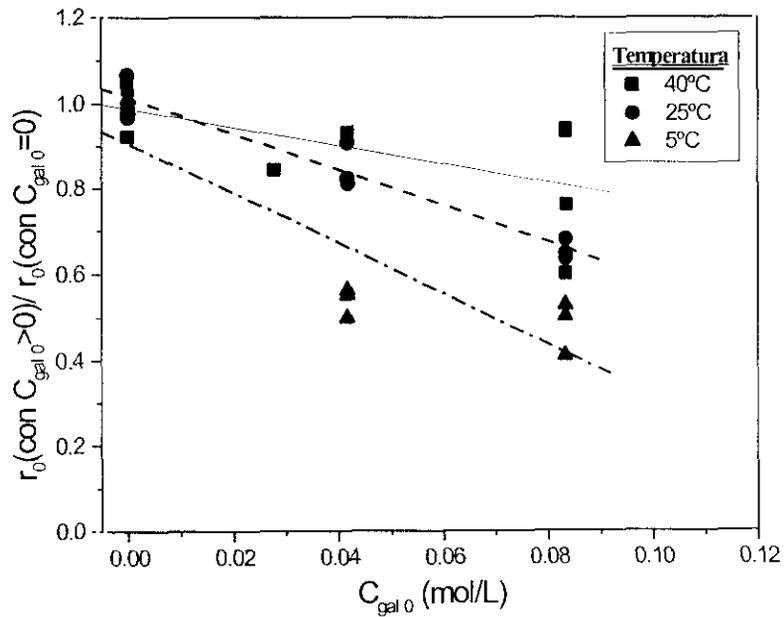


Figura 3.11. - Hidrólisis de lactosa con la β -galactosidasa de *K. fragilis*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin galactosa inicial vs $C_{gal\ 0}$ a varias temperaturas. $C_{lac\ 0} = 50$ g/L; $C_{glu\ 0} = 0$ g/L.

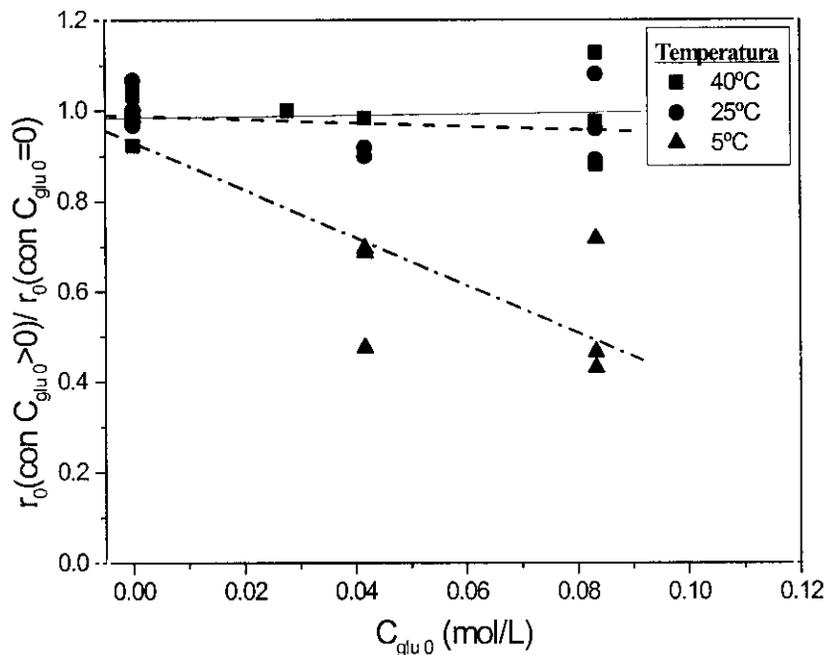


Figura 3.12. – Hidrólisis de lactosa con la β -galactosidasa de *K. fragilis*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin glucosa inicial vs C_{glu_0} a varias temperaturas. $C_{lac_0} = 50$ g/L; $C_{gal_0} = 0$ g/L.

Se han realizado una serie de experimentos para analizar el efecto de los dos anómeros de la galactosa sobre la hidrólisis de lactosa con Lactozym. Flaschel y col. (1982) observaron que los dos anómeros de la galactosa inhibían de forma distinta la reacción de hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa de *A.niger*. En este caso, los modelos cinéticos que pretendan explicar los resultados experimentales tienen que considerar la reacción de mutarrotación de la galactosa como lateral e incluir términos de inhibición distintos para cada uno de los anómeros.

Un test propuesto por Flaschel y col. (1982), sencillo de llevar a cabo, consiste en hacer reacciones de hidrólisis de lactosa en medios que contengan galactosa a tiempo cero en una determinada concentración. En un experimento, la galactosa se añade al medio de reacción varias horas antes de añadir la enzima, con lo que en el medio hay α - y β -galactosa en equilibrio (una proporción aproximada de 33% de la especie α - y 66% de la especie β -). En otro, se aguarda a añadir la galactosa en polvo justo antes de añadir la enzima, de forma que la galactosa está como su enantiómero α , que es el que existe en el azúcar en polvo. Si la inhibición por α - y β -gal es distinta, la conversión evolucionará con

el tiempo de reacción de forma distinta en cada experimento. Los valores de velocidad inicial también serán considerablemente distintos.

Se llevaron a cabo cuatro experimentos a dos concentraciones iniciales de galactosa: 15 y 25 g/L, manteniendo constantes las demás variables: concentración de lactosa de 50 g/L, temperatura de 40°C, concentración de enzima de 14 mg/L. En un experimento con 15 g/L de galactosa y en otro con 25 g/L, se dejaron las soluciones de azúcares en BM durante 24 horas para que se alcance el equilibrio de mutarrotación. En los dos experimentos restantes, se añadió la galactosa un poco antes de añadir la enzima. En todos los casos se llevó a cabo la hidrólisis de lactosa según el protocolo descrito en el apartado 2.2.4.

En la Figura 3.13 se muestra como evoluciona la conversión con el producto t-C_E en estos experimentos. En la Figura 3.14 se muestra la velocidad inicial de reacción frente a la concentración inicial de galactosa. Si se observan ambas figuras, se llega a la conclusión de que no hay diferencia entre los experimentos en los que se añade la galactosa a tiempo cero de reacción y aquellos en los que la α -galactosa está en equilibrio con la β -galactosa. Por tanto, no se aplicarán modelos en los que se distinga entre anómeros de la galactosa, como son algunos de los modelos desarrollados en el apartado 3.1.2.

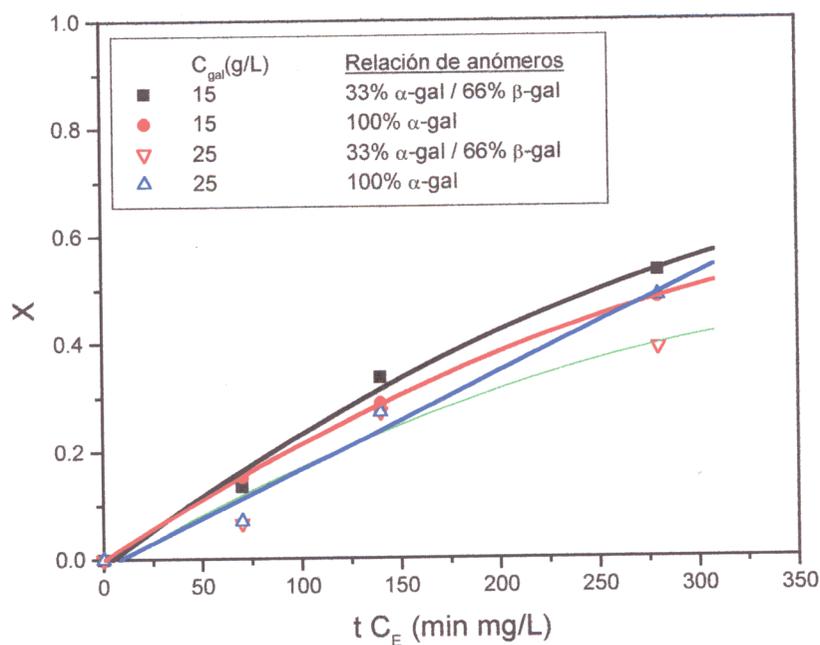


Figura 3.13.- Hidrólisis de lactosa con la β -galactosidasa de *K. fragilis*: influencia de la mutarrotación de galactosa. $T = 40^{\circ}\text{C}$, $C_{lac\ 0} = 50\text{g/L}$; $C_E = 14\text{ mg/L}$.

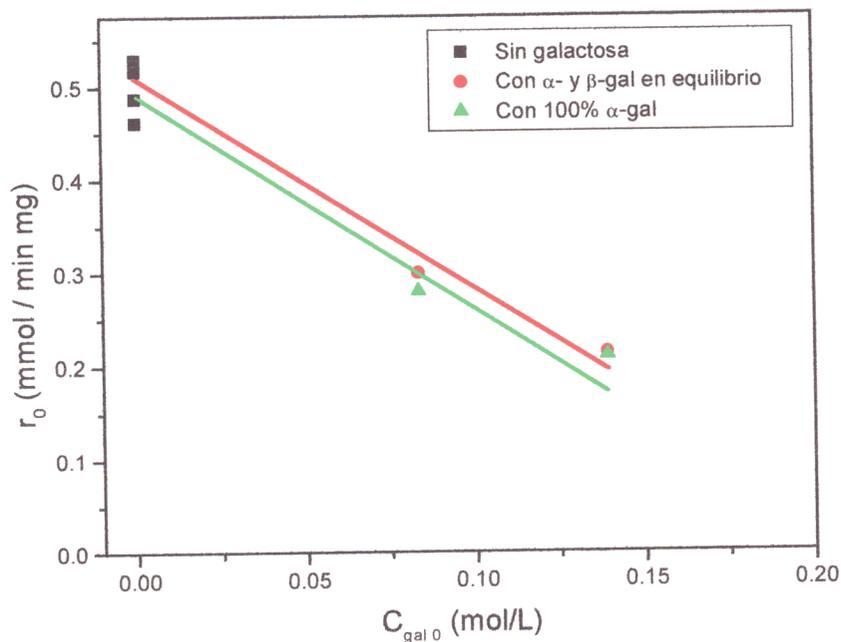


Figura 3.14.- Hidrólisis de lactosa con la β -galactosidasa de *K. fragilis*: r_0 versus $C_{gal\ 0}$.

3.2.2.3.- Discriminación del modelo cinético aplicando el método diferencial

Como se indicó en el apartado 3.1.2.3, en este método hay que calcular la velocidad de reacción, r , en cada punto de la curva C vs t obtenida en cada experimento realizado en reactor discontinuo.

Para calcular r hay que derivar la curva C vs t por algún procedimiento numérico. En este caso, se ha elegido ajustar la concentración de producto a una doble exponencial:

$$C_{lac_0} - C_{lac}(t) = a(\exp(-bt) - \exp(-ct)) \quad [3.77]$$

Calculando a , b y c por ajuste de los datos de cada experimento por regresión no lineal (Marquardt, 1962). La velocidad de reacción a cada tiempo se obtiene como:

$$r(t) = a(-b \exp(-bt) + c \exp(-ct)) \quad [3.78]$$

I. Linealización de los modelos cinéticos

Los modelos cinéticos basados en el mecanismo de Michaelis-Menten se pueden linealizar por diversos procedimientos. Para ajustar los datos diferenciales (r , C) obtenidos por derivación de los datos experimentales (C , t) se han utilizado modelos cinéticos tipo Michaelis-Menten que, o no consideran inhibición ninguna, o consideran la inhibición por sólo uno de los compuestos implicados en la reacción (modelos de la Tabla 3.2). Aunque se podría discriminar entre modelos más complejos, que incluyan más de una inhibición, porque la inhibición por glucosa no está clara en el análisis de las velocidades iniciales. Por tanto, se aplicarán los modelos más simples y, sólo si es necesario, se incluirán en la discriminación modelos más complejos. No se discriminará entre modelos que consideren una inhibición distinta por los anómeros α - y β - de la galactosa, puesto que se ha demostrado que el efecto de estos dos anómeros sobre la velocidad inicial de reacción es el mismo, y tampoco se considerarán modelos cinéticos que tengan en cuenta la reacción de transgalactosidación, ya que no se han observado trisacáridos en los experimentos realizados en un porcentaje mayor del 3% sobre el total de azúcares en cada muestra.

Para cada modelo se proponen las linealizaciones de Lineweaver-Burk, Hanes y Eadie. Las ecuaciones que corresponden a cada modelo y a cada linealización se muestran en las tablas de resultados (Tablas 3.14 a 3.17). Los datos obtenidos a cada temperatura sirven para calcular la variable dependiente y las variables independientes en cada linealización. Luego se aplican a las variables obtenidas regresiones lineales simples o múltiples, según haya una o más variables independientes. Se obtienen valores de los parámetros cinéticos a cada temperatura, así como parámetros estadísticos (t_s , F) que indican la bondad del ajuste y la confianza del modelo linealizado, respectivamente. Los resultados obtenidos, así como las linealizaciones aplicadas, se muestran en las Tablas 3.14 a 3.17.

Para discriminar el modelo cinético más adecuado se utilizan los criterios estadísticos y físicos ya citados en el punto 3.1.3.2. En cuanto a los criterios estadísticos, se puede observar que los valores de r^2 obtenidos para la correlación son inferiores a 0,7, llegando incluso a valores de 0,06. Por tanto, el ajuste y los parámetros obtenidos por linealización no tienen validez estadística. Los valores de F de Fischer son inferiores en muchos casos al valor tabulado para un grado de confianza igual o mayor al 95%. Aquellos parámetros que no cumplen los criterios estadísticos y los valores de F inferiores al valor tabulado están sombreados en las Tablas 3.14 a 3.17.

Los valores de los parámetros obtenidos, para cada modelo por las distintas linealizaciones, no coinciden entre sí. La variación del valor de los parámetros con la temperatura, cuando éstos no son negativos, no sigue la ecuación de Arrhenius.

Al aplicar la técnica de regresión lineal en cada caso se ha considerado que cada dato (x, y) tenía el mismo peso en la regresión que los demás, ya que, a priori, todos los datos están sujetos a la misma probabilidad de error. El uso de pesos puede mejorar los resultados, pero a costa de suponer que unos datos son más fiables que otros y dar, por ello, un mayor peso en la regresión a unos datos frente a otros. Lineweaver y Burk (1934) consideraron el uso de pesos diferentes según la concentración de sustrato para la que se obtenía la velocidad de reacción, ya que los datos experimentales obtenidos a concentraciones de sustrato altas suelen ser más fiables que los obtenidos a concentraciones bajas, así se obtienen parámetros más precisos. El peso aplicado a cada

dato es proporcional a r , lo que supone que el error experimental se comporta igual. Esta suposición es discutible, ya que dependerá, al menos, del método de análisis utilizado para seguir la reacción enzimática.

Aunque la aplicación de las linealizaciones a los modelos tipo Michaelis-Menten es muy común en la práctica (para β -galactosidasas, ver Wadiak y Carbonell, 1975; Shukla y Chaplin, 1993 / para enzimas en general: Price y Stevens, 1980; Cornish-Bowden, 1995), debido a los pobres resultados obtenidos al utilizar las linealizaciones y la regresión lineal consiguiente con los datos experimentales sin considerar pesos, se determina no aplicar más dichas linealizaciones para el estudio del resto de reacciones cuyo modelo cinético se pretende determinar.

II. Cálculo de parámetros por regresión no lineal

La regresión no lineal es una técnica que puede aplicarse a los datos obtenidos a una temperatura (ajuste a temperatura constante) o a todos los datos conseguidos a todas las temperaturas (ajuste con temperatura variable).

Cuando los datos que se ajustan son datos diferenciales, (r , C), se ha de calcular la velocidad de reacción para cada par de valores experimentales (concentración, tiempo), como ya se indicó anteriormente en este apartado.

Los modelos cinéticos que se proponen para ajustar los datos diferenciales son los modelos presentados en la Tabla 3.2. Estos modelos implican la inexistencia de inhibición o la existencia de inhibición por sustrato o por uno de los productos. Como se observó que la galactosa era el único compuesto que inhibía, no se necesitan modelos cinéticos más complejos para ajustar los datos experimentales.

1.- *Ajuste con la temperatura constante*

El ajuste de los datos de cada experimento, conseguidos a temperatura constante, a los distintos modelos propuestos lleva a los resultados de las tablas 3.18 y 3.19, donde se muestran los parámetros y el valor de la suma de residuos al cuadrado (SQR) obtenidos

para cada modelo cinético aplicado, además del intervalo de confianza de cada parámetro. Los parámetros que no pasan los criterios físicos o estadísticos están sombreados. En la Tabla 3.20, se resume el cumplimiento de los parámetros de cada modelo los criterios estadísticos y físicos ya descritos en el apartado 3.1.3.2.

Rigurosamente, pasan los criterios estadísticos los modelos 1, 2, 5 y 9, y los criterios físicos, los modelos 1 y 2. El modelo 8, aunque tiene dos parámetros (K_M y K_I) que incluyen el cero en su intervalo de confianza a dos temperaturas, es el modelo que tiene una suma de residuos al cuadrado (SQR) menor, siendo casi la mitad del SQR del siguiente modelo que mejor ajusta, el modelo 10.

Se observa que, para varios de los modelos cinéticos probados, los parámetros K_M y K_I tienden a acoplarse entre sí, es decir, la variación de cada uno influye en la variación del otro durante la iteración. El resultado de este fenómeno es un mejor ajuste del modelo a los datos de cada temperatura, pero la relación de los valores de los distintos parámetros a varias temperaturas no sigue una tendencia razonable. Además, como en el modelo 8, los parámetros pueden incluir el cero en el intervalo de confianza. El modo de evitar este fenómeno es obligar a los parámetros cinéticos a seguir una tendencia lógica con la temperatura, mediante la ecuación de Arrhenius, ajustando todos los datos experimentales a todas las temperaturas a los modelos cinéticos propuestos, es decir, se lleva a cabo un ajuste con la temperatura como variable.

2.- Ajuste con la temperatura como variable

En el ajuste de los datos diferenciales a temperatura como variable se sustituye cada parámetro cinético de los modelos de la Tabla 3.2 por su expresión según la ecuación de Arrhenius y se ajustan los datos diferenciales a las ecuaciones que se obtienen. Los valores de los parámetros, sus intervalos de confianza, el SQR y el valor de F de cada modelo se recogen en las Tablas 3.21 a 3.23. En la Tabla 3.24 se resume el comportamiento de los parámetros de cada modelo con los criterios estadísticos y físicos. Los parámetros que no pasan los criterios físicos o estadísticos están sombreados en las Tablas 3.21 a 3.23.

Analizando la Tabla 3.24, los modelos que pasan los criterios estadísticos son los modelos 1, 2, 3, 4 y 8. Los criterios físicos (E_a de la constante cinética > 0 ; valores razonables para todas las energías de activación) los cumplen todos los modelos propuestos. De nuevo, el modelo que mejor ajusta los datos experimentales es el 8, siendo su SQR casi la mitad del siguiente modelo en bondad de ajuste. En consecuencia, se puede elegir el modelo 8 para ajustar los datos experimentales, lo que supone que la galactosa inhibe la hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa de *K. fragilis* de forma competitiva.

Se puede concluir que el ajuste con la temperatura como constante lleva a resultados que no tienen la suficiente consistencia estadística como para discriminar el modelo cinético, por lo que se hace necesario el ajuste con la temperatura como variable para poder llevar a cabo la discriminación.

Tabla 3.14.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresiones lineales, T como constante)

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	R	F
Michaelis-Menten simple (2)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2}$	40	0,25	47,63	0,20	6,86
			25	0,05	13,23	0,12	2,44
			5	0,18	258,5	0,10	1,39
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac}$	40	1,05	557,1	0,07	0,95
			25	0,53	560,7	0,06	0,52
			5	0,06	62,96	0,08	1,02
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}}$	40	0,79	188,6	0,30	16,83
			25	0,39	75,07	0,18	4,83
			5	0,08	249,1	0,39	26,03

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	K _I	R	F
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2 K_I} C_{lac} + \frac{1}{k_2}$	40	0,07	2,59	-0,06	0,26	2,60
			25	0,02	11,42	-0,06	0,27	5,88
			5	-0,03	54,93	-0,09	0,10	0,80
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac} + \frac{1}{k_2 K_I} C_{lac}^2$	40	2,58	1238	-	0,08	0,54
			25	-0,45	478,4	-1265	0,06	0,26
			5	0,02	4,46	297,4	0,10	0,67
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}} - \frac{1}{K_I} \frac{r C_{lac}}{C_E}$	40	-0,08	196,2	-	0,71	84,21
			25	0,05	92,19	-41,61	0,75	98,71
			5	-0,05	235,1	-49,08	0,73	80,57

Nota: k₂ [mmoles/(mg enzima·L)]; K_M, K_I, K'_I [mM]

Tabla 3.15.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresiones lineales, T como constante)

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	K _I	R	F
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{K_M}{k_2 K_I} \frac{C_{gal}}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2}$	40	0,25	-48,60	-43,44	0,34	10,90
			25	0,06	-100,0	-98,05	0,40	13,76
			5	0,37	-98,24	-13,25	0,12	1,08
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac} + \frac{K_M}{k_2 K_I} C_{gal}$	40	0,88	32,62	8,82	0,34	10,68
			25	0,32	-60,69	-18,72	0,33	8,78
			5	0,04	-65,06	-89,89	0,13	1,20
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}} + \frac{K_M}{K_I} \frac{r C_{gal}}{C_E C_{lac}}$	40	1,14	-262,5	77,86	0,49	25,77
			25	0,49	-182,6	67,82	0,49	23,24
			5	0,14	-314,1	89,35	0,66	54,19

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	K _I	R	F
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{K_M}{k_2 K_I} \frac{C_{glu}}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2}$	40	0,24	-42,99	-43,35	0,35	11,02
			25	0,05	-82,20	-101,4	0,34	9,54
			5	0,09	432,1	-125,2	0,18	2,43
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac} + \frac{K_M}{k_2 K_I} C_{glu}$	40	0,52	97,86	27,42	0,23	4,08
			25	0,52	97,86	27,42	0,23	4,08
			5	0,19	640,1	-204,3	0,12	0,98
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}} + \frac{K_M}{K_I} \frac{r C_{glu}}{C_E C_{lac}}$	40	1,05	-263,6	90,45	0,46	21,87
			25	0,46	-174,0	77,60	0,44	18,06
			5	0,12	-329,0	102,6	0,65	52,17

Nota: k₂ [mmoles/(mg enzima·L)]; K_M, K_I, K_I' [mM]

Tabla 3.16.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresiones lineales, T como constante)

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	K _I	R	F
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por galactosa (9)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2 K_I} C_{gal} + \frac{1}{k_2}$	40	-0,71	-91,33	-15,77	0,35	-91,33
			25	-0,36	137,5	-8,51	0,32	8,27
			5	-0,07	-97,54	-50,39	0,11	0,84
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac} + \frac{1}{k_2 K_I} C_{lac} C_{gal}$	40	-0,70	-286,2	-45,87	0,23	4,66
			25	-0,31	-257,8	-52,04	0,17	2,30
			5	0,07	15,83	85,04	0,11	0,91
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}} - \frac{1}{K_I} \frac{r C_{gal}}{C_E}$	40	0,74	-192,0	-308,0	0,31	8,434
			25	0,35	-77,82	-230,2	0,18	-77,82
			5	0,09	-241,7	144,2	0,40	13,56

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	K _I	R	F
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por glucosa (5)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2 K_I} C_{glu} + \frac{1}{k_2}$	40	-1,00	-116,8	-11,04	0,35	11,28
			25	0,36	-133,8	10,73	0,27	5,96
			5	-79,77	0,14	1,44	0,14	1,44
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac} + \frac{1}{k_2 K_I} C_{lac} C_{glu}$	40	-0,84	-352,3	-43,18	0,20	3,28
			25	-0,41	-377,5	-66,69	0,11	-377,5
			5	0,07	55,93	637,4	0,08	0,52
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}} - \frac{1}{K_I} \frac{r C_{glu}}{C_E}$	40	0,69	-192,4	-146,2	0,31	8,77
			25	0,33	-75,69	-135,1	0,20	3,23
			5	0,09	-246,8	129,0	0,41	13,93

Nota: k₂ [mmoles/(mg enzima·L)]; K_M, K_I, K_I' [mM]

Tabla 3.17.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresiones lineales, T como constante)

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	K _I	K' _I	R	F
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{K_M}{k_2 K_I} \frac{C_{gal}}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2 K'_I} C_{gal} + \frac{1}{k_2}$	40	1,44	-32,27	-11,00	12,72	0,36	7,73
			25	0,04	-84,79	-94,52	-269,1	0,40	9,25
			5	0,05	-48,99	-34,32	-75,13	0,13	0,75
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac} + \frac{K_M}{k_2 K_I} C_{gal} + \frac{1}{k_2 K'_I} C_{lac} C_{gal}$	40	0,36	-42,80	-18,20	-89,10	0,36	8,04
			25	0,03	-68,20	-88,11	-697,6	0,13	0,799
			5	0,22	-285,1	62,83	-21,99	0,64	33,60
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}} + \frac{K_M}{K_I} \frac{r C_{gal}}{C_E C_{lac}} + \frac{1}{K'_I} \frac{r C_{gal}}{C_E}$	40	0,56	-365,7	65,01	-19,74	0,59	29,11
			25	0,22	-285,1	62,83	-21,99	0,64	33,60
			5	0,08	-387,3	72,56	-26,73	0,73	56,01

Modelo	Linealización	Ecuación linealizada	T (°C)	k ₂	K _M	K _I	K' _I	R	F
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	Lineweaver-Burk	$\frac{C_E}{r} = \frac{K_M}{k_2} \frac{1}{C_{lac}} + \frac{K_M}{k_2 K_I} \frac{C_{glu}}{C_{lac}} + \frac{1}{k_2 K'_I} C_{glu} + \frac{1}{k_2}$	40	0,84	-30,08	-17,37	22,56	0,36	7,83
			25	0,04	-71,79	-95,69	-244,1	0,34	6,48
			5	-0,05	-313,8	-108,5	-41,01	0,19	1,72
	Hanes	$\frac{C_E C_{lac}}{r} = \frac{K_M}{k_2} + \frac{1}{k_2} C_{lac} + \frac{K_M}{k_2 K_I} C_{glu} + \frac{1}{k_2 K'_I} C_{lac} C_{glu}$	40	0,37	-26,97	-11,80	-83,44	0,33	6,56
			25	0,12	-41,70	-22,73	-67,69	0,28	4,28
			5	-0,04	-250,9	-114,7	-50,29	0,18	1,54
	Eadie	$\frac{r}{C_E} = k_2 - K_M \frac{r}{C_E C_{lac}} + \frac{K_M}{K_I} \frac{r C_{glu}}{C_E C_{lac}} + \frac{1}{K'_I} \frac{r C_{glu}}{C_E}$	40	0,54	-362,4	64,61	-19,08	0,60	29,48
			25	0,25	-270,3	62,26	-23,05	0,64	34,38
			5	-0,09	-382,9	77,05	-29,95	0,72	52,76

Nota: k₂ [mmoles/(mg enzima·L)]; K_M, K_I, K'_I [mM]

Tabla 3.18.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresión no lineal, *T* como constante)

Modelo	T(°C)	k_2	K_M	K_I	K'_I	F	SQR	Σ SQR
Orden 1 (1)	40	$2,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-4}$	-	-	-	1358	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$
	25	$1,4 \cdot 10^{-3} \pm 7,2 \cdot 10^{-5}$	-	-	-	1418	$2,8 \cdot 10^{-7}$	
	5	$3,5 \cdot 10^{-4} \pm 1,9 \cdot 10^{-5}$	-	-	-	1238	$2,4 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten simple (2)	40	$1,4 \cdot 10^{-3} \pm 7,6 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-1} \pm 2,6 \cdot 10^{-1}$	-	-	731	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$
	25	$6,9 \cdot 10^{-4} \pm 3,6 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-1} \pm 2,6 \cdot 10^{-1}$	-	-	781	$2,5 \cdot 10^{-7}$	
	5	$1,7 \cdot 10^{-4} \pm 1,1 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-1} \pm 2,8 \cdot 10^{-1}$	-	-	661	$2,2 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	40	$3,3 \cdot 10^{-3} \pm 2,4 \cdot 10^{-2}$	$9,2 \cdot 10^{-1} \pm 7,5$	$1,9 \cdot 10^{-1} \pm 1,6$	-	474	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$
	25	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	$8,8 \cdot 10^{-1} \pm 6,2$	$1,9 \cdot 10^{-1} \pm 1,4$	-	512	$2,5 \cdot 10^{-7}$	
	5	$2,8 \cdot 10^{-4} \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$	$6,3 \cdot 10^{-1} \pm 4,1$	$3,5 \cdot 10^{-1} \pm 2,8$	-	430	$2,2 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	40	$5,1 \cdot 10^{-4} \pm 6,0 \cdot 10^{-5}$	$8,3 \cdot 10^{-3} \pm 1,5 \cdot 10^{-2}$	$7,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,4 \cdot 10^{-3}$	-	1034	$8,2 \cdot 10^{-7}$	$8,4 \cdot 10^{-7}$
	25	$2,9 \cdot 10^{-4} \pm 4,7 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-2} \pm 2,6 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-2} \pm 3,2 \cdot 10^{-2}$	-	780	$1,7 \cdot 10^{-7}$	
	5	$3,0 \cdot 10^{-5} \pm 4,6 \cdot 10^{-6}$	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-1} \pm 5,2 \cdot 10^{-1}$	-	98	$1,7 \cdot 10^{-7}$	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	40	$7,7 \cdot 10^{-4} \pm 1,5 \cdot 10^{-5}$	$8,1 \cdot 10^{-2} \pm 4,0 \cdot 10^{-2}$	$7,3 \cdot 10^{-2} \pm 2,3 \cdot 10^{-2}$	-	645	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
	25	$5,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,6 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-1} \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 6,7 \cdot 10^{-2}$	-	559	$2,3 \cdot 10^{-7}$	
	5	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 8,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1} \pm 4,6 \cdot 10^{-2}$	-	515	$1,9 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	40	$7,2 \cdot 10^{-4} \pm 1,1 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-2} \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-2} \pm 3,4 \cdot 10^{-2}$	-	780	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$
	25	$4,0 \cdot 10^{-4} \pm 8,6 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 5,7 \cdot 10^{-2}$	$2,2 \cdot 10^{-1} \pm 8,6 \cdot 10^{-2}$	-	662	$2,0 \cdot 10^{-7}$	
	5	$9,0 \cdot 10^{-5} \pm 1,8 \cdot 10^{-5}$	$7,3 \cdot 10^{-2} \pm 4,2 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-1} \pm 6,6 \cdot 10^{-2}$	-	574	$1,7 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	40	$4,8 \cdot 10^{-4} \pm 9,2 \cdot 10^{-5}$	$5,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,4 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,5 \cdot 10^{-2}$	$7,4 \cdot 10^{-14} \pm 6,6 \cdot 10^{-14}$	497	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$
	25	$2,1 \cdot 10^{-4} \pm 4,9 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-3} \pm 3,0 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-3} \pm 3,4 \cdot 10^{-2}$	$5,9 \cdot 10^{-14} \pm 4,5 \cdot 10^{-14}$	234	$2,9 \cdot 10^{-7}$	
	5	$5,2 \cdot 10^{-4} \pm 9,2 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	$8,7 \cdot 10^{-3} \pm 3,2 \cdot 10^{-2}$	$5,6 \cdot 10^{-14} \pm 8,8 \cdot 10^{-14}$	246	$2,2 \cdot 10^{-8}$	

Tabla 3.19.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresión no lineal, T como constante)

Modelo	T(°C)	k_2	K_M	K_I	K'_I	F	SQR	Σ SQR
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	40	$5,6 \cdot 10^{-4} \pm 4,7 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$	$9,2 \cdot 10^{-3} \pm 8,2 \cdot 10^{-3}$	-	2188	$3,4 \cdot 10^{-7}$	$4,1 \cdot 10^{-7}$
	25	$3,0 \cdot 10^{-4} \pm 3,2 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-2} \pm 1,6 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-2} \pm 1,3 \cdot 10^{-2}$	-	1944	$7,2 \cdot 10^{-8}$	
	5	$6,4 \cdot 10^{-5} \pm 8,3 \cdot 10^{-6}$	$7,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	$7,0 \cdot 10^{-3} \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$	-	951	$1,1 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	40	$8,3 \cdot 10^{-4} \pm 1,4 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-2} \pm 3,1 \cdot 10^{-2}$	$5,7 \cdot 10^{-2} \pm 1,3 \cdot 10^{-2}$	-	1068	$8,0 \cdot 10^{-7}$	$8,1 \cdot 10^{-7}$
	25	$4,8 \cdot 10^{-4} \pm 8,6 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-1} \pm 6,2 \cdot 10^{-2}$	$5,8 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	-	1085	$1,3 \cdot 10^{-7}$	
	5	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 2,4 \cdot 10^{-5}$	$8,9 \cdot 10^{-2} \pm 5,1 \cdot 10^{-2}$	$7,2 \cdot 10^{-2} \pm 2,2 \cdot 10^{-2}$	-	679	$1,5 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	40	$7,7 \cdot 10^{-4} \pm 8,3 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1} \pm 1,7 \cdot 10^{-2}$	-	1454	$5,9 \cdot 10^{-7}$	$6,8 \cdot 10^{-7}$
	25	$4,0 \cdot 10^{-4} \pm 4,8 \cdot 10^{-5}$	$8,9 \cdot 10^{-2} \pm 2,5 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 2,2 \cdot 10^{-2}$	-	1533	$9,0 \cdot 10^{-8}$	
	5	$9,1 \cdot 10^{-5} \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$	$5,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2} \pm 3,1 \cdot 10^{-2}$	-	790	$1,3 \cdot 10^{-8}$	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	40	$5,1 \cdot 10^{-4} \pm 5,4 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-3} \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$	$4,2 \cdot 10^{13} \pm 7,3 \cdot 10^{14}$	1369	$4,4 \cdot 10^{-7}$	$5,2 \cdot 10^{-7}$
	25	$2,8 \cdot 10^{-4} \pm 3,8 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 1,8 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{14} \pm 2,2 \cdot 10^{14}$	1136	$8,3 \cdot 10^{-8}$	
	5	$5,9 \cdot 10^{-5} \pm 7,2 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-2} \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-2} \pm 4,6 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{14} \pm 3,4 \cdot 10^{14}$	522	$1,2 \cdot 10^{-8}$	

Tabla 3.20.- Discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*. Método diferencial: regresión no lineal de datos a temperatura constante

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	k_2	+	S	Pasa, SQR: $2,1 \cdot 10^{-6}$ (11°)
Michaelis-Menten simple (2)	k_2	+	S	Pasa.
	\bar{K}_M	+	NV	SQR: $2,0 \cdot 10^{-6}$ (10°)
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	k_2	+	S	No pasa.
	\bar{K}_M	0 (3T)	S (valores muy altos)	SQR: $2,0 \cdot 10^{-6}$ (9°)
	\bar{K}_I	0 (3T)	B	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	k_2	+	S	No pasa.
	\bar{K}_M	0 (1T)	F	SQR: $8,4 \cdot 10^{-7}$ (5°)
	K_I	0 (1T)	- 1	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	k_2	+	S	No pasa.
	\bar{K}_M	+	F	SQR: $1,6 \cdot 10^{-6}$ (8°)
	K_I	+	F	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	k_2	+	S	No pasa.
	\bar{K}_M	0 (2T)	F	SQR: $1,3 \cdot 10^{-6}$ (7°)
	K_I	0 (1T)	B	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	k_2	+	S	No pasa. $K_I \gg K'_I$.
	\bar{K}_M	0 (3T)	- 1	SQR: $1,3 \cdot 10^{-6}$ (6°)
	\bar{K}_I	0 (3T)	- 1	
	K'_I	0 (1T)	NV (valores muy altos)	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	k_2	+	S	No pasa.
	\bar{K}_M	0 (2T)	F	SQR: $4,1 \cdot 10^{-7}$ (1°)
	K_I	0 (1T)	F	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	k_2	+	S	No pasa.
	\bar{K}_M	+	F	SQR: $8,1 \cdot 10^{-7}$ (4°)
	\bar{K}_I	+	NV	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	k_2	+	S	No pasa.
	\bar{K}_M	+	F	SQR: $6,8 \cdot 10^{-7}$ (3°)
	K_I	0 (1T)	S	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	k_2	+	S	No pasa. $K_I \gg K'_I$.
	\bar{K}_M	0 (1T)	- 1	SQR: $5,2 \cdot 10^{-7}$ (2°)
	K_I	0 (1T)	- 1	
	K'_I	0 (3T)	B (valores muy altos)	

Clave: Criterios físicos: **F** fluctua ; **S** sube; **B** baja; **NV** no varía (según aumenta la temperatura)
 - *Parámetro negativo*, le sigue el número de veces que lo es con ese modelo

Criterios estadísticos: **0** incluye el cero en el intervalo de confianza, le sigue el número de temperaturas en las que se da la circunstancia con ese modelo
 + pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.21.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresión no lineal, *T* como variable)

MODELO	Orden 1 (1)	Michaelis-Menten simple (2)	Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)
Ln k_0	10,29 ± 1,20	43,65 ± 3,21	47,62 ± 5,76
E_a/R	5057 ± 376	14670 ± 647	15429 ± 904
Ln K_{M0}	-	34,92 ± 0,13	36,30 ± 3,36
E_{am}/R	-	10025 ± 985	9875 ± 1124
Ln K_{I0}	-	-	-51,81 ± 29,72
E_{al}/R	-	-	-14294 ± 8884
SQR	2,16 10 ⁻⁶	2,15 10 ⁻⁶	2,06 10 ⁻⁶
F	2414	1617	1017

Tabla 3.22.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresión no lineal, *T* como variable)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)
Ln k_0	9,87 ± 1,50	17,51 ± 2,68	16,23 ± 2,28	6,71 ± 1,16
E_a/R	5461 ± 402	7710 ± 808	7319 ± 692	4501 ± 354
Ln K_{M0}	27,70 ± 0,84	30,07 ± 0,32	29,83 ± 0,26	-1,82 ± 0,83
E_{am}/R	10059 ± 542	9564 ± 578	9485 ± 965	1000 ± 568
Ln K_{I0}	23,93 ± 4,68	-7,96 ± 7,42	1,25 ± 6,14	4,51 ± 5,22
E_{al}/R	8892 ± 1448	-1654 ± 2272	1016 ± 1898	2923 ± 1682
Ln K'_{I0}	-	-	-	3756 ± 6226
E'_{al}/R	-	-	-	1,03 · 10 ⁶ ± 1,76 · 10 ⁶
SQR	1,16 · 10 ⁻⁶	1,88 · 10 ⁻⁶	1,61 · 10 ⁻⁶	1,22 · 10 ⁻⁶
F	1904	1119	1362	1194

Tabla 3.23.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método diferencial, regresión no lineal, *T* como variable)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)
Ln k₀	9,76 ± 1,92	16,43 ± 2,04	15,04 ± 0,16	6,16 ± 0,92
E_a/R	5398 ± 330	7342 ± 612	6934 ± 424	4314 ± 270
Ln K_{M0}	27,97 ± 0,87	29,97 ± 0,24	29,72 ± 0,18	-1,69 ± 0,55
E_{am}/R	10100 ± 657	10019 ± 423	9547 ± 238	1000 ± 568
Ln K_{I0}	25,14 ± 2,90	-7,17 ± 4,80	1,71 ± 3,82	2,54 ± 3,72
E_{al}/R	9127 ± 896	-1331 ± 1480	1248 ± 1180	2432 ± 1160
Ln K'_{I0}	-	-	-	25,61 ± 12,23
E'_{al}/R	-	-	-	6989 ± 3444
SQR	5,41 10 ⁻⁷	1,18 10 ⁻⁶	9,21 10 ⁻⁷	8,64 10 ⁻⁶
F	4167	1844	2407	1471

Tabla 3.24.- Discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*. Método diferencial: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa SQR=2,16 10^{-6} (10°)
	E_a/R	+	> 0	
Michaelis-Menten simple (2)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=2,15 10^{-6} (9°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=2,06 10^{-6} (8°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=1,16 10^{-6} (3°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,88 10^{-6} (7°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,61 10^{-6} (6°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,22 10^{-6} (5°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
	E_{aI}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K'_i$	0		
E'_{aI}/R	0	> 0 (valor muy alto)		

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.24.(cont.).- Discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*. Método diferencial: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=5,47 10^{-7} (1°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
	E_{aI}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,18 10^{-6} (4°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
	E_{aI}/R	0	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=9,21 10^{-7} (2°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
	E_{aI}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=8,64 10^{-6} (11°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
	E_{aI}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K'_i$	+		
	E'_{aI}/R	+	> 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
> 0 Parámetro positivo
Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
+ pasa
Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

3.2.2.4.- Discriminación del modelo cinético aplicando el método integral

El método integral es otro método para obtener los parámetros cinéticos y discriminar entre varios modelos propuestos. Para aplicar este método es necesario integrar las ecuaciones diferenciales que ligan la velocidad de reacción con las concentraciones. Esta integración da lugar a funciones donde la conversión o la concentración de sustrato o producto son funciones del tiempo, son las ecuaciones cinéticas integradas. Los datos concentración o conversión vs. tiempo se ajustan

a estas ecuaciones por regresión no lineal, ya que la concentración y la conversión quedan como una función no lineal del tiempo.

Los modelos cinéticos que se utilizan para ajustar los datos integrales (C , t) son los modelos utilizados en la discriminación por el método diferencial, propuestos en la Tabla 3.2. Como las ecuaciones diferenciales de estos modelos son complejas y su integración analítica no es sencilla ni, en ocasiones, posible, se recurre a su integración numérica, acoplado al algoritmo de regresión no lineal una integración numérica por Runge-Kutta de cuarto orden.

El método integral se ha aplicado tanto a datos obtenidos con la temperatura como constante como a todos los datos a la vez (datos con la temperatura como variable).

1.- *Ajuste con la temperatura como constante*

El ajuste a temperatura constante de los datos integrales con los distintos modelos cinéticos propuestos lleva a los resultados de las Tablas 3.25 y 3.26, donde se muestran los parámetros cinéticos, sus intervalos de confianza, la suma de residuos al cuadrado (SQR) y el valor de F para cada modelo ensayado. En la Tabla 3.27 se resume el cumplimiento de los parámetros con los criterios estadísticos y físicos del apartado 3.1.3.2. Los parámetros que no cumplen con algún criterio se muestran en las Tablas 3.25 y 3.26.

El análisis de la Tabla 3.27 muestra que sólo pasan los criterios estadísticos los modelos 1, 2, 6 y 10. A estos modelos se les aplican los criterios físicos y entonces sólo pasan el modelo 1 y el 2, ya que los demás tienen parámetros que fluctúan con la temperatura. Como en la discriminación por el método diferencial con regresión no lineal con la temperatura como constante, el modelo 8, aunque tiene dos parámetros (K_M y K_I) que incluyen el cero en su intervalo de confianza a dos temperaturas, es el que mejor ajusta los datos experimentales. La suma de residuos al cuadrado de este modelo es 1,07, cuando la del segundo modelo por orden de mejor a peor ajuste es de 1,41.

Como ya se ha comentado, y como también sucedía en el método diferencial, cuando hay más de un parámetro en el denominador de la ecuación cinética, como es el caso de los modelos con inhibición por sustrato o por cualquiera de los productos, cuando se lleva a cabo el ajuste de los datos experimentales con la temperatura como constante, los parámetros del denominador (K_M y K_I) se acoplan. Este hecho provoca que los parámetros no varíen con la temperatura de forma lógica, por lo que se hace necesario el ajuste de los datos experimentales con la temperatura como variable.

2.- Ajuste con la temperatura como variable

En este caso, los parámetros cinéticos se sustituyen por sus expresiones según la ecuación de Arrhenius, y se ajustan los datos experimentales obtenidos a todas las temperaturas a las ecuaciones obtenidas.

Las Tablas 3.28 a 3.30 agrupan los resultados del ajuste con la temperatura como variable: valor de los neperianos de los términos preexponenciales y de las energías de activación junto con sus intervalos de confianza y el SQR y el valor de F para cada modelo cinético ensayado. La Tabla 3.31 resume el cumplimiento de los criterios estadísticos y físicos por parte de cada modelo. En estas tablas de resultados, los parámetros que no pasan algún criterio están sombreados.

Cuando se ajustan todos los datos a la vez, los modelos que pasan los criterios estadísticos son los modelos 1, 2, 8 y 9. Los criterios físicos los superan todos los modelos, excepto el modelo 7, que tiene un valor excesivamente alto de la energía de activación de K_I . El modelo 8, al igual que en la discriminación por el método diferencial, es el que mejor ajusta los datos experimentales, es decir, el que tiene un valor de SQR más bajo (1,31 frente a 1,83 del siguiente modelo en el orden de mejor a peor ajuste). Parece el modelo más adecuado para la hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa de *K. fragilis*.

Como en el método diferencial, el ajuste de los datos experimentales con la temperatura como constante no tiene suficiente consistencia estadística para llevar a cabo la discriminación del modelo cinético, por lo que hay que recurrir al ajuste con la temperatura como variable.

Tabla 3.25.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como constante)

Modelo	T (°C)	k_2	K_M	K_I	K'_I	F	SQR	Σ SQR
Orden 1 (1)	40	$2,9 \cdot 10^{-3} \pm 2,1 \cdot 10^{-4}$	-	-	-	2989	1,77	4,84
	25	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 1,0 \cdot 10^{-4}$	-	-	-	3386	1,67	
	5	$3,7 \cdot 10^{-4} \pm 2,0 \cdot 10^{-5}$	-	-	-	2949	1,40	
Michaelis-Menten simple (2)	40	$4,9 \cdot 10^{-4} \pm 1,5 \cdot 10^{-5}$	$7,7 \cdot 10^{-2} \pm 4,7 \cdot 10^{-2}$	-	-	824	1,44	3,80
	25	$2,4 \cdot 10^{-4} \pm 7,0 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^{-2} \pm 3,2 \cdot 10^{-2}$	-	-	407	1,31	
	5	$5,6 \cdot 10^{-5} \pm 1,4 \cdot 10^{-5}$	$6,1 \cdot 10^{-2} \pm 3,5 \cdot 10^{-2}$	-	-	2057	1,05	
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	40	$6,9 \cdot 10^{-3} \pm 2,7 \cdot 10^{-9}$	$9,0 \cdot 10^{-1} \pm 12,4$	$2,1 \cdot 10^{-2} \pm 3,1 \cdot 10^{-1}$	-	1271	1,42	3,76
	25	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 6,7 \cdot 10^{-3}$	$4,4 \cdot 10^{-1} \pm 3,2$	$4,0 \cdot 10^{-2} \pm 2,4 \cdot 10^{-1}$	-	1500	1,28	
	5	$2,9 \cdot 10^{-4} \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-1} \pm 2,3$	$3,3 \cdot 10^{-2} \pm 2,0 \cdot 10^{-1}$	-	1347	1,06	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	40	$4,4 \cdot 10^{-4} \pm 8,6 \cdot 10^{-5}$	$7,4 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-2}$	$6,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	-	2531	0,68	2,13
	25	$2,4 \cdot 10^{-4} \pm 5,6 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,4 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-2} \pm 2,3 \cdot 10^{-2}$	-	2372	0,68	
	5	$5,4 \cdot 10^{-5} \pm 9,0 \cdot 10^{-6}$	$6,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-2}$	$8,0 \cdot 10^{-3} \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$	-	2311	0,77	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	40	$8,1 \cdot 10^{-4} \pm 4,1 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-1} \pm 7,6 \cdot 10^{-2}$	$5,6 \cdot 10^{-2} \pm 3,7 \cdot 10^{-2}$	-	1638	1,07	4,00
	25	$3,4 \cdot 10^{-4} \pm 1,8 \cdot 10^{-4}$	$6,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$	$6,9 \cdot 10^{-2} \pm 4,5 \cdot 10^{-2}$	-	1247	1,40	
	5	$6,2 \cdot 10^{-5} \pm 2,5 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-4}$	$9,2 \cdot 10^{-2} \pm 6,8 \cdot 10^{-3}$	-	1109	1,53	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	40	$7,8 \cdot 10^{-4} \pm 2,4 \cdot 10^{-4}$	$8,2 \cdot 10^{-2} \pm 4,2 \cdot 10^{-2}$	$8,7 \cdot 10^{-2} \pm 3,1 \cdot 10^{-2}$	-	1988	0,86	2,70
	25	$3,9 \cdot 10^{-4} \pm 1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-1} \pm 5,2 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1} \pm 5,6 \cdot 10^{-2}$	-	1986	0,92	
	5	$8,6 \cdot 10^{-5} \pm 2,4 \cdot 10^{-5}$	$7,1 \cdot 10^{-2} \pm 2,6 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-1} \pm 5,2 \cdot 10^{-2}$	-	1863	0,92	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	40	$3,7 \cdot 10^{-4} \pm 3,4 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 8,2 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 2,2 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^3 \pm 2,5 \cdot 10^3$	590	1,27	4,01
	25	$1,7 \cdot 10^{-4} \pm 9,0 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-3} \pm 6,2 \cdot 10^{-2}$	$1,9 \cdot 10^{-3} \pm 5,8 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^3 \pm 2,6 \cdot 10^3$	640	1,63	
	5	$4,4 \cdot 10^{-5} \pm 1,4 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-3} \pm 3,5 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 5,9 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^2 \pm 4,3 \cdot 10^2$	916	1,11	

Tabla 3.26.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, T como constante)

Modelo	T (°C)	k_2	K_M	K_I	K'_I	F	SQR	Σ SQR
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	40	$4,9 \cdot 10^{-4} \pm 7,0 \cdot 10^{-5}$	$5,6 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$	$4,2 \cdot 10^{-3} \pm 8,4 \cdot 10^{-3}$	-	5425	0,31	1,07
	25	$2,8 \cdot 10^{-4} \pm 5,5 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-2} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	-	5379	0,33	
	5	$5,6 \cdot 10^{-5} \pm 8,0 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	-	3290	0,41	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	40	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 8,7 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-1} \pm 1,1 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-2} \pm 1,7 \cdot 10^{-2}$	-	2815	0,61	1,91
	25	$9,6 \cdot 10^{-4} \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-4} \pm 3,3 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	-	2940	0,63	
	5	$1,0 \cdot 10^{-4} \pm 3,3 \cdot 10^{-5}$	$9,7 \cdot 10^{-2} \pm 6,5 \cdot 10^{-3}$	$5,3 \cdot 10^{-2} \pm 3,1 \cdot 10^{-2}$	-	2061	0,67	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	40	$8,9 \cdot 10^{-4} \pm 2,1 \cdot 10^{-4}$	$7,9 \cdot 10^{-2} \pm 3,0 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	-	3901	0,43	1,41
	25	$5,3 \cdot 10^{-4} \pm 9,0 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 4,6 \cdot 10^{-2}$	$7,0 \cdot 10^{-2} \pm 1,7 \cdot 10^{-2}$	-	4219	0,43	
	5	$9,4 \cdot 10^{-5} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$	$6,8 \cdot 10^{-2} \pm 3,2 \cdot 10^{-2}$	$9,3 \cdot 10^{-2} \pm 2,5 \cdot 10^{-2}$	-	2495	0,55	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	40	$4,6 \cdot 10^{-4} \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-3} \pm 2,9 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{13} \pm 5,7 \cdot 10^{13}$	2313	0,45	1,90
	25	$2,2 \cdot 10^{-4} \pm 9,0 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-3} \pm 3,9 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-2}$	$7,1 \cdot 10^{13} \pm 1,6 \cdot 10^{14}$	1351	0,80	
	5	$5,3 \cdot 10^{-5} \pm 1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-3} \pm 4,0 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-3} \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$	$6,4 \cdot 10^{13} \pm 1,0 \cdot 10^{14}$	1315	0,65	

Tabla 3.27.- Tabla de discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura constante

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS FISICOS	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	k_2	S	+	Pasa, SQR: 4,84 (11°)
Michaelis-Menten simple (2)	k_2	S	+	Pasa. SQR: 3,80 (8°)
	K_M	NV	+	
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	k_2	S	+	No pasa. SQR: 3,76 (7°)
	K_M	S (valores muy altos)	0 (3T)	
	K_I	B	0 (3T)	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	k_2	S	+	No pasa. SQR: 2,13 (5°)
	K_M	F	0 (2T)	
	K_I	F	0 (2T)	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	k_2	S	+	No pasa. SQR: 4,00 (9°)
	K_M	F	+	
	K_I	B	+	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	k_2	S	+	No pasa. SQR: 2,70 (6°)
	K_M	F	+	
	K_I	B	+	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	k_2	S	+	No pasa. $K_I \gg K'_I$. SQR: 4,01 (10°)
	K_M	F	0 (3T)	
	K_I	F	0 (3T)	
	K'_I	S (valores altos)	0 (2T)	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	k_2	S	+	No pasa. SQR: 1,07 (1°)
	K_M	F	0 (2T)	
	K_I	F	0 (2T)	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	k_2	S	+	No pasa. SQR: 1,91 (4°)
	K_M	F	+	
	K_I	B	0 (1T)	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	k_2	S	+	No pasa. SQR: 1,41 (2°)
	K_M	F	+	
	K_I	B	+	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	k_2	S	+	No pasa. $K_I \gg K'_I$. SQR: 1,90 (3°)
	K_M	NV	0 (3T)	
	K_I	S	0 (3T)	
	K'_I	B (valores muy altos)	0 (3T)	

Clave: Criterios físicos: **F** fluctua ; **S** sube; **B** baja; **NV** no varía (según aumenta la temperatura)
 Parámetro negativo, le sigue el número de veces que lo es con ese modelo

Criterios estadísticos: **0** incluye el cero en el intervalo de confianza, le sigue el número de temperaturas en las que se da la circunstancia con ese modelo
 + pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.28.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como variable)

MODELO	Orden 1 (1)	Michaelis- Menten simple (2)	Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)
Ln k₀	11,02 ± 0,80	10,53 ± 3,60	11,15 ± 2,26
E_a/R	5261 ± 234	5629 ± 1060	5930 ± 600
Ln K_{M0}	-	0,63 ± 6,40	28,48 ± 9,30
E_{aM}/R	-	907 ± 2060	9661 ± 2900
Ln K_{I0}	-	-	27,29 ± 27,01
E_{aI}/R	-	-	8130 ± 7602
SQR	5,48	4,61	8,44
F	6167	3087	1232

Tabla 3.29.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (*Método integral, regresión no lineal, T como variable*) (continuación).

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)
Ln k_0	10,95 ± 1,90	14,04 ± 4,60	13,72 ± 3,46	7,23 ± 2,16
E_a/R	5789 ± 600	6551 ± 1323	6447 ± 1004	4789 ± 346
Ln K_{M0}	10,43 ± 11,00	3,81 ± 7,24	3,36 ± 5,42	1,03 ± 0,83
E_{aM}/R	4356 ± 3600	1766 ± 2142	1675 ± 1698	1356 ± 589
Ln K_{I0}	7,15 ± 12,20	-13,78 ± 7,48	-7,58 ± 4,44	4,03 ± 6,73
E_{al}/R	3354 ± 3800	-3348 ± 2206	-1651 ± 1420	3564 ± 2784
Ln K'_{I0}	-	-	-	38,88 ± 15,48
E'_{al}/R	-	-	-	15238 ± 24586
SQR	2,72	3,90	3,29	3,18
F	4102	2924	3404	3305

Tabla 3.30.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como variable) (continuación).

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)
$\ln k_0$	$11,30 \pm 1,55$	$19,98 \pm 5,64$	$15,00 \pm 2,66$	$5,32 \pm 1003$
E_a/R	5870 ± 441	8141 ± 1600	6772 ± 7644	$4840 \pm 2,6 \cdot 10^3$
$\ln K_{M0}$	$28,54 \pm 12,23$	$10,61 \pm 6,96$	$4,80 \pm 4,20$	$5,70 \pm 1003$
E_{aM}/R	10110 ± 6200	3625 ± 2000	2109 ± 1244	$294 \pm 1,45 \cdot 10^3$
$\ln K_{I0}$	$24,58 \pm 13,96$	$-17,89 \pm 6,48$	$-7,20 \pm 3,02$	$-3,45 \pm 1468$
E_{aI}/R	9001 ± 6230	-4237 ± 1842	-1388 ± 918	-393 ± 2956
$\ln K'_{I0}$	-	-	-	$49,90 \pm 1956$
E'_{aI}/R	-	-	-	$14070 \pm 1,5 \cdot 10^3$
SQR	1,34	2,44	1,81	3,65
F	8192	4621	6130	2987

Tabla 3.31.- Discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	$\ln k_0$	+		Pasa
	E_a/R	+	> 0	SQR=5,48 (10°)
Michaelis-Menten simple (2)	$\ln k_0$	+		No pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR=4,61 (9°)
	$\ln K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	$\ln k_0$	+		Pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR=8,44 (11°)
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	E_{ai}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	$\ln k_0$	+		No pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR=2,72 (4°)
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	E_{ai}/R	0	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	$\ln k_0$	+		No pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR=2,72 (5°)
	$\ln K_M$	0		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	E_{ai}/R	+	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	$\ln k_0$	+		No pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR=3,90 (8°)
	$\ln K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	E_{ai}/R	+	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	$\ln k_0$	+		No pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR=3,18 (6°)
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_i$	0		
	E_{ai}/R	+	> 0	
	E'_{ai}/R	0	> 0 (valor muy alto)	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo

> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza

+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste. entre paréntesis.

Tabla 3.31.(cont.)- Discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=1,34 (1°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=2,44 (3°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=1,81 (2°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=3,65 (7°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
	E_{aI}/R	0	< 0	
	$\text{Ln } K'_i$	0		
E'_{aI}/R	0	> 0		

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
 > 0 Parámetro positivo
 Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
 + pasa
 Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

3.2.2.5.- Discusión

Para discriminar entre los modelos cinéticos propuestos en la Tabla 3.2. y aplicados a la hidrólisis de lactosa por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* (Lactozym) y obtener sus parámetros, se pueden utilizar dos métodos: diferencial e integral. En primer lugar, se ha aplicado el método diferencial. El ajuste de los datos experimentales requiere derivarlos, por cualquier método numérico. Los datos (r, C) resultantes de la derivación se pueden ajustar a varios modelos sencillos propuestos con inhibición por un producto o por el sustrato (Tabla 3.2).

Como primera opción, se han aplicado regresiones lineales para obtener los parámetros cinéticos para los distintos modelos propuestos. Estos modelos se linealizan siguiendo los métodos existentes para la ecuación de Michaelis-Menten: Lineweaver-Burk, Hanes y Eadie. Los parámetros que se obtienen para cada modelo por las distintas linealizaciones no coinciden. Los ajustes son malos ($r < 0,9$ en todos los casos); los valores de F de Fischer son más bajos de lo que requiere un nivel de confianza del 95% en muchos modelos. Hay muchos valores negativos de los parámetros, por tanto, sin sentido físico, en todos los modelos. Se podría pensar que hay que aplicar otros modelos, pero los resultados son tan negativos que no parece ser éste el problema, ya que no hay mejoras ostensibles de un modelo a otro con los ya aplicados. Por tanto, la utilización de las linealizaciones a los datos cinéticos, con la consiguiente manipulación, para poder usar regresiones lineales, no es un método aconsejable en este estudio y no se aplicará a ninguno de los sistemas de reacción posteriores.

Como las ecuaciones diferenciales que ligán la velocidad con las concentraciones son funciones no lineales de estas últimas, se pueden ajustar los datos r vs C mediante regresión no lineal. Los datos obtenidos se ajustaron de esta manera: primero se ajustaron datos a la misma temperatura (ajuste con la temperatura como constante) y luego se ajustaron datos a todas las temperaturas (ajuste a temperatura variable). En los ajustes a temperatura constante se observó que los parámetros del denominador de las ecuaciones diferenciales fluctuaban notablemente con la temperatura, en vez de seguir una tendencia concreta. Este fenómeno es debido a que estos parámetros se acoplan entre sí para que se ajusten mejor los datos de cada temperatura. Para evitarlo, se ajustan todos los datos de todas las temperaturas a la vez en el ajuste a temperatura variable. Además, en la discriminación de un número elevado de modelos que dan ecuaciones relativamente parecidas, es estadísticamente más correcto y más esclarecedor aplicar la regresión no lineal con la temperatura como variable, porque se impone al sistema una variación lógica de los parámetros con la temperatura (Vrábel y col., 1997). Al aplicar regresiones no lineales, los parámetros obtenidos ya tienen sentido físico, obteniéndose energías de activación razonables con varios modelos de los propuestos en la Tabla 3.2. Así que, claramente, la linealización no es aconsejable, sino lo que es adecuado es utilizar regresiones no lineales cuando las ecuaciones diferenciales son funciones no lineales.

Tampoco parece muy aconsejable discriminar el modelo basándose en los resultados del ajuste con la temperatura como constante. El modelo elegido por el método diferencial utilizando regresión no lineal y ajuste a temperatura variable es el modelo 8: inhibición competitiva por galactosa.

La aplicación a los datos experimentales (que son datos C vs. t obtenidos en reactor discontinuo) del método integral evita la derivación numérica de estos datos. Por lo tanto, es necesario un método numérico para integrar la ecuación diferencial de cada modelo. Los datos se han ajustado a los distintos modelos por una regresión no lineal que sigue el algoritmo de Marquardt al que se ha acoplado un algoritmo de integración numérica por Runge-Kutta de cuarto orden. Se ajustan los datos con la temperatura como constante y con la temperatura como variable, y se observa el mismo fenómeno de acoplamiento que se observaba al aplicar el método diferencial, por lo que se puede llegar a la misma conclusión: lo más adecuado para discriminar el modelo cinético es ajustar los datos de todas las temperaturas a la vez. El ajuste de los datos con la temperatura como variable lleva a elegir el modelo 8, igual que por el método diferencial.

Posteriormente, se utilizan los valores de los parámetros del modelo 8 conseguidos mediante la aplicación del método diferencial a temperatura variable para generar, utilizando un programa que tenga implementado el método de integración de Runge-Kutta de cuarto orden, valores de conversión de lactosa para cada valor de tiempo experimental, que se pueden comparar con las calculadas en el ajuste de los datos experimentales X vs t por el método integral a temperatura como variable. Además, con la X experimental, se puede calcular el SQR en cada caso. El SQR al que se llega en la simulación que utiliza los parámetros obtenidos por el método diferencial es 1,34, cuando el SQR conseguido por el método integral es 1,31. En la Figura 3.15 se observa la tendencia de los residuos debidos al cálculo de X con los parámetros obtenidos por los métodos diferencial e integral. Utilizar el método diferencial no es más útil para la discriminación del modelo cinético que usar el método integral y si exige un paso más de cálculo, el cálculo de las velocidades. En consecuencia, a partir de aquí sólo se aplicará el método integral para la discriminación de los modelos cinéticos en los siguientes sistemas reaccionantes.

Resumiendo los resultados obtenidos por el método integral aplicado con la temperatura como variable, los modelos que incluyen la inhibición por glucosa (modelos 4 a 7) no ajustan bien los datos, aunque mejoran el ajuste respecto a Michaelis-Menten simple. Estos modelos tienen varios parámetros que incluyen el cero en su intervalo de confianza. De los modelos que incluyen la inhibición por galactosa (modelos 8 a 11), el modelo que mejor ajusta los datos (menor SQR) es el modelo 8. Además, los intervalos de confianza de los parámetros de este modelo son los más estrechos.

El análisis de las velocidades iniciales indica que la inhibición parece ser menor a mayor temperatura, lo que lleva a un aumento de K_i al aumentar la temperatura, es decir, que E_{ai} es positiva, lo que está de acuerdo con lo obtenido en el modelo 8 y en desacuerdo con lo que indica el modelo 9, que es el que mejor ajusta tras el modelo 8. La ecuación cinética que corresponde al modelo 8 es la siguiente:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} \right) + C_{lac}} \quad [3.79 a]$$

donde:

$$\begin{aligned} k_2 &= \exp\left(11,30 \pm 1,55 - \frac{5870 \pm 441}{T}\right) \\ K_M &= \exp\left(28,54 \pm 12,23 - \frac{10110 \pm 6200}{T}\right) \\ K_{Igal} &= \exp\left(24,58 \pm 13,96 - \frac{9001 \pm 6230}{T}\right) \end{aligned} \quad [3.79 b]$$

Con el modelo seleccionado (ecuaciones [3.79 a] y [3.79 b]) se han reproducido los resultados experimentales de las Tablas 3.9 a 3.13. Los valores calculados se muestran con línea continua en las figuras donde se muestra la conversión en función del producto $t C_E$ (Figuras 3.16 a 3.22)

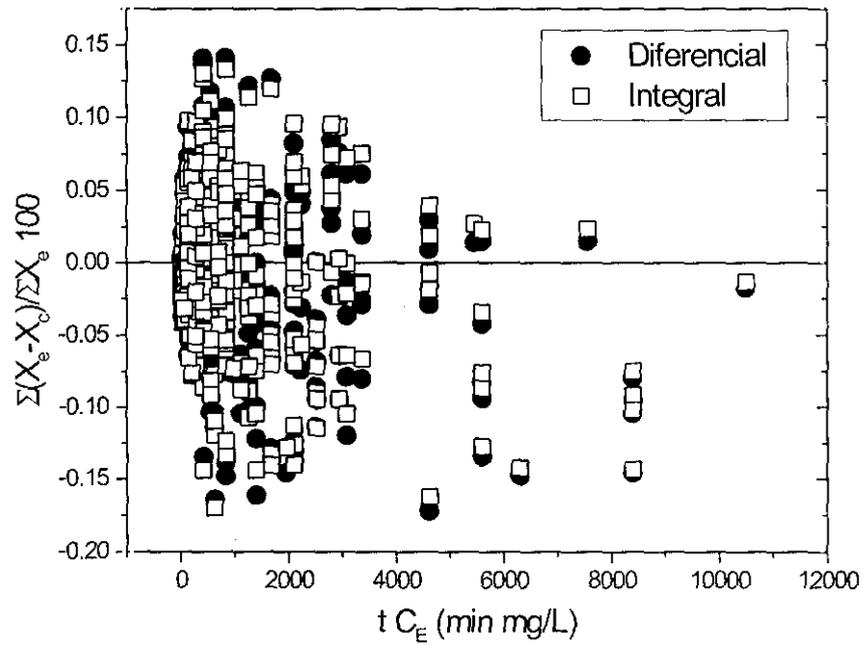


Figura 3.15.- Análisis de residuos con los parámetros del método diferencial y del integral.

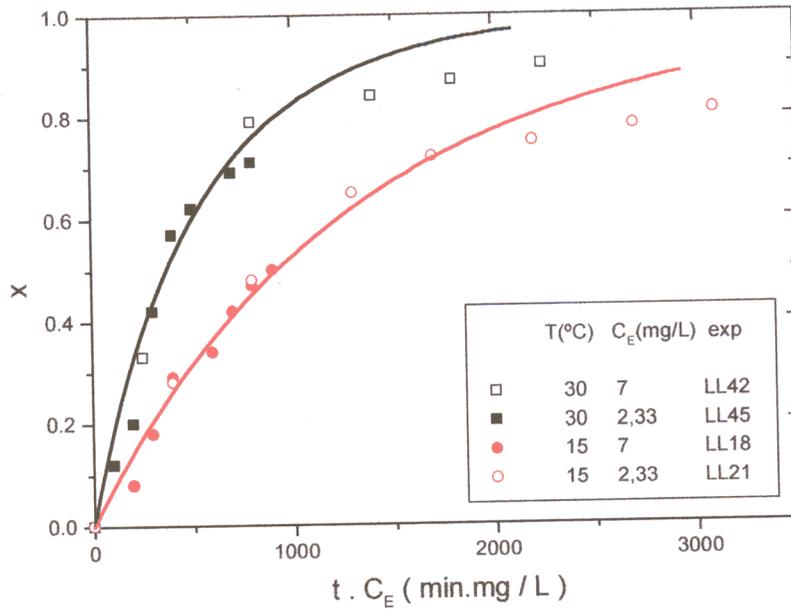


Figura 3.16a. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la temperatura. $C_{lac\ 0}=50\text{g/L}$, $C_{gal\ 0}=0\text{g/L}$, $C_{glu\ 0}=0\text{g/L}$.

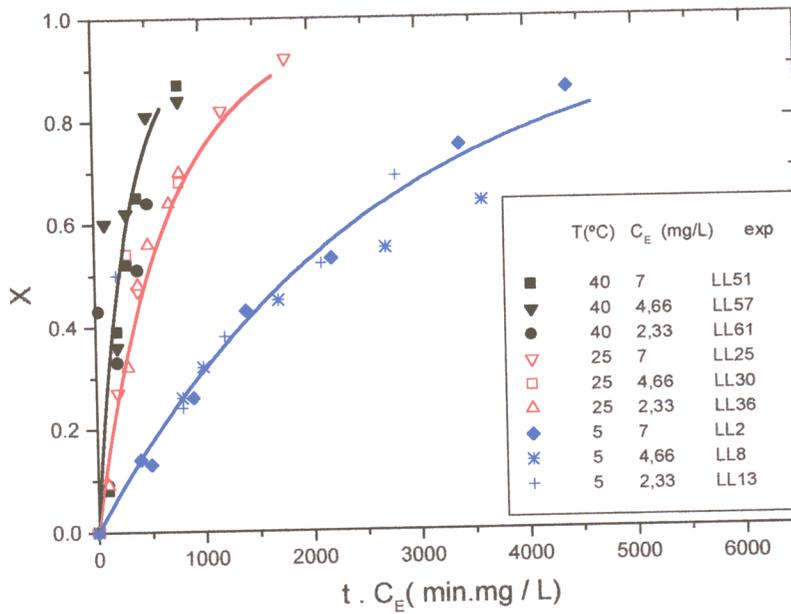


Figura 3.16b. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la temperatura. $C_{lac\ 0}=50\text{g/L}$, $C_{gal\ 0}=0\text{g/L}$, $C_{glu\ 0}=0\text{g/L}$.

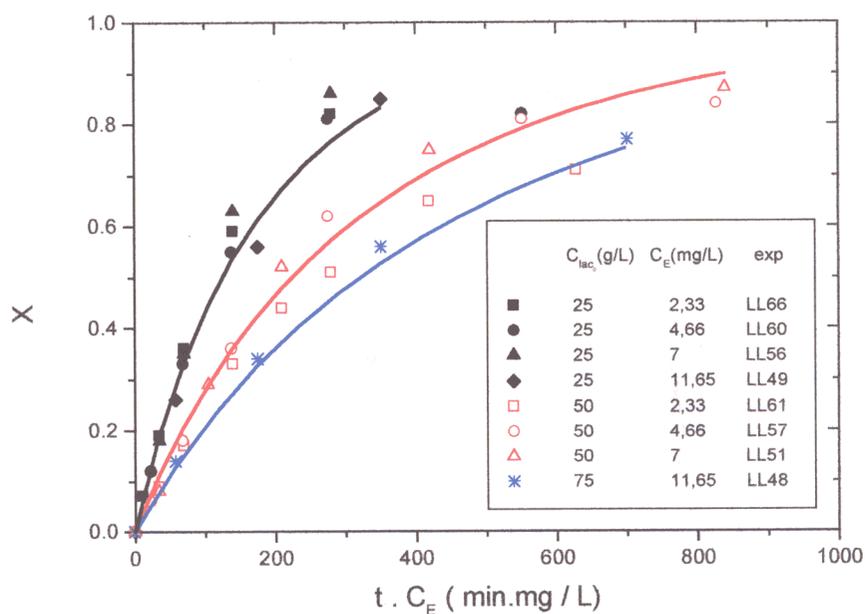


Figura 3.17. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de lactosa. $T=40^{\circ}\text{C}$, $C_{gal\ 0}=0\text{g/L}$, $C_{glu\ 0}=0\text{g/L}$.

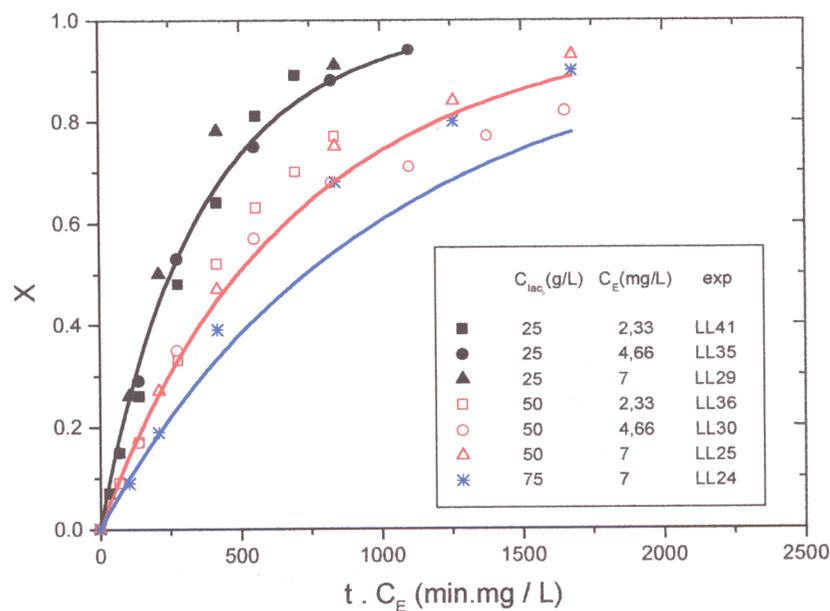


Figura 3.18. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de lactosa. $T=25^{\circ}\text{C}$, $C_{gal\ 0}=0\text{g/L}$, $C_{glu\ 0}=0\text{g/L}$.

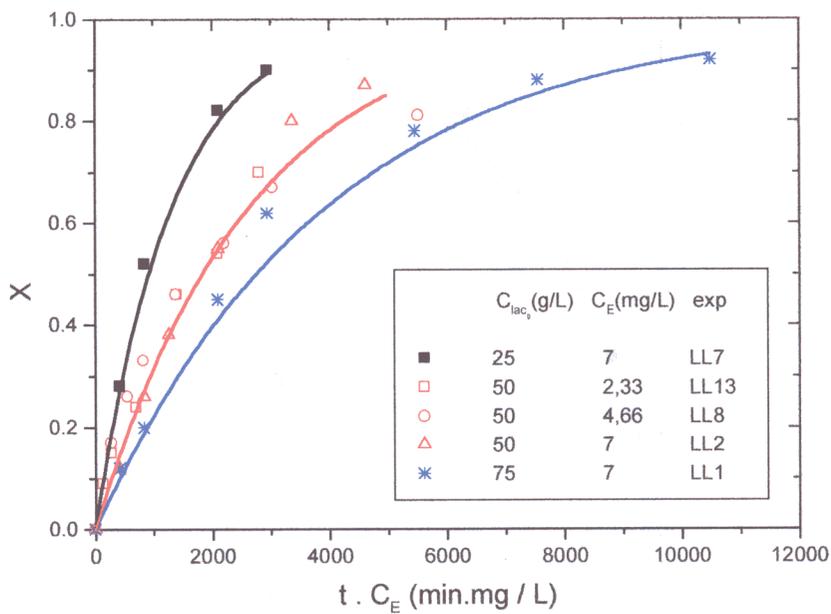


Figura 3.19. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de lactosa. $T= 5^{\circ}\text{C}$, $C_{gal\ 0}=0\text{g/L}$, $C_{glu\ 0}=0\text{g/L}$.

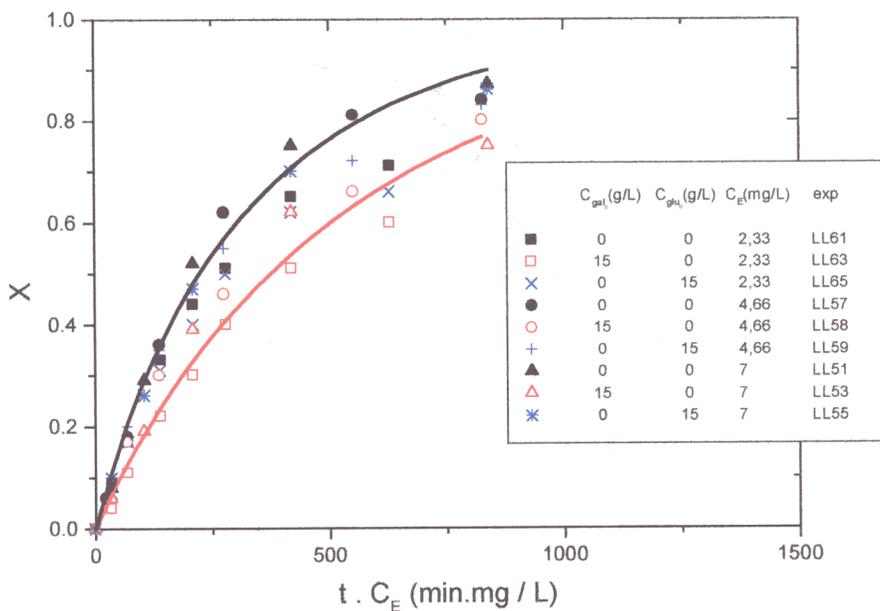


Figura 3.20. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de las concentraciones iniciales de glucosa y galactosa. $T= 40^{\circ}\text{C}$, $C_{lac\ 0}=50\text{g/L}$.

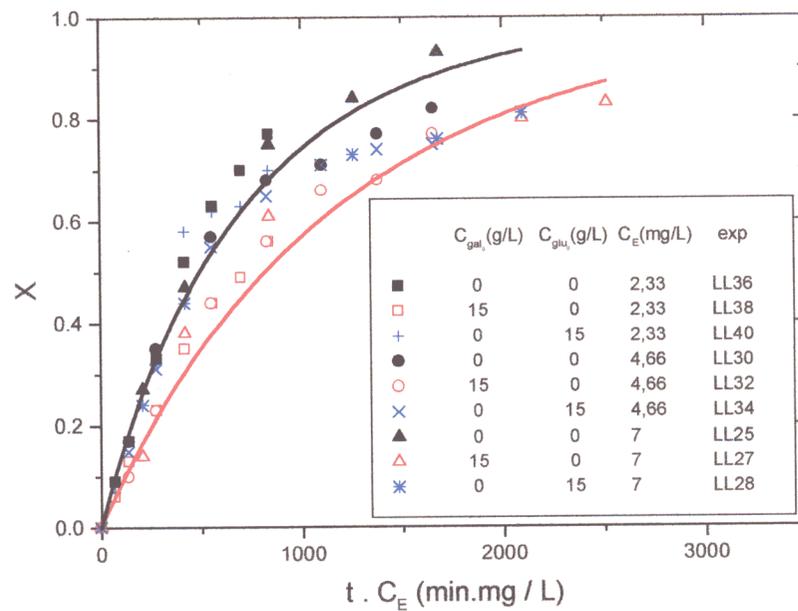


Figura 3.21. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de las concentraciones iniciales de glucosa y galactosa. $T=25^{\circ}\text{C}$, $C_{lac\ 0}=50\text{g/L}$.

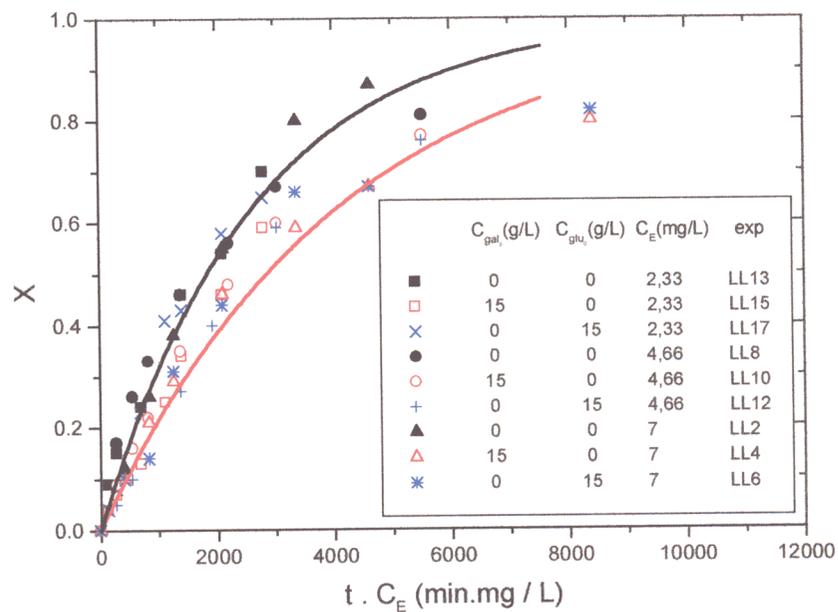


Figura 3.22. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de las concentraciones iniciales de glucosa y galactosa. $T=5^{\circ}\text{C}$, $C_{lac\ 0}=50\text{g/L}$.

3.2.3.- Modelo cinético de la hidrólisis de ONPG

Una vez determinadas las condiciones óptimas de pH, composición del tampón BP y temperatura para mantener la actividad y la estabilidad de la enzima durante el tiempo que dura cada experimento, y con el objeto de estudiar el efecto de la temperatura y de las concentraciones de los compuestos implicados en la cinética de la reacción de hidrólisis de ONPG con la β -galactosidasa de *K. fragilis* (Lactozym), se llevaron a cabo una serie de experimentos, en los que se varió la temperatura entre 5 y 40°C (siendo la temperatura máxima de trabajo los 40° C por producirse desactivación térmica de la enzima a temperaturas superiores), la concentración de ONPG entre 0,25 y 1 g/L, la concentración inicial de galactosa entre 0 y 15 g/L y la de ONP entre 0 y 0,25 g/L. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando una concentración de enzima de 0,7 mg/L.

3.2.3.1.- Resultados experimentales

Los experimentos realizados, así como los resultados obtenidos, son los que se reflejan en las Tablas 3.32 a 3.35. Las gráficas X vs t C_{ENZIMA} se presentan en las Figuras 3.27 a 3.35.

Tabla 3.32.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 5°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LO1	LO2	LO3	LO4	LO5	LO6	LO7	LO8	LO9
C _{ONPG} (g/L)	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1
C _{gal} (g/L)	0	0,3	0	0,15	15	0	0	0,6	15
C _{ONP} (g/L)	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0
tiempo(min)	X _{ONPG}								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,061	0,06	0,03	0,04	0,01	0,02	0,04	0,29	0,03
6	0,148	0,15	0,12	0,08	0,03	0,07	0,04	0,07	0,05
10	0,26	0,24	0,13	0,17	0,05	0,09	0,12	0,07	0,10
15	0,40	0,37	0,25	0,22	0,13	0,17	0,13	0,15	0,12
20	0,50	0,43	0,29	0,32	0,11	0,18	0,20	0,18	0,17
30	0,56	0,57	0,42	0,41	0,18	0,31	0,27	0,27	0,29
60	0,77	0,72	0,64	0,66	0,29	0,45	0,52	0,46	0,49
90	0,79	0,84	0,79	0,75	0,43	0,62	0,64	0,58	0,60
120	0,86	0,78	0,76	0,8	0,47	0,66	0,71	0,7	0,70

Tabla 3.33.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 25°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LO10	LO11	LO12	LO13	LO14	LO15
C _{ONPG} (g/L)	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	1
C _{gal} (g/L)	0	0	0	15	0	0
C _{ONP} (g/L)	0	0,05	0	0	0,25	0
tiempo(min)	X _{ONPG}					
0	0	0	0	0	0	0
3	0,28	0,18	0,21	0,08	0,10	0,16
6	0,50	0,36	0,40	0,16	0,31	0,28
10	0,68	0,45	0,58	0,27	0,4	0,42
15	0,78	0,6	0,75	0,36	0,57	0,58
20	0,83	-	0,82	0,45	0,58	0,67
25	-	-	-	0,54	0,6	0,71

Tabla 3.34.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 30°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LO16	LO17	LO18
$C_{ONPG}(g/L)$	0,25	0,5	1
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0
$C_{ONP}(g/L)$	0	0	0
tiempo(min)	X_{ONPG}		
0	0	0	0
3	0,41	0,3	0,22
6	0,68	0,56	0,41
10	0,85	0,7	0,59
15	-	0,85	0,71

Tabla 3.35.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 40°C con la β -galactosidasa de *K. fragilis*.

EXP	LO1	LO20	LO21	LO22	LO2	LO24	LO2	LO2	LO27
$C_{ONPG}(g/L)$	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1
$C_{gal}(g/L)$	0	0,3	0	0	0,15	15	0	0	0,6
$C_{ONP}(g/L)$	0	0	0,5	0	0	0	0,25	0	0
tiempo(min)	X_{ONPG}								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,51	0,42	-	0,38	0,32	0,26	0,25	0,16	0,12
6	0,8	0,72	0,61	0,63	0,56	0,51	0,46	0,3	0,26
10	0,96	0,88	0,66	0,76	0,74	0,62	0,6	0,4	0,38
15	1	1	0,83	0,8	0,76	0,64	0,67	0,51	0,51
20	-	-	0,82	0,83	0,8	0,69	0,65	0,59	0,6

3.2.3.2.- Análisis de las velocidades iniciales

Para analizar el efecto de la concentración inicial de sustrato y de las concentraciones iniciales de los productos en la velocidad inicial de reacción, r_0 , se ha calculado dicha velocidad en cada experimento, según lo expuesto en el apartado 3.2.2.2. Posteriormente, se ha representado r_0 frente a la concentración de ONPG para concentraciones iniciales de productos iguales a cero en la Figura 3.23. En las Figuras 3.24 y 3.25, se representa r_0 frente a la concentración de cada producto a concentración inicial de ONPG 0,5 g/L.

La influencia de la concentración inicial de ONPG sobre la velocidad inicial de reacción se muestra en la Figura 3.23. Se observa que, al aumentar la concentración de ONPG la velocidad de reacción aumenta, pero no proporcionalmente, sino que parece acercarse a un valor máximo de la velocidad inicial de forma asintótica, por lo que el modelo cinético que ajuste los datos representaría una cinética intermedia entre orden cero y orden uno. A temperaturas bajas, al aumentar la concentración de ONPG inicial, apenas aumenta la velocidad inicial de reacción, por lo que la cinética es similar a una de orden 0. Al aumentar la temperatura, la diferencia relativa entre velocidades iniciales cuando aumenta la concentración de sustrato se hace mayor, con lo que la cinética se va aproximando a una de orden uno. Por lo mismo, la K_M parece aumentar al aumentar la temperatura, es decir, que disminuye la afinidad de la enzima por el sustrato en ese sentido.

En la Figura 3.24 se observa el efecto de la concentración inicial de galactosa en la velocidad inicial de reacción. Añadir galactosa al medio de reacción al comienzo, implica una disminución en la velocidad inicial de reacción, por lo que la galactosa es un inhibidor. La galactosa inhibe siempre que esté en una concentración inicial mucho mayor que el sustrato, lo que lleva a la conclusión de que la enzima tiene mucha más afinidad por el ONPG que por la galactosa, a pesar de que se podría pensar que la galactosa entra más en el centro activo de la enzima que el resto aromático ONP, según el mecanismo propuesto para la acción de las β -galactosidasas (Wallenfels y Weil, 1972). Además, se observa que la inhibición disminuye al aumentar la temperatura, tendencia común en

muchas enzimas según se acercan a su temperatura óptima de actividad. Este hecho implica que $K_{I gal}$ aumenta con la temperatura.

La Figura 3.25 presenta el efecto de añadir ONP al comienzo de la reacción. Se observa que, al añadir ONP en una concentración similar a la del sustrato al medio de reacción, se produce a una velocidad menor comparada con la que se consigue sin la presencia de este producto de reacción, por lo que también es un inhibidor. El ONP inhibe mucho más que la galactosa, o sea, se fija a la enzima, ya como complejo o como enzima libre, aunque esté en una concentración baja, de la misma magnitud que la concentración inicial de sustrato. Se observa que la inhibición por este producto parece disminuir al disminuir la temperatura, es decir, que la $K_{I ONP}$ aumenta al disminuir T.

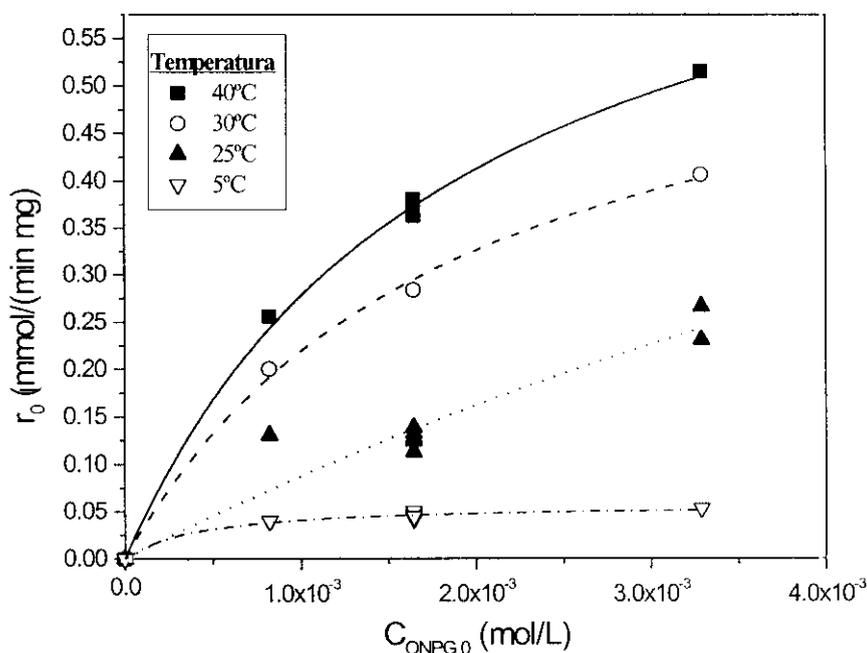


Figura 3.23. - Hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: r_0 vs C_{ONPG} a varias temperaturas.

$$C_{gal_0} = 0 \text{ g/L}; C_{ONP_0} = 0 \text{ g/L}$$

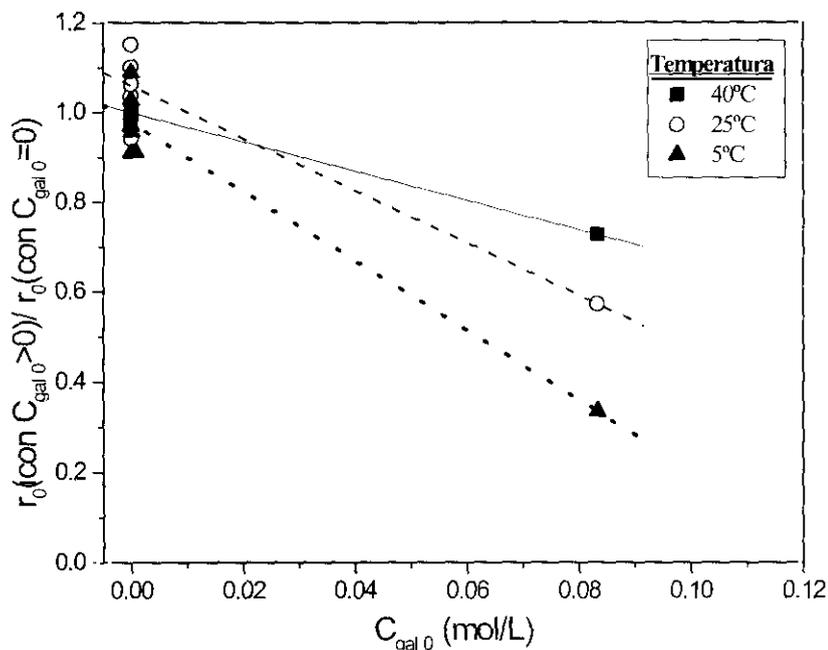


Figura 3.24. – Hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin galactosa inicial vs $C_{\text{gal},0}$ a varias temperaturas. $C_{\text{ONPG},0} = 0,5 \text{ g/L}$; $C_{\text{ONP},0} = 0 \text{ g/L}$.

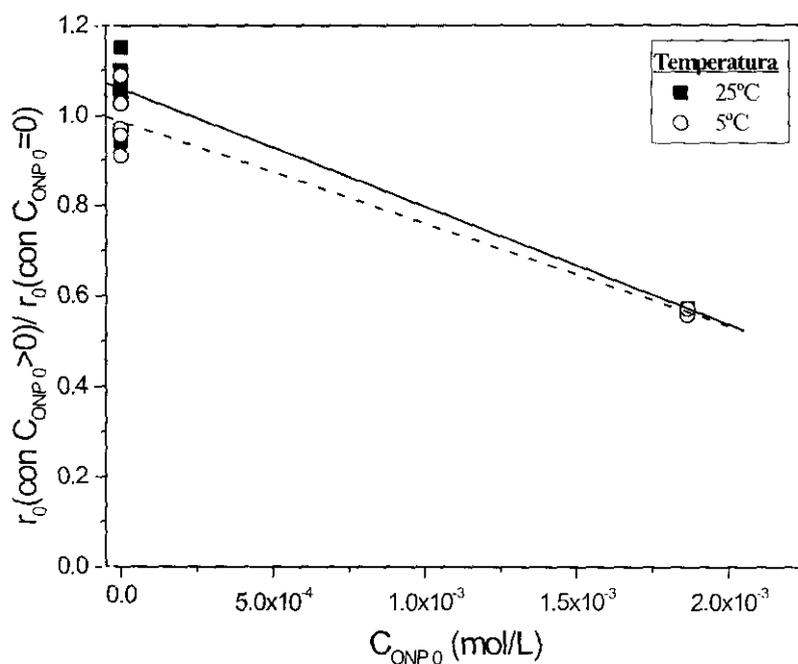


Figura 3.25. – Hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin ONP inicial vs $C_{\text{ONP},0}$ a varias temperaturas. $C_{\text{ONPG},0} = 0,5 \text{ g/L}$; $C_{\text{gal},0} = 0 \text{ g/L}$.

Los modelos cinéticos a considerar deberían incluir la concentración de ONPG en el denominador y unos términos en el denominador en los que se tengan en cuenta que la galactosa y el o-nitrofenol son inhibidores de la reacción de hidrólisis enzimática del ONPG.

3.2.3.3.- Discriminación del modelo cinético

En este punto, y como ya se decidió en el apartado 3.2.2.2, se aplica el método integral, ajustando los datos experimentales a los modelos cinéticos entre los que se discrimina por regresión no lineal a la que se ha acoplado un método de integración numérica por Runge-Kutta.

Se discrimina entre los modelos cinéticos propuestos en las Tablas 3.2 y 3.3 Los modelos de la Tabla 3.3 son modelos que consideran la inhibición por los dos productos de la reacción. Estos modelos cinéticos se utilizan para ajustar los datos experimentales (C, t) por regresión no lineal teniendo en cuenta datos obtenidos a cada temperatura (ajuste con la temperatura como constante) o ajustando todos los datos a la vez (ajuste con la temperatura como variable).

1.- *Ajuste con la temperatura como constante*

En las Tablas 3.36 a 3.39 se muestran los resultados obtenidos al aplicar la regresión no lineal a datos a cada una de las temperaturas: parámetros cinéticos y sus intervalos de confianza, la suma de residuos al cuadrado (SQR) y el valor de F para cada modelo cinético. En la Tabla 3.40 se muestra el cumplimiento de los criterios estadísticos y físicos aplicados por cada modelo. En las Tablas 3.36 a 3.39, los parámetros que no pasan algún criterio están sombreados.

Los modelos que pasan los criterios estadísticos son los modelos 1, 8, 9, 10, 12, 18 y 20. Al aplicar los criterios físicos a los modelos cinéticos, los modelos que superan los citados criterios son los modelos 1 y 10.

cumplen algún criterio físico o estadístico están sombreados. En la Tabla 3.44 se muestra el grado de cumplimiento de los criterios estadísticos y físicos por parte de los parámetros de cada modelo cinético.

Con la temperatura como variable, pasan los criterios estadísticos los modelos 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 13, y 15. Los criterios físicos (Energía de activación de la constante cinética del numerador mayor que cero; valores razonables de las energías de activación) los pasan todos los modelos ensayados.

El modelo que mejor ajusta (con el menor valor de SQR: 1,28) es el modelo 15. El modelo 12 es el siguiente modelo que mejor ajusta, con un valor de SQR de 1,56. El modelo 15 tiene unos parámetros con intervalos de confianza más estrechos que los del modelo 12. Por estas dos razones, el modelo 15 parece el más adecuado para ajustar los datos de la reacción de hidrólisis de ONPG con Lactozym.

Como ya sucedía en el caso de la reacción de hidrólisis de lactosa con Lactozym, el ajuste de los datos experimentales con la temperatura como constante no permite la discriminación del modelo cinético, por tener una fiabilidad estadística baja. Hay que recurrir al ajuste de los datos con la temperatura como variable, para poder discriminar de forma razonable entre los modelos cinéticos propuestos. Por esto, en los sistemas de reacción siguientes sólo se van a ajustar los datos experimentales por el método integral con ajuste con la temperatura como variable.

3.2.3.4.- Discusión

Para elegir el modelo final, se han utilizado las conclusiones del análisis de las velocidades iniciales y del ajuste a temperatura variable por el método integral. Como el modelo 12 pronostica unos valores de $K_{I\ gal}$ y de $K_{I\ ONP}$ crecientes con la temperatura, parece que el modelo más adecuado es el modelo 15, que pronostica una variación de $K_{I\ gal}$ creciente con la temperatura y una variación de $K_{I\ ONP}$ decreciente con la temperatura, de acuerdo a la que se observa en el análisis de las velocidades iniciales. Además, el modelo 15 tiene un SQR de 1,28 frente al SQR de 1,56 del modelo 12. En la Figura 3.26

El modelo que tiene el SQR menor es el 18, seguido de cerca por el 15 y por el 12, por ese orden (sus respectivos valores de SQR son: 0,74; 0,78 y 0,79). Como el modelo 18 pasa todos los criterios y es el que tiene mejor SQR total, parece ser el más adecuado. Los únicos modelos que se eliminan en esta etapa son los modelos con inhibición mixta por ONP y por galactosa (modelos 7 y 11), porque los resultados obtenidos con estos modelos son mucho peores que con los demás: estos modelos tienen cuatro parámetros, pero sus valores de SQR son iguales o mayores que los de los modelos con tres parámetros; varios de sus parámetros incluyen el cero en sus intervalos de confianza a varias temperaturas y, además, la constante K'_1 tiene un valor mucho mayor que la K_i , por lo que el término del denominador en el que está dicha constante se hace despreciable y el modelo que contempla la inhibición mixta se transforma en uno de inhibición competitiva.

Muchos modelos (todos menos el 1, el 2 y el 10) tienen parámetros en el denominador (K_M , K_I o $K_{I_{gal}}$ y $K_{I_{ONP}}$) que se acoplan, variando al unísono durante la regresión. El acople de los parámetros provoca que dos o más de ellos evolucionen hacia valores similares que, en general, carecen de sentido físico. Este hecho falsea la discriminación que se realiza con el ajuste con la temperatura como constante, por lo que no es fiable, y hay que recurrir al ajuste de los datos con la temperatura como variable para discriminar el modelo cinético adecuado.

2.- Ajuste con la temperatura como variable

Para llevar a cabo el ajuste de los datos experimentales con la temperatura como variable se sustituye cada parámetro cinético por su expresión según la ecuación de Arrhenius. Luego, se ajustan todos los datos de todas las temperaturas con la ecuación de cada modelo cinético, en la que se han sustituido los parámetros por sus expresiones según Arrhenius.

Los resultados del ajuste con la temperatura como variable: neperianos de valores preexponenciales y energías de activación con sus intervalos de confianza, el valor de SQR y el valor de F, se muestran en las Tablas 3.41 a 3.43, donde los parámetros que no

se muestra el análisis de residuos calculado con el modelo 15. Como se puede observar, la mayoría de los valores calculados a partir del modelo cinético elegido tienen menos de un 10 % de error respecto a los valores experimentales. Sin embargo, hay varios casos en los que los errores superan el 15%. La ecuación cinética del modelo 15 es:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{ONPG}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}}\right) + C_{ONPG} \left(1 + \frac{C_{ONP}}{K_{IONP}}\right)} \quad [3.80 a]$$

donde:

$$\begin{aligned} k_2 &= \exp\left(34,00 \pm 13,20 - \frac{12160 \pm 4203}{T}\right) \\ K_M &= \exp\left(22,34 \pm 13,52 - \frac{8141 \pm 3700}{T}\right) \\ K_{Igal} &= \exp\left(6,29 \pm 6,14 - \frac{2883 \pm 1704}{T}\right) \\ K_{IONP} &= \exp\left(-35,86 \pm 14,23 + \frac{8085 \pm 3982}{T}\right) \end{aligned} \quad [3.80 b]$$

Se han reproducido los resultados experimentales de las Tablas 3.32 a 3.35 con el modelo elegido (ecuaciones [3.80 a] y [3.80 b]). Los valores obtenidos de la reproducción se representan como líneas continuas en las Figuras 3.27 a 3.35.

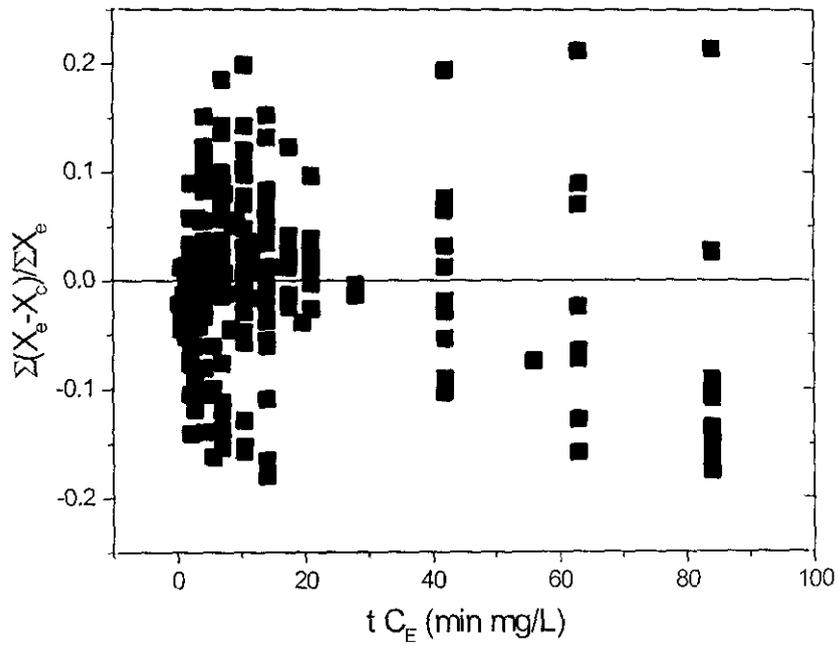


Figura 3.26.- Análisis de residuos comparando los datos experimentales con los valores calculados a partir del modelo 15.

Tabla 3.36.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, T como constante)

Modelo	T (°C)	k_2	K_M	K_I	K'_I	F	SQR	Σ SQR
Orden 1 (1)	40	$6,8 \cdot 10^{-2} \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$	-	-	-	727	1,40	3,31
	25	$3,2 \cdot 10^{-2} \pm 3,2 \cdot 10^{-3}$	-	-	-	1101	0,83	
	5	$7,7 \cdot 10^{-3} \pm 6,2 \cdot 10^{-4}$	-	-	-	1905	1,08	
Michaelis-Menten simple (2)	40	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 4,0 \cdot 10^{-5}$	$6,5 \cdot 10^{-4} \pm 5,4 \cdot 10^{-4}$	-	-	554	0,93	2,62
	25	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-3} \pm 3,6 \cdot 10^{-3}$	-	-	596	0,76	
	5	$2,9 \cdot 10^{-5} \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$	-	-	1133	0,93	
Michaelis-Menten con inhibición por ONPG (3)	40	$1,1 \cdot 10^{-1} \pm 10,54$	$9,3 \cdot 10^{-1} \pm 880,2$	$2,2 \cdot 10^{-6} \pm 2,2 \cdot 10^{-3}$	-	481	0,70	2,29
	25	$4,6 \cdot 10^{-4} \pm 2,8 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-3} \pm 4,8 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-2} \pm 5,6 \cdot 10^{-2}$	-	402	0,66	
	5	$3,8 \cdot 10^{-5} \pm 8,8 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-3} \pm 9,3 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2} \pm 1,0 \cdot 10^{-1}$	-	749	0,93	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP (4)	40	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,6 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 2,9 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4} \pm 6,4 \cdot 10^{-4}$	-	633	0,52	1,60
	25	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3} \pm 8,6 \cdot 10^{-4}$	-	583	0,50	
	5	$3,1 \cdot 10^{-5} \pm 1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-3} \pm 9,6 \cdot 10^{-4}$	$8,9 \cdot 10^{-4} \pm 4,6 \cdot 10^{-4}$	-	1190	0,58	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP (5)	40	$2,3 \cdot 10^{-4} \pm 1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 9,9 \cdot 10^{-4}$	$5,8 \cdot 10^{-4} \pm 4,1 \cdot 10^{-4}$	-	776	0,43	1,68
	25	$7,8 \cdot 10^{-4} \pm 3,9 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-2} \pm 8,6 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 6,6 \cdot 10^{-4}$	-	534	0,55	
	5	$7,3 \cdot 10^{-5} \pm 8,1 \cdot 10^{-5}$	$5,8 \cdot 10^{-3} \pm 7,3 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-4} \pm 5,2 \cdot 10^{-4}$	-	996	0,70	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP (6)	40	$1,4 \cdot 10^{-4} \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$	$4,0 \cdot 10^{-4} \pm 2,9 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 7,1 \cdot 10^{-4}$	-	739	0,45	1,59
	25	$4,5 \cdot 10^{-5} \pm 2,1 \cdot 10^{-6}$	$2,8 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 7,4 \cdot 10^{-4}$	-	1123	0,62	
	5	$2,3 \cdot 10^{-4} \pm 2,0 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-3} \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$	-	571	0,52	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por ONP (7)	40	$2,0 \cdot 10^{-4} \pm 2,1 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-3} \pm 2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3} \pm 5,4 \cdot 10^{-3}$	$-3,0 \cdot 10^9 \pm 8,7 \cdot 10^9$	362	0,71	2,16
	25	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 7,0 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 1,4 \cdot 10^{-4}$	$6,9 \cdot 10^{-4} \pm 5,9 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{15} \pm 4,4 \cdot 10^{15}$	412	0,52	
	5	$2,2 \cdot 10^{-5} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-4} \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-4} \pm 6,6 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^7 \pm 2,3 \cdot 10^9$	434	0,93	

Tabla 3.37.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como constante).

Modelo	T (°C)	k_2	K_M	K_I	K'_I	F	SQR	Σ SQR
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	40	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 3,5 \cdot 10^{-5}$	$5,5 \cdot 10^{-4} \pm 4,5 \cdot 10^{-4}$	$4,3 \cdot 10^{-2} \pm 4,2 \cdot 10^{-2}$	-	417	0,80	1,90
	25	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 7,6 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-3} \pm 2,1 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-2} \pm 3,6 \cdot 10^{-2}$	-	591	0,50	
	5	$3,7 \cdot 10^{-5} \pm 1,6 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-2} \pm 2,4 \cdot 10^{-2}$	-	1187	0,60	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	40	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 3,8 \cdot 10^{-5}$	$6,0 \cdot 10^{-4} \pm 4,9 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-2} \pm 5,8 \cdot 10^{-2}$	-	399	0,83	2,07
	25	$1,4 \cdot 10^{-4} \pm 7,6 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-3} \pm 2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-2} \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$	-	589	0,51	
	5	$4,2 \cdot 10^{-5} \pm 2,4 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-3} \pm 2,8 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-2} \pm 3,0 \cdot 10^{-2}$	-	954	0,73	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	40	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 3,7 \cdot 10^{-5}$	$6,0 \cdot 10^{-4} \pm 4,8 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-1} \pm 9,4 \cdot 10^{-2}$	-	407	0,82	1,96
	25	$1,4 \cdot 10^{-4} \pm 7,4 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-3} \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$	$8,4 \cdot 10^{-2} \pm 4,8 \cdot 10^{-2}$	-	590	0,51	
	5	$4,8 \cdot 10^{-5} \pm 2,7 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-3} \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	$9,8 \cdot 10^{-2} \pm 3,9 \cdot 10^{-2}$	-	1112	0,63	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	40	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 4,4 \cdot 10^{-5}$	$6,0 \cdot 10^{-4} \pm 5,8 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-2} \pm 9,4 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{13} \pm 1,4 \cdot 10^{14}$	293	0,82	2,70
	25	$7,1 \cdot 10^{-5} \pm 1,4 \cdot 10^{-5}$	$9,7 \cdot 10^{-4} \pm 4,0 \cdot 10^{-4}$	$-5,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,9 \cdot 10^{-4}$	$9,8 \cdot 10^{-2} \pm 5,2 \cdot 10^{-2}$	275	0,79	
	5	$2,2 \cdot 10^{-5} \pm 8,4 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-3} \pm 8,8 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{13} \pm 1,1 \cdot 10^{15}$	426	1,09	

Tabla 3.38.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como constante).

Modelo	T(°C)	k_2	K_M	K_{Igal}	K_{IONP}	F	SQR	Σ SQR
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y competitiva por galactosa (12)	40	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$	$7,8 \cdot 10^{-3} \pm 2,4 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-4} \pm 5,4 \cdot 10^{-4}$	$6,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	626	0,38	0,79
	25	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 6,4 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$	$8,8 \cdot 10^{-4} \pm 4,9 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-3}$	1023	0,21	
	5	$3,9 \cdot 10^{-5} \pm 1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 8,0 \cdot 10^{-4}$	$9,0 \cdot 10^{-4} \pm 2,8 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-2} \pm 8,2 \cdot 10^{-3}$	2515	0,20	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (13)	40	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,8 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{-4} \pm 5,8 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-2} \pm 4,5 \cdot 10^{-2}$	574	0,41	0,97
	25	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 6,8 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	$8,9 \cdot 10^{-4} \pm 4,8 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$	1024	0,21	
	5	$4,4 \cdot 10^{-5} \pm 1,9 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,3 \cdot 10^{-3}$	$9,8 \cdot 10^{-4} \pm 3,8 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,7 \cdot 10^{-3}$	1451	0,35	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (14)	40	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,6 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-4} \pm 2,6 \cdot 10^{-4}$	$8,9 \cdot 10^{-2} \pm 4,9 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-4} \pm 5,8 \cdot 10^{-4}$	580	0,41	0,88
	25	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 6,4 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	$8,8 \cdot 10^{-4} \pm 4,8 \cdot 10^{-4}$	1025	0,21	
	5	$5,7 \cdot 10^{-5} \pm 2,4 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,7 \cdot 10^{-3}$	$5,9 \cdot 10^{-2} \pm 1,6 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 3,6 \cdot 10^{-4}$	1991	0,26	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y competitiva por galactosa (15)	40	$2,3 \cdot 10^{-4} \pm 9,6 \cdot 10^{-5}$	$8,8 \cdot 10^{-4} \pm 6,8 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	$5,8 \cdot 10^{-4} \pm 3,1 \cdot 10^{-4}$	921	0,26	0,78
	25	$7,4 \cdot 10^{-3} \pm 2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 4,1 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 4,9 \cdot 10^{-4}$	922	0,23	
	5	$1,4 \cdot 10^{-7} \pm 1,8 \cdot 10^{-4}$	$9,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	$4,8 \cdot 10^{-2} \pm 1,3 \cdot 10^{-2}$	$1,9 \cdot 10^{-4} \pm 2,8 \cdot 10^{-4}$	1814	0,29	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (16)	40	$2,4 \cdot 10^{-4} \pm 1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-3} \pm 8,4 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-2} \pm 2,2 \cdot 10^{-2}$	$5,4 \cdot 10^{-4} \pm 3,1 \cdot 10^{-4}$	812	0,30	0,98
	25	$8,7 \cdot 10^{-4} \pm 2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 5,6 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 4,0 \cdot 10^{-4}$	920	0,24	
	5	$2,3 \cdot 10^{-4} \pm 6,6 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-2} \pm 5,2 \cdot 10^{-2}$	$5,4 \cdot 10^{-3} \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4} \pm 2,4 \cdot 10^{-4}$	1168	0,44	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y no competitiva por galactosa (17)	40	$2,5 \cdot 10^{-4} \pm 1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3} \pm 8,1 \cdot 10^{-4}$	$6,9 \cdot 10^{-2} \pm 3,3 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^{-4} \pm 3,0 \cdot 10^{-4}$	871	0,28	0,91
	25	$7,4 \cdot 10^{-4} \pm 2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 4,1 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^{-2} \pm 2,1 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm 3,8 \cdot 10^{-4}$	922	0,24	
	5	$1,7 \cdot 10^{-4} \pm 2,6 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-2} \pm 6,4 \cdot 10^{-2}$	$5,3 \cdot 10^{-3} \pm 2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3} \pm 2,1 \cdot 10^{-4}$	1760	0,39	

Tabla 3.39.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, T como constante).

Modelo	T(°C)	k_2	K_M	$K_{I gal}$	$K_{I ONP}$	F	SQR	Σ SQR
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y competitiva por galactosa (18)	40	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 2,8 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-4} \pm 2,0 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-3} \pm 5,3 \cdot 10^{-4}$	834	0,29	0,74
	25	$2,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,2 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 7,0 \cdot 10^{-4}$	1000	0,22	
	5	$5,6 \cdot 10^{-5} \pm 1,8 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,3 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-2} \pm 9,2 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3} \pm 4,0 \cdot 10^{-4}$	2304	0,23	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (19)	40	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 3,4 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^{-3} \pm 3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-3} \pm 9,1 \cdot 10^{-4}$	$-6,9 \cdot 10^{-3} \pm 5,4 \cdot 10^{-3}$	552	0,45	1,49
	25	$1,0 \cdot 10^{-4} \pm 3,0 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 5,8 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-2} \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$	733	0,29	
	5	$3,0 \cdot 10^{-5} \pm 8,0 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 6,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	$-2,4 \cdot 10^{-3} \pm 1,0 \cdot 10^{-4}$	831	0,65	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (20)	40	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 3,2 \cdot 10^{-5}$	$3,7 \cdot 10^{-4} \pm 2,2 \cdot 10^{-4}$	$7,6 \cdot 10^{-2} \pm 3,6 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-3} \pm 5,6 \cdot 10^{-4}$	765	0,32	0,80
	25	$2,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 7,0 \cdot 10^{-4}$	1002	0,22	
	5	$7,8 \cdot 10^{-5} \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \cdot 10^{-3} \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-2} \pm 1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 4,2 \cdot 10^{-4}$	1965	0,26	

Tabla 3.40.- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis*.
Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura constante

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS FISICOS	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	k_2	S +	+	Pasa. SQR=3,31 (20°)
Michaelis-Menten simple (2)	k_2	F	+	No pasa. SQR=2,62 (18°)
	K_M	F	0 (1T)	
Michaelis-Menten con inhibición por ONPG (3)	k_2	S (a 40°C valor alto)	0 (2T)	No pasa. SQR=2,29 (17°)
	K_M	F	0 (3T)	
	K_i	F (a 40°C valor bajo)	0 (3T)	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP (4)	k_2	F	+	No pasa. SQR=1,60 (11°)
	K_M	F	0 (2T)	
	K_i	F	0 (1T)	
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por ONP (5)	k_2	F	0 (2T)	No pasa. SQR=1,68 (12°)
	K_M	F	0 (2T)	
	K_i	F	0 (2T)	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP (6)	k_2	F	+	No pasa. SQR=1,59 (10°)
	K_M	F	0 (1T)	
	K_i	B	+	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por ONP (7)	k_2	F	0 (2T)	No pasa. SQR=2,16 (16°)
	K_M	S +	0 (3T)	
	K_i	S +	0 (2T)	
	K'_i	- 1 (valores altos)	0 (3T)	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	k_2	F	+	No pasa. SQR=1,90 (13°)
	K_M	B +	+	
	K_i	F	+	
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por galactosa (9)	k_2	F	+	No pasa. SQR=2,07 (15°)
	K_M	B +	+	
	K_i	F	+	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	k_2	F	+	Pasa. SQR=1,96 (14°)
	K_M	B +	+	
	K_i	B +	+	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	k_2	F	+	No pasa. SQR=2,70 (19°)
	K_M	B +	+	
	K_i	- 1	0 (2T)	
	K'_i	F (valores altos)	0 (2T)	

Clave: Criterios físicos:

F fluctua ; S sube; B baja (según aumenta la temperatura)

- Parámetro negativo, le sigue el número de veces que lo es con ese modelo

Criterios estadísticos:

0 incluye el cero en el intervalo de confianza, le sigue el número de temperaturas en las que se da la circunstancia con ese modelo
+ pasa

Observaciones:

al valor de SQR le sigue el nº de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.40.(cont.)- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura constante

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS FÍSICOS	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y competitiva por galactosa (12)	k_2	F	+	No pasa. SQR=0,79 (3°)
	K_M	S +	0 (1T)	
	K_{Igal}	B +	0 (1T)	
	$K_{I ONP}$	B +	+	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (13)	k_2	F	+	No pasa. SQR=0,97 (7°)
	K_M	B +	0 (1T)	
	K_{Igal}	B +	0 (1T)	
	$K_{I ONP}$	F	+	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (14)	k_2	F	+	No pasa. SQR=0,88 (5°)
	K_M	B +	0 (1T)	
	K_{Igal}	B +	+	
	$K_{I ONP}$	B +	0 (1T)	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y competitiva por galactosa (15)	k_2	F	0 (2T)	No pasa. SQR=0,78 (2°)
	K_M	B +	0 (1T)	
	K_{Igal}	B +	+	
	$K_{I ONP}$	F	0 (2T)	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (16)	k_2	F	0 (2T)	No pasa. SQR=0,98 (8°)
	K_M	B +	0 (3T)	
	K_{Igal}	B +	+	
	$K_{I ONP}$	F	0 (2T)	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y no competitiva por galactosa (17)	k_2	F	0 (2T)	No pasa. SQR=0,91 (6°)
	K_M	F	0 (2T)	
	K_{Igal}	F	+	
	$K_{I ONP}$	F	0 (1T)	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y competitiva por galactosa (18)	k_2	F	+	No pasa. SQR=0,74 (1°)
	K_M	B +	+	
	K_{Igal}	B +	+	
	$K_{I ONP}$	B +	+	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (19)	k_2	F	+	No pasa. SQR=1,49 (9°)
	K_M	F	+	
	K_{Igal}	F	+	
	$K_{I ONP}$	- 2	0 (1T)	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (20)	k_2	F	+	No pasa. SQR=0,80 (4°)
	K_M	B +	+	
	K_{Igal}	F	+	
	$K_{I ONP}$	B +	+	

Clave: Criterios físicos:

F fluctua ; **S** sube; **B** baja (según aumenta la temperatura)

- Parámetro negativo, le sigue el número de veces que lo es con ese modelo

Criterios estadísticos:

0 incluye el cero en el intervalo de confianza, le sigue el número de temperaturas en las que se da la circunstancia con ese modelo

+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.41. - Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, T como variable)

MODELO	Orden 1 (1)	Michaelis-Menten simple (2)	Michaelis-Menten con inhibición por ONPG (3)
Ln k_0	34,56 ± 0,87	29,99 ± 1,20	29,45 ± 12,45
E_a/R	12687 ± 136	11310 ± 342	10569 ± 6582
Ln K_{M0}	-	26,53 ± 6,40	25,48 ± 16,40
E_{aM}/R	-	9651 ± 2060	9826 ± 8964
Ln K_{I0}	-	-	9,53 ± 12,38
E_{aI}/R	-	-	5649 ± 6927
SQR	4,98	3,85	3,79
F	1478	1357	698

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP (4)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP (5)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP (6)
Ln k_0	29,33 ± 2,32	32,90 ± 1,92	30,71 ± 2,32
E_a/R	10975 ± 700	12058 ± 5644	11413 ± 684
Ln K_{M0}	26,53 ± 11,00	26,54 ± 7,24	26,53 ± 5,42
E_{aM}/R	9651 ± 3600	9651 ± 2142	9651 ± 1698
Ln K_{I0}	10,04 ± 6,76	-36,92 ± 6,40	7,16 ± 7,29
E_{aI}/R	5139 ± 2000	-8636 ± 1900	234 ± 2174
SQR	2,40	2,60	2,85
F	1050	1039	896

Tabla 3.42.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis* en disolución. (*Método integral, regresión no lineal, T como variable*)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)
$\ln k_0$	29,46 ± 1,20	29,78 ± 1,20	29,45 ± 1,18
E_a/R	11128 ± 346	11226 ± 354	11122 ± 354
$\ln K_{M0}$	26,53 ± 26,05	26,41 ± 6,96	26,96 ± 4,20
E_{aM}/R	9649 ± 8520	9678 ± 2000	9653 ± 1244
$\ln K_{I0}$	12,24 ± 8,96	-25,97 ± 8,16	11,85 ± 9,30
E_{aI}/R	4534 ± 2618	-6642 ± 2404	4409 ± 2746
SQR	3,06	3,26	3,08
F	856	809	851

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y competitiva por galactosa (12)	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (13)	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (14)
$\ln k_0$	28,25 ± 10,52	29,12 ± 10,14	29,65 ± 10,16
E_a/R	10878 ± 2742	10888 ± 2634	10527 ± 2289
$\ln K_{M0}$	24,65 ± 9,30	26,53 ± 8,32	24,56 ± 10,22
E_{aM}/R	9069 ± 2600	9652 ± 2564	9121 ± 2750
$\ln K_{I_{gal}0}$	11,42 ± 7,60	-25,48 ± 8,24	14,25 ± 7,89
$E_{aI_{gal}}/R$	4429 ± 2260	-6333 ± 2843	6821 ± 4523
$\ln K_{I_{ONP}0}$	8,02 ± 7,14	10,16 ± 7,96	9,89 ± 4,96
$E_{aI_{ONP}}/R$	4503 ± 2164	5183 ± 1732	5125 ± 1875
SQR	1,56	1,76	1,83
F	1049	947	1037

Tabla 3.43.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis* en disolución. (*Método integral, regresión no lineal, T como variable*)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y competitiva por galactosa (15)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (16)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y no competitiva por galactosa (17)
Ln k_0	34,00 ± 13,20	32,62 ± 11,70	32,58 ± 12,80
E_a/R	12160 ± 4203	11939 ± 4282	11924 ± 4524
Ln K_{M0}	22,30 ± 13,52	26,53 ± 142,00	26,53 ± 15,06
E_{aM}/R	8141 ± 3700	9651 ± 38424	9651 ± 3428
Ln $K_{I gal 0}$	6,29 ± 6,14	-27,56 ± 5,60	-6,55 ± 6,00
$E_{aI gal}/R$	2893 ± 1704	-6956 ± 1700	-1119 ± 1640
Ln $K_{I ONP 0}$	-35,86 ± 14,22	-35,98 ± 15,40	-35,89 ± 15,04
$E_{aI ONP}/R$	-8085 ± 3982	-8313 ± 3502	-8280 ± 3826
SQR	1,28	1,82	1,80
F	1301	1137	1129

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y competitiva por galactosa (18)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (19)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (20)
Ln k_0	30,12 ± 22,10	30,41 ± 21,16	30,31 ± 22,16
E_a/R	11209 ± 4690	11296 ± 4234	11267 ± 4336
Ln K_{M0}	26,53 ± 12,06	26,53 ± 13,48	26,53 ± 11,84
E_{aM}/R	9651 ± 4182	9651 ± 4096	9651 ± 4126
Ln $K_{I gal 0}$	12,43 ± 12,20	-6,78 ± 13,32	-4,32 ± 6,89
$E_{aI gal}/R$	4736 ± 2106	-9888 ± 1850	-470 ± 2030
Ln $K_{I ONP 0}$	-6,77 ± 6,04	-25,29 ± 6,78	-6,70 ± 6,34
$E_{aI ONP}/R$	-95,32 ± 1762	-6295 ± 1900	-76,70 ± 1868
SQR	1050	953	948
F	1,94	2,14	2,14

Tabla 3.44.- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis*.
Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	Ln k_0	+		Pasa. SQR=4,98 (18°)
	E_a/R	+	> 0	
Michaelis-Menten simple (2)	Ln k_0	+		Pasa. SQR=3,85 (17°)
	E_a/R	+	> 0	
	Ln K_M	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición por ONPG (3)	Ln k_0	+		No pasa. SQR=3,79 (16°)
	E_a/R	+	> 0	
	Ln K_M	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	Ln K_I	0		
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP (4)	E_{aI}/R	0	> 0	
	Ln k_0	+		Pasa. SQR=2,40 (10°)
	E_a/R	+	> 0	
	Ln K_M	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Ln K_I	+			
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por ONP (5)	E_{aI}/R	+	> 0	
	Ln k_0	+		Pasa. SQR=2,60 (11°)
	E_a/R	+	> 0	
	Ln K_M	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Ln K_I	+			
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP (6)	E_{aI}/R	+	< 0	
	Ln k_0	+		No pasa. SQR=2,85 (12°)
	E_a/R	+	> 0	
	Ln K_M	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Ln K_I	0			
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	E_{aI}/R	0	< 0 aprox. 200	
	Ln k_0	+		Pasa. SQR=3,06 (15°)
	E_a/R	+	> 0	
	Ln K_M	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Ln K_I	+			
	E_{aI}/R	+	> 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
> 0 Parámetro positivo
Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
+ pasa
Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.44(cont.).- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por galactosa (9)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=3,26 (14°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=3,08 (13°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y competitiva por galactosa (12)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,59 (1°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y incompetitiva por galactosa (13)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=1,76 (4°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	< 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
Michaelis- Menten con inhibición competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (14)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,63 (3°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	< 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI \text{ ONP}}/R$	+	> 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo

> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza

+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.44(cont.).- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por ONP y competitiva por galactosa (15)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=1,59 (2°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI \text{ ONP}}/R$	+	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por ONP y incompetitiva por galactosa (16)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,82 (6°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	< 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI \text{ ONP}}/R$	+	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición incompetitiva por ONP y no competitiva por galactosa (17)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,80 (5°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	0	< 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI \text{ ONP}}/R$	+	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y competitiva por galactosa (18)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,94 (7°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI \text{ ONP}}/R$	0	< 0 (muy bajo)	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y incompetitiva por galactosa (19)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=2,14 (8°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	< 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI \text{ ONP}}/R$	+	< 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
> 0 Parámetro positivo
Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
+ pasa
Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.44(cont.).- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *K. fragilis*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (20)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=2,14 (9°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{m1}$	+		
	E_{am}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{i1}$	0		
	E_{ai1}/R	0	< 0	
	$\text{Ln } K_{i2}$	+		
	E_{ai2}/R	0	< 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo

> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza

+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

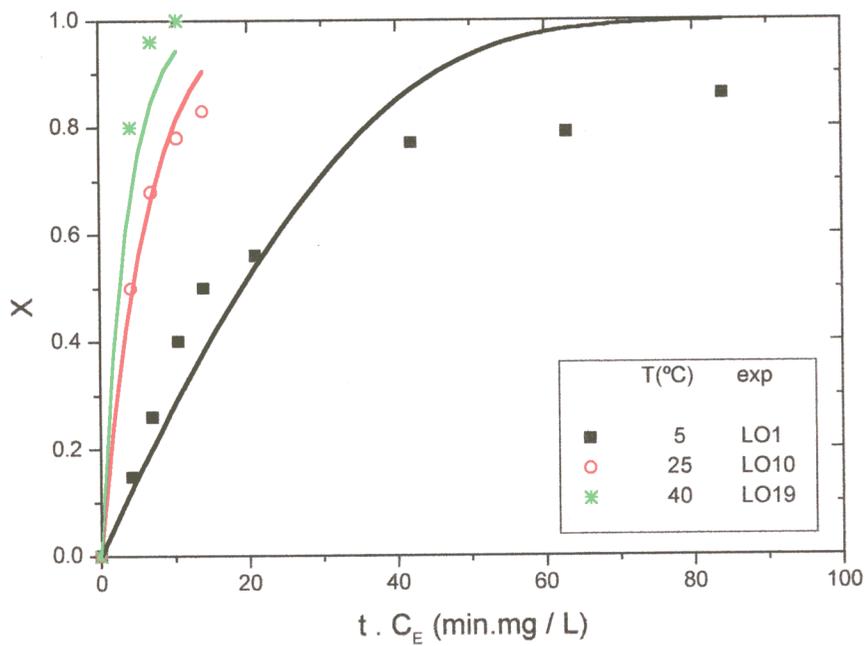


Figura 3.27.- Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la temperatura. $C_{ONPG\ 0}=0,25\text{ g/L}$, $C_{gal\ 0}=0\text{ g/L}$, $C_{ONP\ 0}=0\text{ g/L}$.

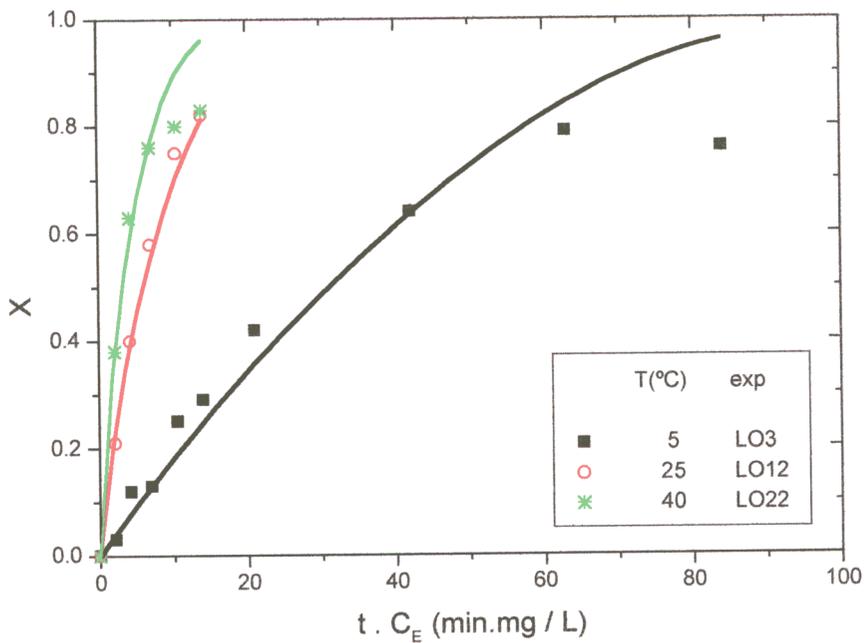


Figura 3.28.- Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la temperatura. $C_{ONPG\ 0}=0,5\text{ g/L}$, $C_{gal\ 0}=0\text{ g/L}$, $C_{ONP\ 0}=0\text{ g/L}$.

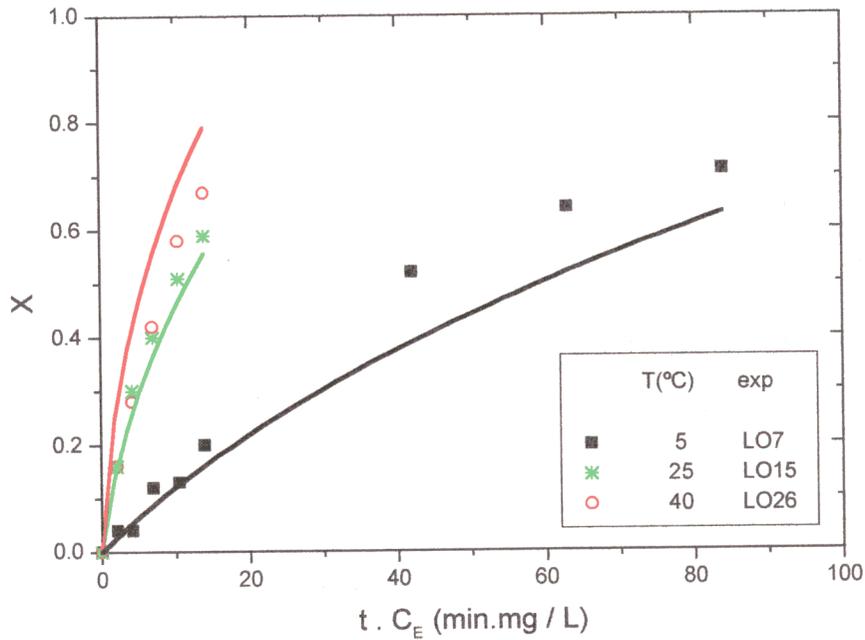


Figura 3.29.- Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la temperatura. $C_{ONPG_0}=1$ g/L, $C_{gal_0}=0$ g/L, $C_{ONP_0}=0$ g/L.

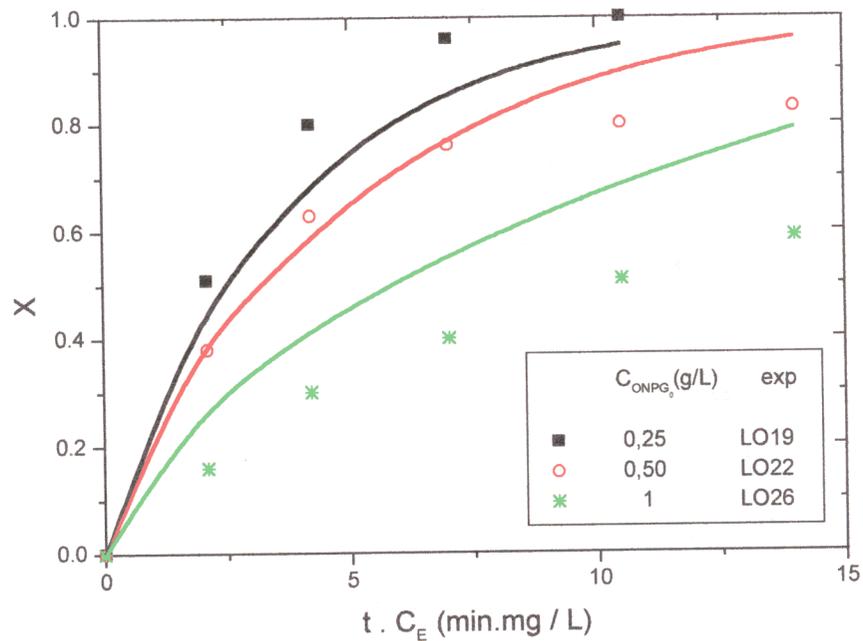


Figura 3.30. - Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de ONPG. $T=40^{\circ}C$, $C_{gal_0}=0$ g/L, $C_{ONP_0}=0$ g/L.

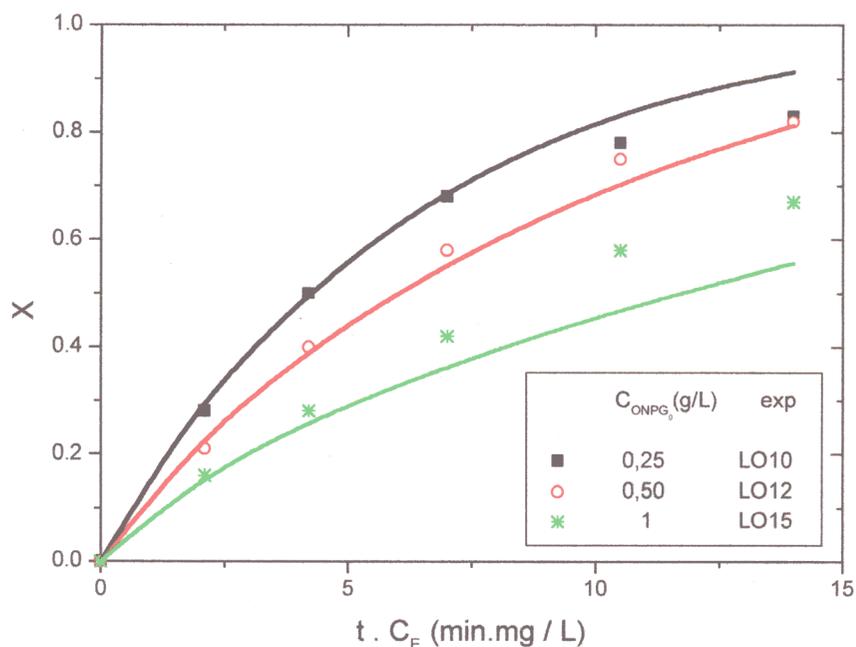


Figura 3.31. - Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de ONPG. $T=25^{\circ}C$, $C_{gal\ 0}=0$ g/L, $C_{ONP\ 0}=0$ g/L.

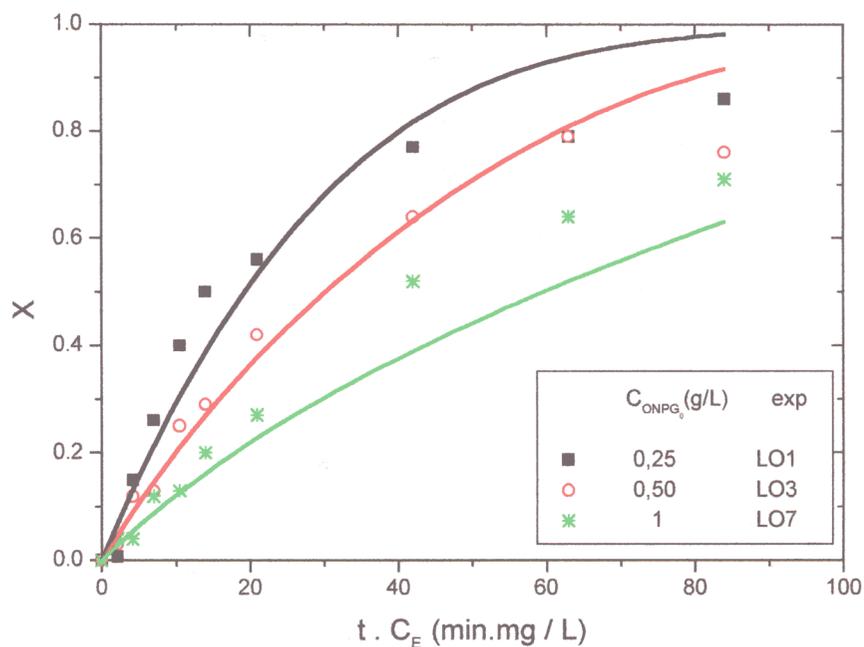


Figura 3.32. - Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de ONPG. $T=5^{\circ}C$, $C_{gal\ 0}=0$ g/L, $C_{ONP\ 0}=0$ g/L.

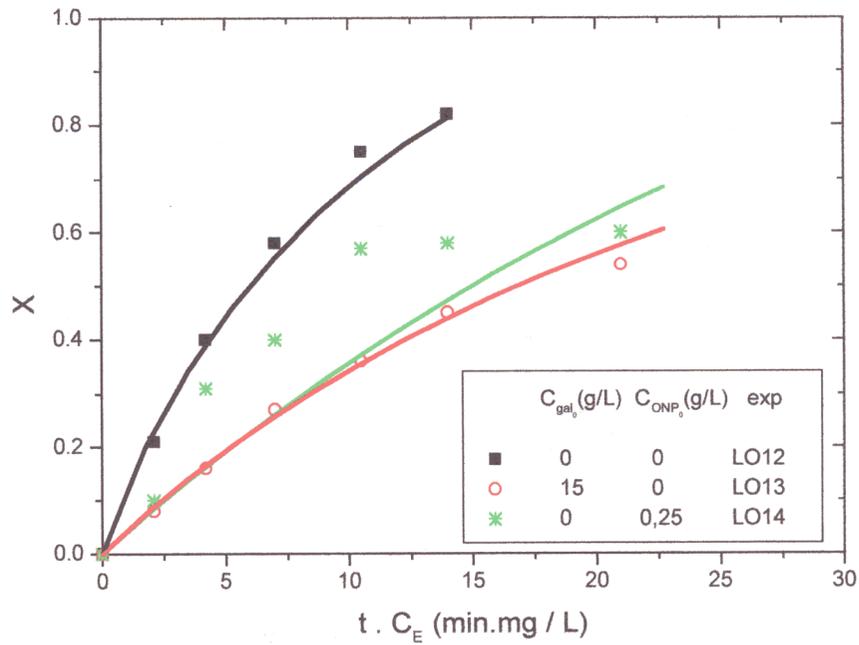


Figura 3.33. - Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de galactosa y ONP. $T=40^{\circ}C$, $C_{ONPG_0}=0,5g/L$.

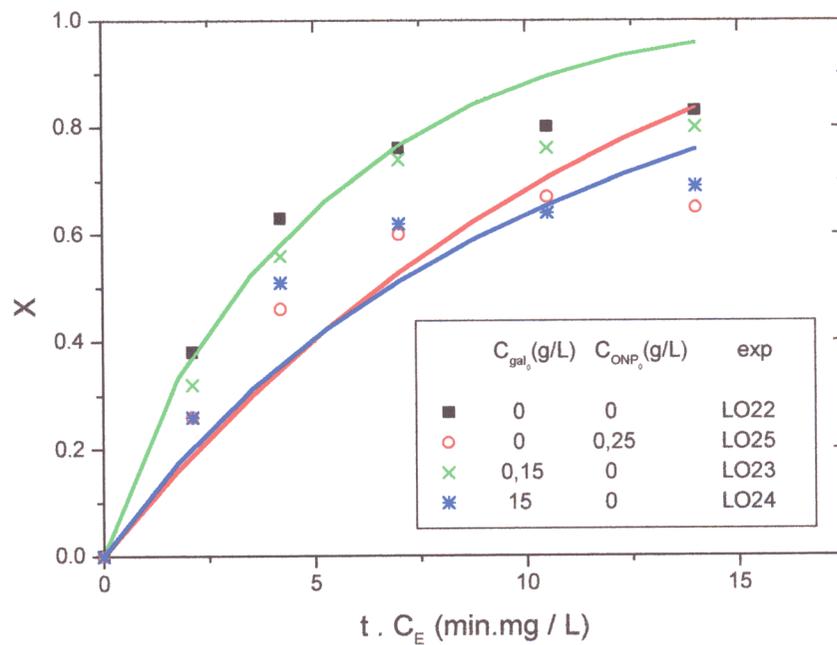


Figura 3.34. - Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de galactosa y ONP. $T=25^{\circ}C$, $C_{ONPG_0}=0,5g/L$.

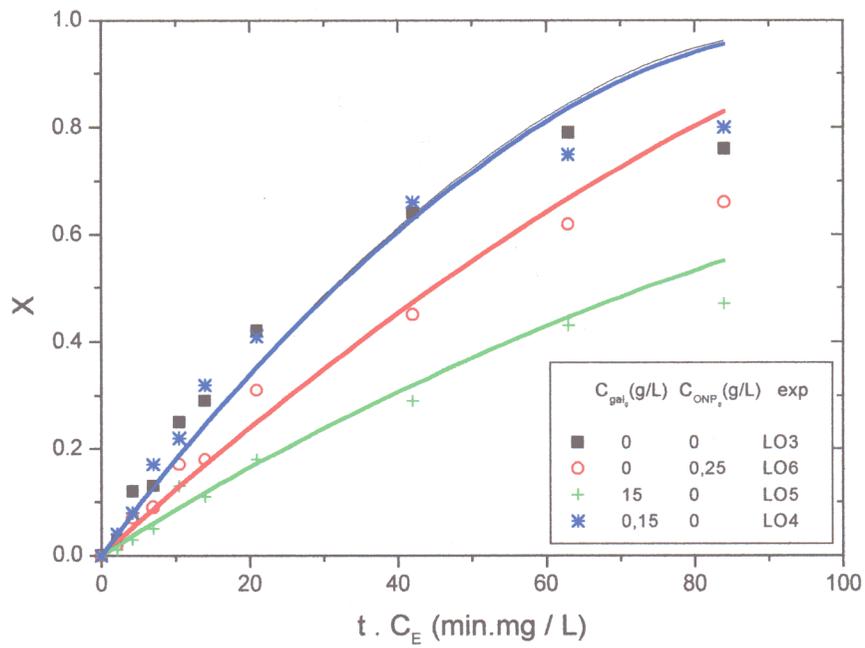


Figura 3.35. - Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de ONPG con la enzima de *K. fragilis*: Influencia de la concentración inicial de galactosa y ONP. $T=5^{\circ}C$, $C_{ONPG_0}=0,5g/L$.

3.3. - MODELOS CINÉTICOS DE LAS REACCIONES DE HIDRÓLISIS CON β -GALACTOSIDASA DE *Escherichia coli* EN DISOLUCIÓN

También se han estudiado las reacciones de hidrólisis de lactosa y de ONPG con una β -galactosidasa de *E. coli*, descrita en el apartado 2.1.1. Al igual que con la enzima de *K. fragilis*, se han realizado unos experimentos previos para determinar las condiciones idóneas de actividad y estabilidad de la enzima y, posteriormente, se ha llevado a cabo el estudio cinético de las reacciones de hidrólisis citadas.

3.3.1.- Experimentos previos

Estos experimentos se han realizado con el objeto de conocer como influyen ciertas variables intrínsecas del medio en la actividad y estabilidad de la enzima. Es necesario establecer en qué condiciones la enzima es activa y estable, al menos durante el tiempo que duran los experimentos cinéticos, antes de proceder al análisis del modelo cinético.

Para los experimentos de hidrólisis de lactosa se empleó el tampón BM, cuya composición se detalla en el apartado 2.2.2. Se utilizó como tampón para los experimentos de hidrólisis de ONPG el tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0 con $MgCl_2$ 1 mM y mercaptoetanol 5 mM, denominado tampón BP, ya elegido para la enzima de *K. fragilis* (apartado 3.2.1.1). De hecho, este tampón está recomendado en la literatura para la enzima de *E. coli*, excepto que el fosfato utilizado es sódico, no potásico.

Se realizaron varios experimentos para observar cuál es la influencia de varios cationes metálicos sobre la actividad de la enzima de *E. coli*. Estos cationes se añadieron al tampón BP seleccionado en una concentración 0,1 mM, utilizando como blanco el tampón BP sin añadirle ningún catión. El resultado de estos experimentos de medida de actividad se puede ver en la Figura 3.36. En dicha figura se observa que la β -galactosidasa de *E. coli* es escasamente activada por casi todos los iones, excepto el manganeso, que logra activarla un 15 %.

Influencia del pH y del tampón seleccionado en la actividad de la enzima

Se ha estudiado el efecto del pH sobre la actividad de la enzima para determinar el pH óptimo para esta enzima, tanto en la hidrólisis de ONPG como en la de lactosa, empleando tampones BP y BM. La forma de proceder ya se ha explicado en los apartados 2.2.4.1. y 3.2.1.2 para la enzima de *K. fragilis*.

En las Figuras 3.37 y 3.38 se representa la variación de la velocidad inicial con el pH en la hidrólisis de lactosa y ONPG, respectivamente, empleando en ambos casos tampones BM y BP. En el caso de la enzima procedente de *E. coli*, se observa que, en la hidrólisis de lactosa, la actividad de la enzima en BP es mayor que en BM y que el pH óptimo es aproximadamente 6,5 en ambos casos (Figura 3.37). En la Figura 3.38 puede verse que, si se utiliza ONPG como sustrato, el pH óptimo podría depender del tampón empleado, pero no la actividad máxima: con BM, el pH óptimo ronda el valor de 7,0 y con BP, se aproxima a 7,5. Como se puede observar, el pH óptimo varía con el sustrato utilizado.

Influencia del pH en la estabilidad de la enzima

La estabilidad de la enzima con el pH se ha estudiado de modo análogo a como se hizo con la enzima de *K. fragilis* en el punto 3.3.1.3, realizando una serie de experimentos siguiendo el protocolo descrito en el punto 2.2.4.3. La enzima de *E. coli* resiste mejor el pH ácido que la de *K. fragilis* y su actividad se conserva mejor a pH levemente básico, pH 8, como se puede observar en la Figura 3.39.

Influencia de la temperatura en la estabilidad de la enzima

Para analizar la influencia de la temperatura en la estabilidad de la enzima de *E. coli* se han llevado a cabo experimentos a 40, 45, 50 y 55°C, utilizando para medir la actividad de la enzima la reacción estándar de hidrólisis de ONPG en BP. Para ello se añaden 50 ml de una disolución de 50 g/L de lactosa en BM a un Erlenmeyer con una concentración de enzima de 4,66 mg/L, se van tomando muestras a diferentes tiempos para medir la actividad de la enzima. Se sigue el procedimiento descrito en el apartado

2.2.1 y en el 3.2.1.4. En la Figura 3.40 se han representado los resultados obtenidos de actividad residual vs tiempo.

De los resultados mostrados en la Figura 3.40 para la β -galactosidasa de *E. coli* se deduce que la temperatura máxima que debe emplearse en los estudios cinéticos es de 40°C, A esta temperatura la enzima apenas pierde actividad, al menos en un intervalo de tiempo de 5 horas.

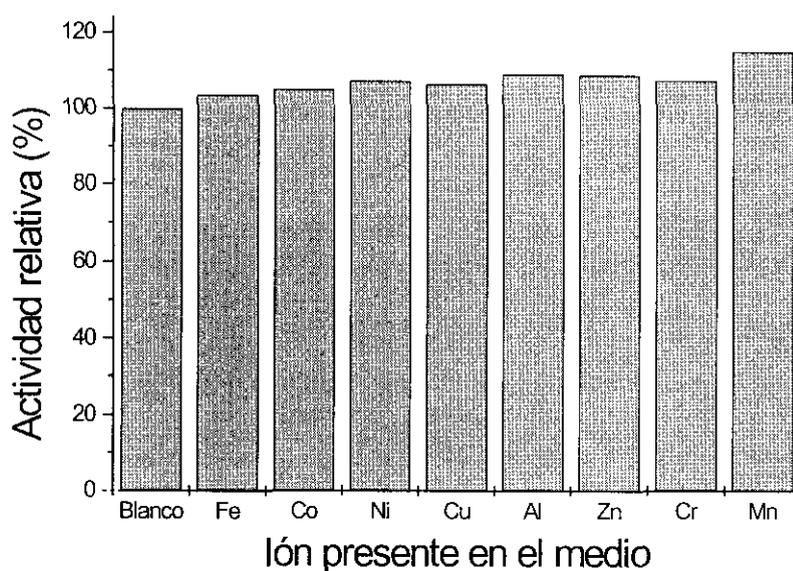


Figura 3.36.- Actividad de las enzimas frente a distintos iones divalentes. Actividad residual vs ión añadido a BP.

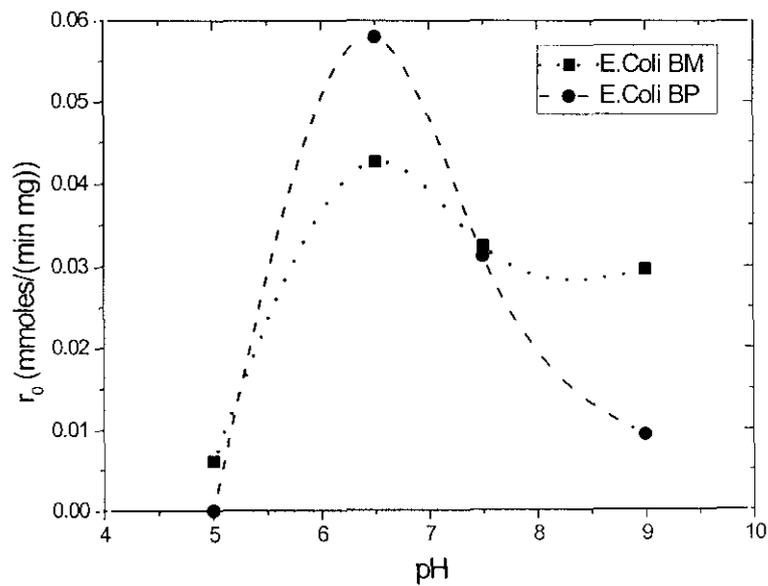


Figura 3.37.- Efecto del pH en la hidrólisis de lactosa por β -galactosidasa de *E. coli*. Velocidad inicial vs pH en distintos tampones. $T=40^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{lac}0}=50 \text{ g/L}$; $C_{\text{E}}=7 \text{ mg/L}$

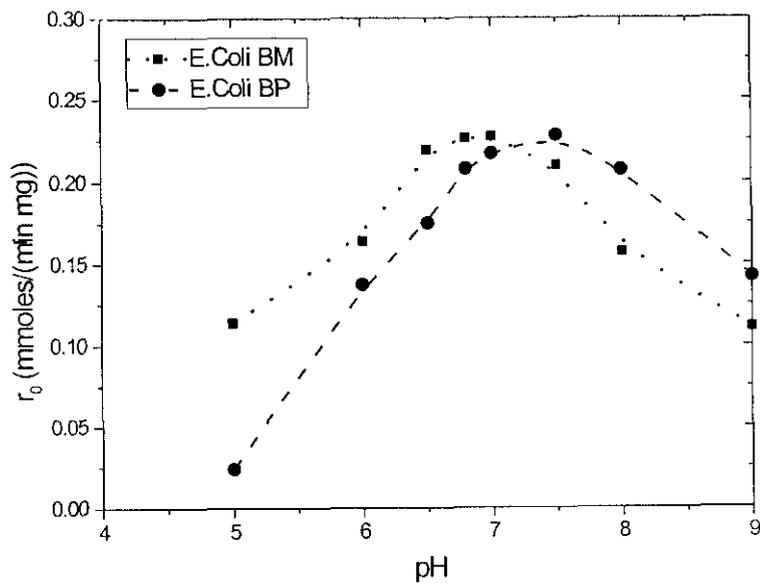


Figura 3.38.- Efecto del pH en la hidrólisis de ONPG por β -galactosidasa de *E. coli*. Velocidad inicial vs pH en distintos tampones. $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG}0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_{\text{E}}=0,7 \text{ mg/L}$

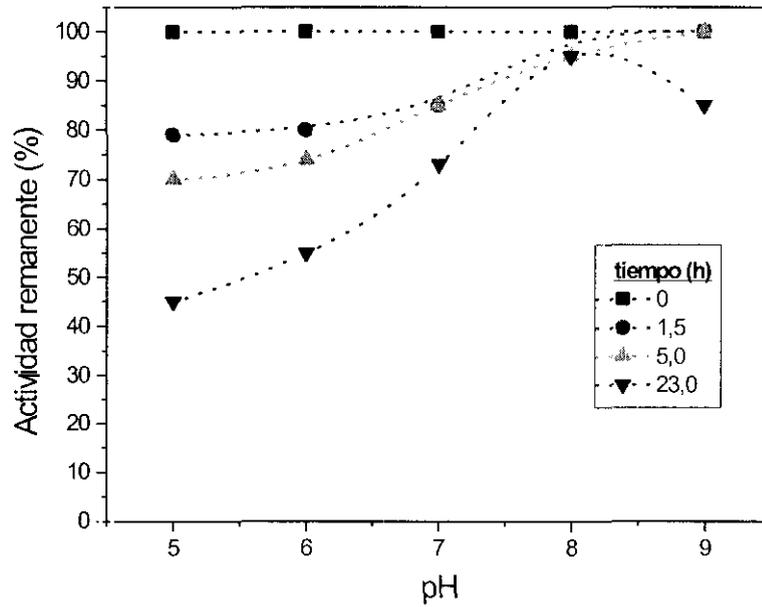


Figura 3.39.- Efecto del pH en la estabilidad de β -galactosidasa de *E. coli*. Actividad residual vs pH en BP.

Medida de actividad estándar: $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG } 0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_E=0,7 \text{ mg/L}$

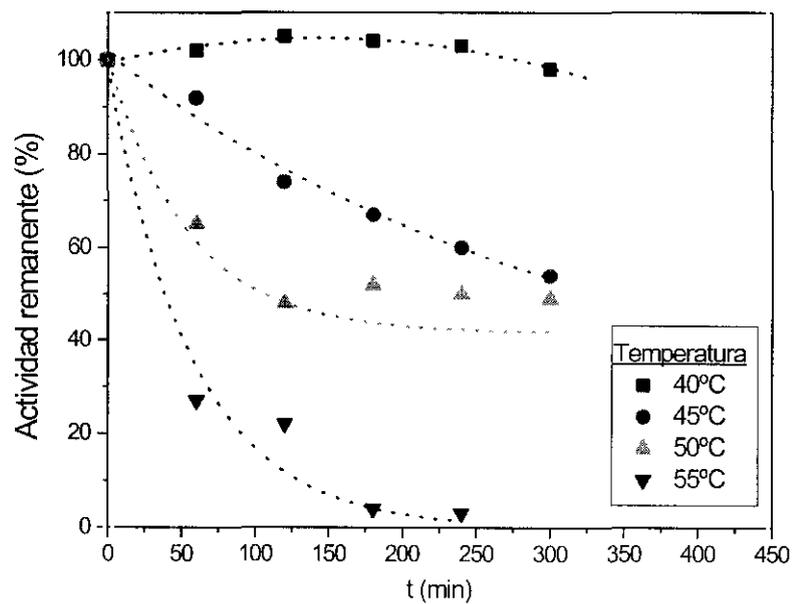


Figura 3.40.- Estabilidad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* frente a la temperatura. Actividad residual vs tiempo de incubación.

Medida de actividad estándar: $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG } 0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_E=0,7 \text{ mg/L}$.

3.3.2.- Modelo cinético de la hidrólisis de lactosa

Una vez seleccionados los intervalos de pH y temperatura óptimos para que la actividad de la enzima sea alta y se mantenga durante un periodo de tiempo razonable, se ha llevado a cabo el estudio de la cinética de la hidrólisis de lactosa en BM con β -galactosidasa de *E. coli*. Para ello, se han realizado experimentos a temperaturas de reacción entre 5 y 40°C, concentraciones de lactosa entre 25 y 75 g/L, concentraciones de enzima entre 2,3 y 7 g/L y concentraciones iniciales de productos (glucosa y galactosa) entre 0 y 15 g/L.

3.3.2.1.- Resultados experimentales

Los experimentos realizados se recogen en las Tablas 3.45 a 3.47 y los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 3.45 a 3.50, como conversión de lactosa vs. el producto $t \cdot C_E$.

Tabla 3.45.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 5°C con la β -galactosidasa de *E. coli*.

EXP	CL1	CL2	CL3
$C_{lac}(g/L)$	50	50	50
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0
$C_{glu}(g/L)$	0	15	0
$C_E(mg/L)$	2,33	3,5	7
tiempo(min)	X_{lac}		
0	0	0	0
120	0,02	0	0,02
330	0,04	0,025	0,05
1260	0,12	0,12	0,26
1500	0,13	0,16	0,29
2730	0,13	0,21	0,43
3420	0,16	0,29	0,5

Tabla 3.46.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 25°C con la β -galactosidasa de *E. coli*.

EXP	CL4	CL5	CL6	CL7	CL8	CL9	CL10	CL11
$C_{lac}(g/L)$	25	50	50	50	75	50	50	50
$C_{gal}(g/L)$	0	15	0	0	0	0	15	0
$C_{glu}(g/L)$	0	0	15	0	0	0	0	15
$C_E(mg/L)$	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	7	7	7
tiempo(min)	X_{lac}							
0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	-	-	-	-	-	0,04	0,02	0,02
60	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,04	0,02	0,02
120	-	-	-	-	-	0,09	0,05	0,07
180	0,15	0,09	0,026	0,06	0,05	0,17	0,10	0,08
210	-	-	-	-	-	0,21	0,15	0,10
300	0,29	0,11	0,05	0,13	0,09	-	-	-
390	-	-	-	-	-	0,39	0,31	0,25
420	-	-	-	-	-	0,4	0,31	0,23
450	0,49	0,19	0,1	0,21	0,12	-	-	-
870	0,84	0,41	0,19	0,41	0,28	-	-	-
1080	0,91	0,50	0,29	0,51	0,32	-	-	-
1350	0,98	0,60	0,32	0,66	0,41	-	-	-

Tabla 3.47.- Resultados de la hidrólisis de lactosa a 40°C con la β -galactosidasa de *E. coli*.

EXP	CL12	CL13	CL14	CL15	CL16	CL17
$C_{lac}(g/L)$	50	50	75	50	50	25
$C_{gal}(g/L)$	0	15	0	0	0	0
$C_{glu}(g/L)$	0	0	0	0	15	0
$C_E(mg/L)$	3,5	3,5	3,5	7	7	7
tiempo(min)	X_{lac}					
0	0	0	0	0	0	0
30	0,03	0,01	0,01	0,12	0,09	0,21
60	0,08	0,04	0,02	0,24	0,17	0,45
120	0,21	0,13	0,05	0,44	0,30	0,87
180	0,3	0,24	0,14	0,62	0,41	0,98
240	0,39	0,35	0,19	0,76	0,52	0,97
300	0,51	0,50	0,28	0,88	0,61	0,90
360	0,61	0,56	0,35	0,91	0,65	-

3.3.2.2.- Análisis de las velocidades iniciales

El objeto del análisis de las velocidades iniciales es dar una idea de los modelos cinéticos que pueden ser más adecuados para explicar los resultados experimentales de la reacción en estudio. Sirve, por tanto, para realizar una discriminación cualitativa del modelo cinético.

Para calcular los valores de las velocidades iniciales, r_0 , en cada experimento, los datos C vs t se ajustan a una función y la velocidad inicial se obtiene por derivación analítica a $t=0$, como ya se indicó en el apartado 3.1.3.

En la Figura 3.41 se muestra el efecto de la concentración inicial de lactosa sobre la *velocidad inicial de reacción*. Se observa que r_0 apenas varía al aumentar la concentración inicial de lactosa. Este hecho sugiere que el orden neto para el sustrato es próximo a cero, al menos en el intervalo de concentraciones estudiado. Este efecto es más acusado al disminuir la temperatura. En el modelo de Michaelis-Menten, este hecho supondría que la constante K_M aumentaría al aumentar la temperatura.

La Figura 3.42 muestra la influencia de la adición de galactosa al comienzo de la reacción en la velocidad inicial. Se observa que la velocidad inicial de reacción disminuye cuando la concentración inicial de galactosa aumenta. Es decir, la galactosa tiene un efecto inhibitor. La pendiente de las rectas en la Figura 3.42 no varía con la temperatura. En la Figura 3.43 se observa el efecto que produce añadir glucosa al medio de reacción a tiempo cero sobre la velocidad inicial de reacción. Comparando las Figuras 3.42 y 3.43, se observa que la glucosa inhibe más que la galactosa. Para un mismo valor de concentración de galactosa y de glucosa, la velocidad de reacción disminuye más con la adición de glucosa. Además, la pendiente de las rectas de la Figura 3.43 disminuye al aumentar la temperatura. Por tanto, la inhibición debida a la glucosa disminuye con el aumento de temperatura y, por tanto, la constante de inhibición, $K_{I\text{ glu}}$, debería aumentar según aumenta la temperatura.

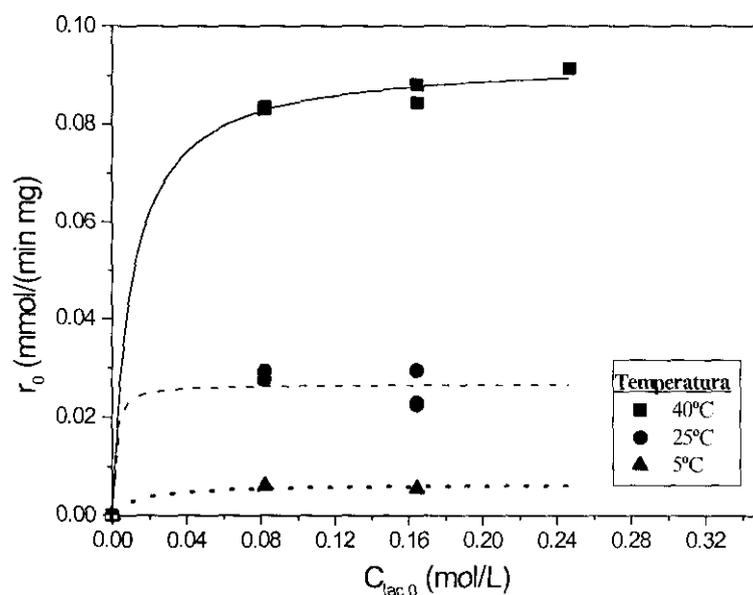


Figura 3.41. - Hidrólisis de lactosa con la enzima de *E.coli*: r_0 vs C_{lac} a varias temperaturas. $C_{gal\ 0} = 0$ g/L; $C_{glu\ 0} = 0$ g/L.

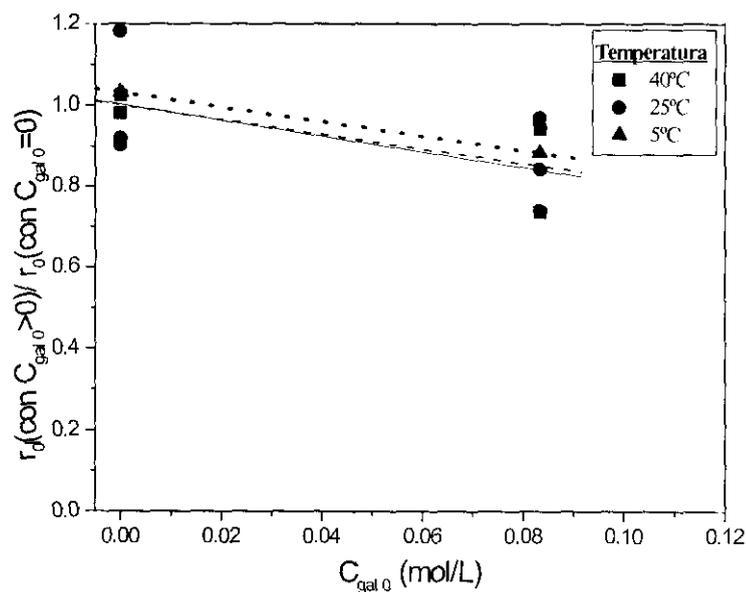


Figura 3.42. - Hidrólisis de lactosa con la enzima de *E.coli*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin galactosa inicial vs $C_{gal\ 0}$ a varias temperaturas. $C_{lac\ 0} = 50$ g/L; $C_{gal\ 0} = 0$ g/L.

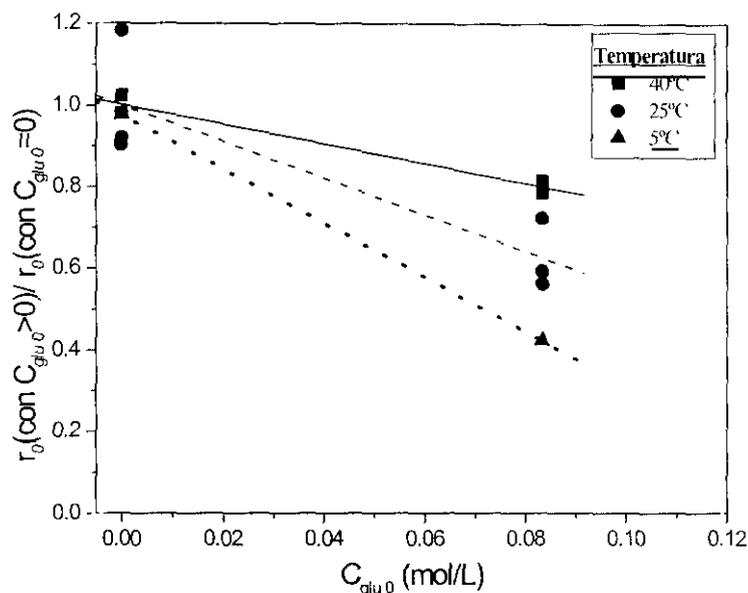


Figura 3.43. – Hidrólisis de lactosa con la enzima de *E.coli*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin glucosa inicial vs $C_{glu\ 0}$ a varias temperaturas. $C_{lac\ 0} = 50$ g/L; $C_{glu\ 0} = 0$ g/L.

3.3.2.3.- Discriminación del modelo cinético

El método utilizado para discriminar el modelo cinético es el método integral. Al analizar, por este método, los datos de las reacciones de hidrólisis de lactosa y ONPG con Lactozym, se concluyó que el procedimiento de ajustar los datos obtenidos a temperatura constante podía dar resultados no válidos para discriminar el modelo cinético, ya que carecía de fiabilidad estadística. En el estudio cinético empleando la enzima de *E. coli*, por tanto, no se aplicará el ajuste con la temperatura como constante, sino que se ajustarán todos los datos experimentales recogidos en las Tablas 3.45 a 3.47 con la temperatura como variable.

De acuerdo al análisis realizado de las velocidades iniciales, los modelos cinéticos a considerar deben tener en cuenta el efecto de inhibición de la glucosa, sin descartar la inhibición por galactosa. Los modelos analizados en primer lugar son los que se muestran en la Tabla 3.2, que consideran por separado la inhibición de cada producto. En este caso, P es glucosa o galactosa.

Los parámetros cinéticos de cada modelo se calculan mediante regresión no lineal acoplada a una integración numérica (Runge-Kutta), tal como se realizó en el punto 3.2.2.3. En las Tablas 3.48 y 3.49 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos para cada modelo, su intervalo de confianza y la suma de residuos generada (SQR). Los parámetros que no pasan los criterios físicos o estadísticos del punto 3.1.3.2 están sombreados. En la tabla 3.50 se resume el cumplimiento de los criterios estadísticos y físicos por parte de los parámetros cinéticos obtenidos en cada modelo.

Analizando la Tabla 3.50 se observa que los modelos 1, 2, 5 y 6 pasan los criterios estadísticos. Los criterios físicos los cumplen todos los modelos. Los modelos que consideran inhibición mixta por glucosa o por galactosa tienen varios parámetros sin significación estadística, pues incluyen el cero en sus intervalos de confianza. Por tanto, aunque el modelo 7 es el que menor residuo genera, se ha eliminado porque tiene 4 parámetros en cuyos intervalos de confianza se incluye el cero. El modelo que pasa los criterios estadísticos y físicos y genera el menor residuo ($SQR = 0,27$) es el modelo 6, aunque sin grandes diferencias respecto al modelo 5 ($SQR = 0,28$). En consecuencia, no se puede elegir en esta fase cuál es el modelo más adecuado entre los modelos 5 y 6.

Los modelos que incluyen inhibición por galactosa no cumplen los criterios estadísticos ya que incluyen el cero en el intervalo de confianza de la constante de inhibición. Por tanto, en adelante, no se considerarán aquellos modelos en los que haya inhibición por galactosa, lo que permite obviar los modelos de la Tabla 3.3.

3.3.2.4.- Discusión

Del análisis realizado de las velocidades iniciales se deduce que el modelo debe ser de tipo Michaelis-Menten con inhibición por glucosa y, posiblemente, la inhibición por galactosa no se puede eliminar completamente.

Al analizar los datos experimentales X vs $t \cdot C_E$ por el método integral y con la temperatura como variable, se deduce que puede despreciarse la inhibición por galactosa, ya que las constantes de inhibición de este producto no tienen significado estadístico.

Por el contrario, los modelos de la Tabla 3.32 que consideran inhibición por glucosa son los que dan parámetros estadísticamente más fiables y generan menor residuo, lo que confirma los resultados cualitativos obtenidos del análisis de las velocidades iniciales.

El modelo finalmente seleccionado ha sido el modelo 5 de la Tabla 3.2, aunque no se puede discriminar claramente entre este modelo y el modelo 6, ya que se obtienen residuos similares. Sin embargo, al comparar los resultados de aplicar los modelos que suponen inhibición acompetitiva e inhibición no competitiva por glucosa a los datos con la enzima inmovilizada y con la enzima libre, se escoge el modelo 5. Esta decisión se basa en que, en ambos casos, los modelos con inhibición competitiva tienen varios parámetros que incluyen el cero en el intervalo de confianza y el modelo con inhibición no competitiva por glucosa que sería adecuado en el caso de la enzima inmovilizada tiene dos parámetros que no pasan los criterios estadísticos. Sólo los modelos que incluyen inhibición acompetitiva por glucosa son adecuados física y estadísticamente tanto para la enzima libre como para la inmovilizada, por lo que serán los seleccionados.

El análisis de los residuos calculados con los valores obtenidos del modelo 5 y los datos experimentales se muestra en la Figura 3.44. Se puede observar que la diferencia entre el valor calculado y el experimental es menor del 10% en la mayor parte de los puntos, no observándose tendencia alguna en los residuos. El modelo cinético elegido se da en las ecuaciones [3.81 a] y [3.81 b]:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M + C_{lac} \left(1 + \frac{C_{glu}}{K_{Iglu}} \right)} \quad [3.81 a]$$

donde:

$$\begin{aligned} k_2 &= \exp\left(13,71 \pm 0,60 - \frac{7239 \pm 180}{T}\right) \\ K_M &= \exp\left(11,32 \pm 5,94 - \frac{4894 \pm 1840}{T}\right) \\ K_{Iglu} &= \exp\left(1,32 \pm 1,28 - \frac{1007 \pm 596}{T}\right) \end{aligned} \quad [3.81 b]$$

Con el modelo seleccionado (ecuaciones [3.81 a] y [3.81 b]) se han reproducido los resultados experimentales de las Tablas 3.45 a 3.47. Los valores calculados de la conversión de lactosa en función del producto $t \cdot C_E$ se muestran con línea continua en las Figuras 3.45 a 3.50.

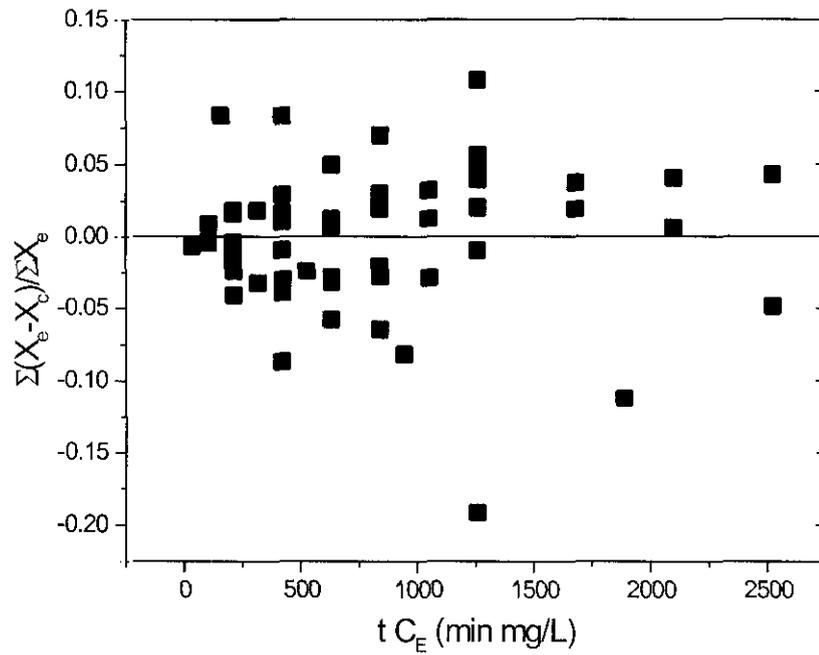


Figura 3.44.- Análisis de residuos comparando los datos experimentales con los valores calculados a partir del modelo 5.

Tabla 3.48.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli* en disolución. (*Método integral, regresión no lineal, T como variable*)

MODELO	Orden 1 (1)	Michaelis-Menten simple (2)	Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)
Ln k_0	15,45 ± 0,70	13,26 ± 0,43	14,58 ± 0,56
E_a/R	7168 ± 2250	7200 ± 1264	7301 ± 1720
Ln K_{M0}	-	29,48 ± 24,00	5,67 ± 9,60
E_{aM}/R	-	10754 ± 7420	2609 ± 2868
Ln K_{I0}	-	-	-0,78 ± 9,00
E_{aI}/R	-	-	490 ± 2750
SQR	2,91	0,76	0,68
F	846	1844	1353

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)
Ln k_0	13,24 ± 0,56	13,71 ± 0,60
E_a/R	7134 ± 1680	7239 ± 180
Ln K_{M0}	-0,12 ± 70000	11,32 ± 5,94
E_{aM}/R	5889 ± 1,2 · 10 ⁶	4894 ± 1840
Ln K_{I0}	1,02 ± 7,3 · 10 ⁴	1,32 ± 1,28
E_{aI}/R	6003 ± 1,2 · 10 ⁶	1007 ± 596
SQR	0,37	0,28
F	2463	3500

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)
Ln k_0	13,53 ± 0,58	13,33 ± 0,65
E_a/R	7189 ± 164	7136 ± 202
Ln K_{M0}	10,53 ± 5,80	18,99 ± 23,20
E_{aM}/R	4717 ± 1696	7506 ± 7428
Ln K_{I0}	2,25 ± 1,80	16,39 ± 28,82
E_{aI}/R	1253 ± 564	6065 ± 9012
Ln K'_{I0}	-	3,00 ± 3,65
E'_{aI}/R	-	1431 ± 1056
SQR	0,27	0,26
F	3513	3513

Tabla 3.49.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como variable)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)
$\ln k_0$	$13,37 \pm 0,30$	$13,18 \pm 0,62$
E_a/R	7231 ± 130	7175 ± 184
$\ln K_{M0}$	$14,01 \pm 4200$	$27,42 \pm 23,40$
E_{aM}/R	$8934 \pm 1,2 \cdot 10^9$	10109 ± 7400
$\ln K_{I0}$	$-10,79 \pm 4222$	$20,42 \pm 112,4$
E_{aI}/R	$623 \pm 1,2 \cdot 10^9$	5340 ± 30400
SQR	0,75	0,75
F	1271	1228

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)
$\ln k_0$	$13,47 \pm 0,54$	$13,21 \pm 0,54$
E_a/R	7247 ± 156	7247 ± 387
$\ln K_{M0}$	$9,91 \pm 34,40$	$9,80 \pm 47,12$
E_{aM}/R	4894 ± 10256	4894 ± 10256
$\ln K_{I0}$	$-92,13 \pm 1026$	$-88,13 \pm 1256$
E_{aI}/R	-2772 ± 32150	-2153 ± 45962
$\ln K'_{I0}$	-	$-96,56 \pm 2156$
E'_{aI}/R	-	-3245 ± 42158
SQR	0,75	0,70
F	1225	1248

Tabla 3.50.- Discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli*.
Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	$\ln k_0$	+		Pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR: 2,91 (11°)
Michaelis-Menten simple (2)	$\ln k_0$	+		Pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR: 0,76 (10°)
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición por lactosa (3)	$\ln k_0$	+		No pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR: 0,68 (5°)
	$\ln K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\ln K_I$	0		
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa (4)	$\ln k_0$	+		No pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR: 0,37 (4°)
	$\ln K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\ln K_I$	0		
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por glucosa (5)	$\ln k_0$	+		Pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR: 0,27 (2°)
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por glucosa (6)	$\ln k_0$	+		Pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR: 0,27 (3°)
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_I$	+		
Michaelis-Menten con inhibición mixta por glucosa (7)	$\ln k_0$	+		No Pasa.
	E_a/R	+	> 0	SQR: 0,26 (1°)
	$\ln K_M$	0		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_I$	0		
	E_{aI}/R	0	< 0	
	$\ln K_I$	0		
	E_{aI}/R	+	< 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.50.(cont.)- Discriminación de modelos: Hidrólisis de lactosa con la enzima de *E.coli*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR: 0,75 (7°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR: 0,75 (8°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR: 0,75 (9°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR: 0,70 (6°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	0		
	E_{aM}/R	0	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
	E_{aI}/R	0	< 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
	E_{aI}/R	0	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
	E_{aI}/R	0	> 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
> 0 Parámetro positivo
Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
+ pasa
Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

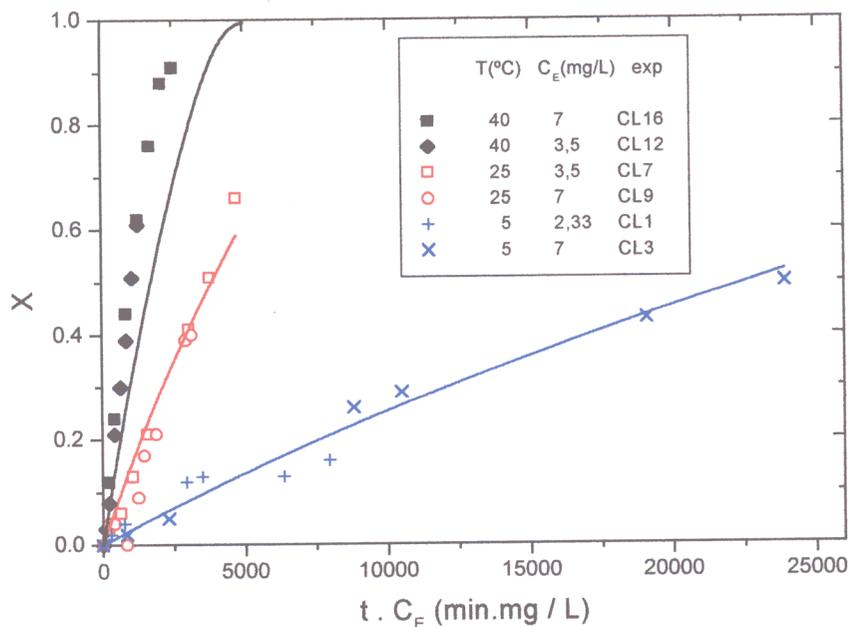


Figura 3.45. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli*: Influencia de la temperatura. $C_{lac\ 0}=50\text{g/L}$, $C_{gal\ 0}=0\text{g/L}$, $C_{glu\ 0}=0\text{g/L}$.

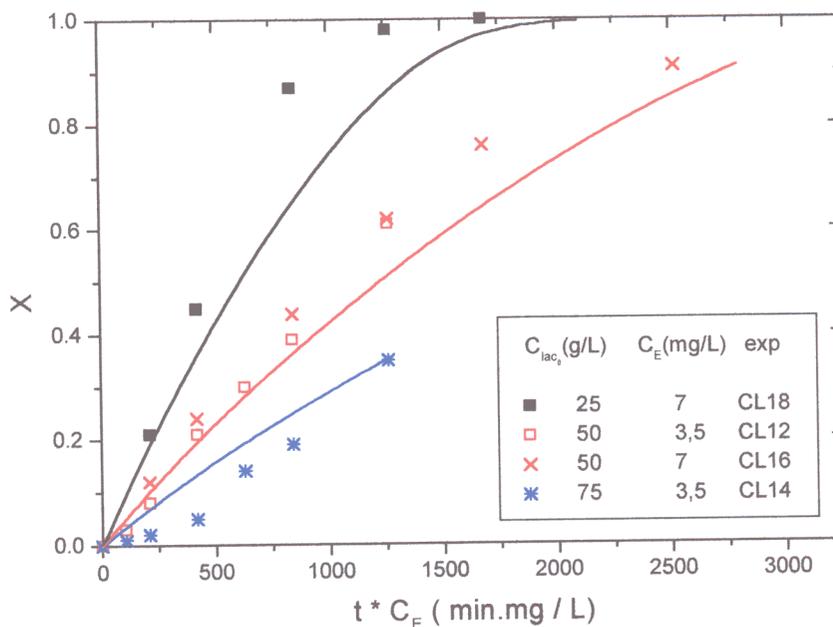


Figura 3.46. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración inicial de lactosa. T:40°C, $C_{gal\ 0}=0\text{g/L}$, $C_{glu\ 0}=0\text{g/L}$.

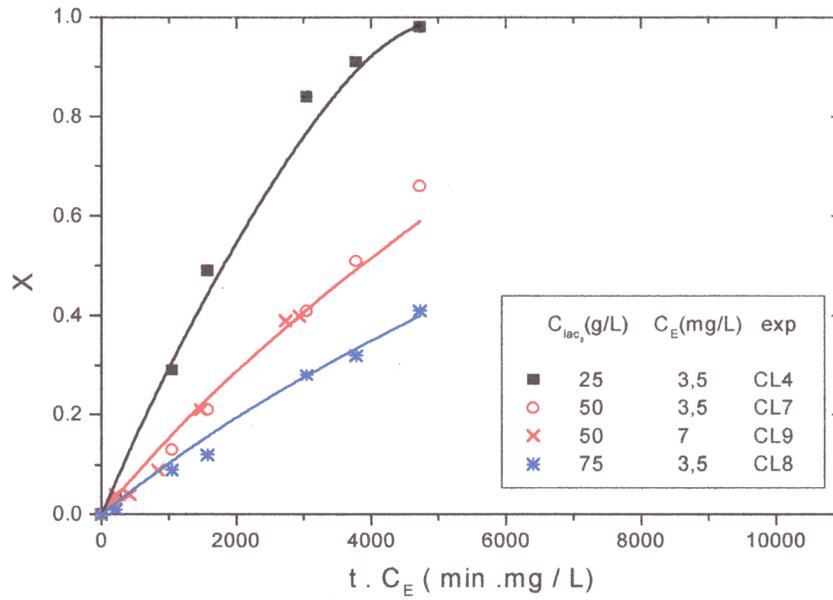


Figura 3.47. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración inicial de lactosa. T:25°C, $C_{gal\ 0}=0$ g/L, $C_{glu\ 0}=0$ g/L.

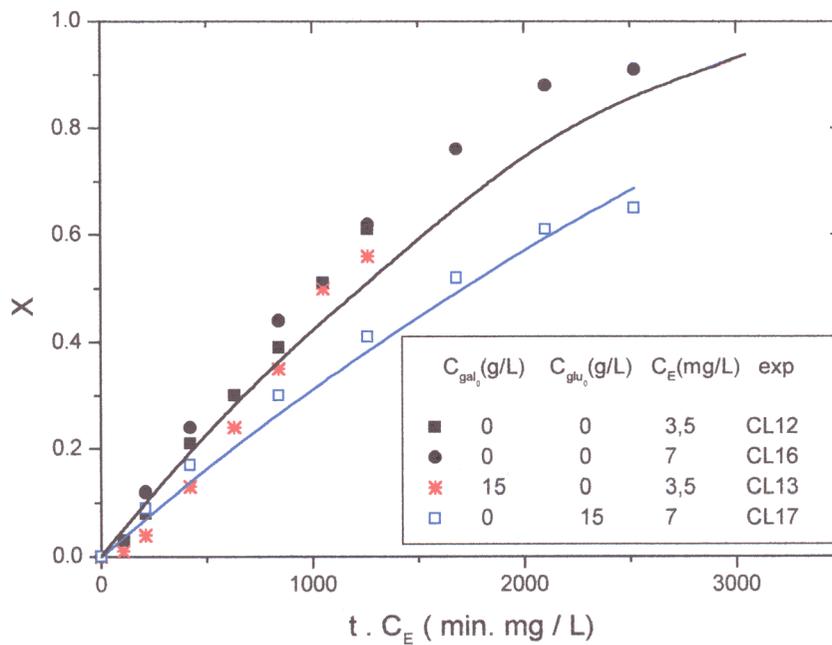


Figura 3.48. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración inicial de galactosa y de glucosa. T: 40°C, $C_{lac\ 0}=50$ g/L.

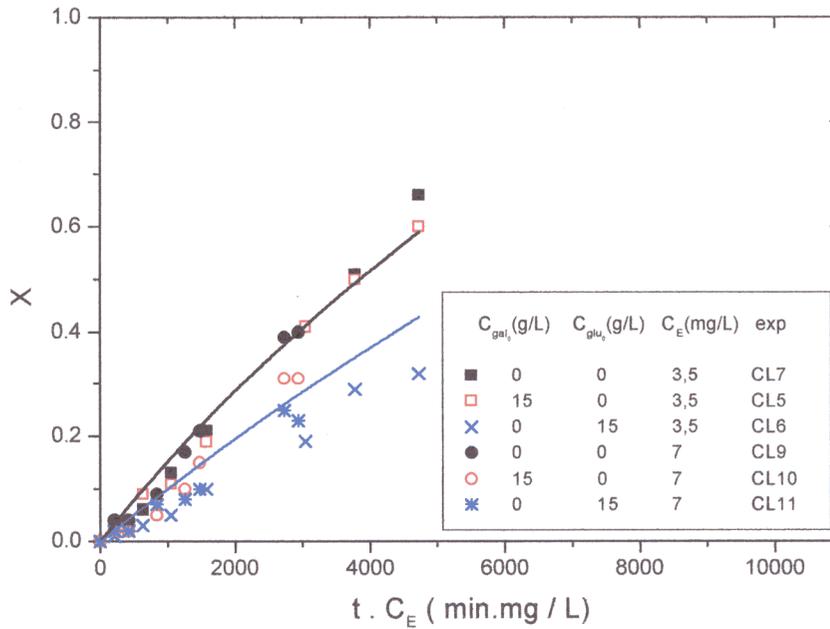


Figura 3.49. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración inicial de galactosa y de glucosa. T: 25°C, $C_{lac\ 0}=50$ g/L.

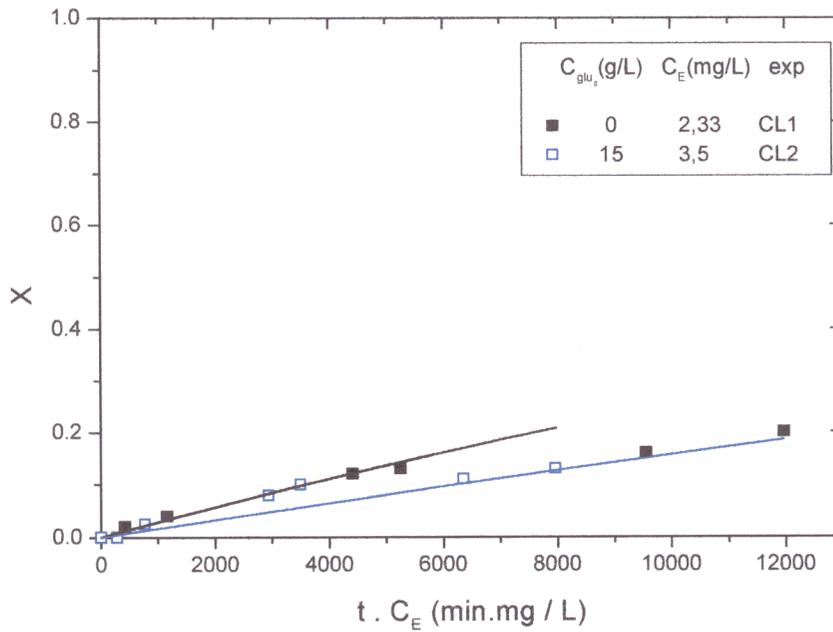


Figura 3.50. – Datos experimentales y su ajuste en la hidrólisis de lactosa con la enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración inicial de glucosa. T: 5°C, $C_{lac\ 0}=50$ g/L, $C_{gal\ 0}=0$ g/L.

3.3.3.- Modelo cinético de la hidrólisis de ONPG

El estudio cinético se ha realizado en las condiciones seleccionadas de pH (pH=7,0), composición del tampón BP (la seleccionada en el apartado 3.2.1) e intervalo de temperaturas (con una temperatura máxima de 40°C) para asegurar que hay una actividad elevada de la enzima y que esta es estable, al menos durante un tiempo superior al necesario para llevar a cabo cada experimento cinético.

Se ha variado la temperatura entre 5 y 40°C, la concentración de ONPG entre 0,25 y 1 g/L, la concentración inicial de galactosa entre 0 y 15 g/L y la de ONP entre 0 y 0,25 g/L. Se utilizó una concentración constante de enzima: 0,7 mg/L.

3.3.3.1.- Resultados experimentales

Los experimentos realizados, así como los resultados obtenidos, se muestran en las tablas 3.51 a 3.54. Los resultados de X vs t C_E se muestran en las figuras 3.56 a 3.64.

Tabla 3.51.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 5°C con la β-galactosidasa de *E. coli*.

EXP	CO1	CO2	CO3	CO4	CO5	CO6	CO7	CO8	CO9
C _{ONPG} (g/L)	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1
C _{gal} (g/L)	0	0,3	0	0,15	15	0	0	0,6	15
C _{ONP} (g/L)	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0
tiempo(min)	X _{ONPG}								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,06	0,06	0,04	0,04	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02
6	0,15	0,14	0,1	0,09	0,02	0,06	0,06	0,06	0,045
10	0,25	0,25	0,16	0,16	0,06	0,1	0,1	0,09	0,081
15	0,41	0,35	0,23	0,23	0,11	0,15	0,14	0,14	0,101
20	0,48	0,45	0,3	0,3	0,13	0,2	0,19	0,19	0,12
30	0,58	0,56	0,41	0,42	0,17	0,28	0,29	0,25	0,19
60	0,76	0,73	0,65	0,65	0,31	0,46	0,5	0,47	0,31
90	0,8	0,82	0,78	0,78	0,41	0,6	0,66	0,59	0,43
120	0,85	0,8	0,77	0,78	0,48	0,67	0,7	0,68	0,69

Tabla 3.52.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 25°C con la β -galactosidasa de *E. coli*.

EXP	CO10	CO11	CO12	CO13	CO14	CO15	CO1
$C_{ONPG}(g/L)$	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	1	1
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0	15	0	0	15
$C_{ONP}(g/L)$	0	0,05	0	0	0,25	0	0
tiempo(min)	X_{ONPG}						
0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,32	0,22	0,2	0,17	0,18	0,14	0,09
6	0,65	0,5	0,41	0,31	0,35	0,24	0,19
10	0,8	0,68	0,63	0,48	0,56	0,41	0,3
15	0,86	0,72	0,78	0,66	0,72	0,56	0,41
20	0,9	0,76	0,86	0,78	0,82	0,68	0,54
25	0,95	0,79	0,9	0,84	0,79	0,72	0,63

Tabla 3.53.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 30°C con la β -galactosidasa de *E. coli*.

EXP	CO17	CO18	CO19
$C_{ONPG}(g/L)$	0,25	0,5	1
$C_{gal}(g/L)$	0	0	0
$C_{ONP}(g/L)$	0	0	0
tiempo(min)	X_{ONPG}		
0	0	0	0
3	0,46	0,28	0,18
6	0,71	0,54	0,32
10	0,82	0,76	0,51
15	0,95	0,89	0,7
20	0,98	-	-

Tabla 3.54.- Resultados de la hidrólisis de ONPG a 40°C con la β -galactosidasa de *E. coli*.

EXP	CO20	CO21	CO22	CO23	CO24	CO25	CO26	CO27	CO28	CO29
$C_{ONPG}(g/L)$	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1
$C_{gal}(g/L)$	0	0,3	0	0	0,15	15	0	0	0,6	15
$C_{ONP}(g/L)$	0	0	0,5	0	0	0	0,25	0	0	0
tiempo(min)	X_{ONPG}									
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,58	0,59	0	0,39	0,4	0,26	0,26	0,24	0,22	0,12
6	0,81	0,81	0,48	0,64	0,65	0,5	0,45	0,45	0,39	0,23
10	0,84	0,83	0,63	0,8	0,8	0,62	0,62	0,64	0,56	0,32
15	0,89	0,8	0,72	0,82	0,82	0,64	0,72	0,72	0,7	0,51
20	0,96	0,79	0,82	0,8	0,81	0,69	0,75	0,73	0,72	0,62

3.3.3.2.- Análisis de las velocidades iniciales

Como ya se ha indicado en apartados anteriores, el análisis de las velocidades iniciales permite conocer la influencia de la concentración inicial de sustrato y de la concentración inicial de productos sobre la velocidad inicial de reacción y discriminar de modo cualitativo el tipo de modelo cinético a considerar.

En la Figura 3.51 se observa que, al aumentar la concentración de ONPG, la velocidad inicial de reacción, r_0 , aumenta, pero no linealmente. El aumento es proporcionalmente mayor cuanto mayor es la temperatura, lo que implica que a temperaturas bajas el orden neto del ONPG se aproxima a cero, mientras que, al aumentar la temperatura, se va acercando a uno. En un modelo de Michaelis-Menten esto supondría que la K_M aumenta con la temperatura, por lo que la afinidad de la enzima por el sustrato disminuye al aumentar esta variable.

El efecto de la adición de galactosa en la velocidad inicial se muestra en la Figura 3.52. Se observa que la galactosa sólo inhibe cuando está en el medio en una concentración mucho mayor que el ONPG. Es decir, la enzima tiene mucha más afinidad por el sustrato que por la galactosa. Al aumentar la temperatura, la inhibición es menor, lo que significa que $K_{I\ gal}$ aumenta con la temperatura.

En la Figura 3.53 se muestra el efecto sobre la velocidad inicial de otro producto, el o-nitrofenol (ONP). Comparando esta última figura con la Figura 3.52, se observa que la inhibición por ONP es considerablemente superior a la inhibición por galactosa, ya que el ONP inhibe cuando se encuentra en el medio en concentraciones similares a las del sustrato. De acuerdo a los resultados obtenidos, no se puede establecer una influencia clara de la temperatura sobre la inhibición por ONP.

De este análisis se deduce que el modelo cinético debería tener en cuenta la inhibición por ONP y por galactosa, cuando ésta se añade a concentraciones elevadas.

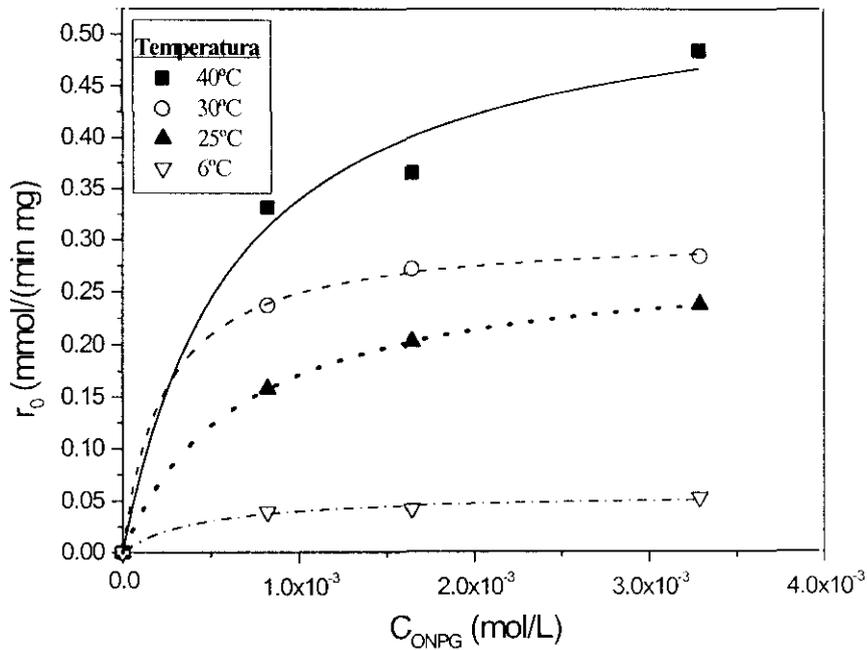


Figura 3.51. - Hidrólisis de ONPG con la enzima de *E.coli*: r_0 vs C_{ONPG} a varias temperaturas. $C_{gal0} = 0$ g/L; $C_{ONP0} = 0$ g/L.

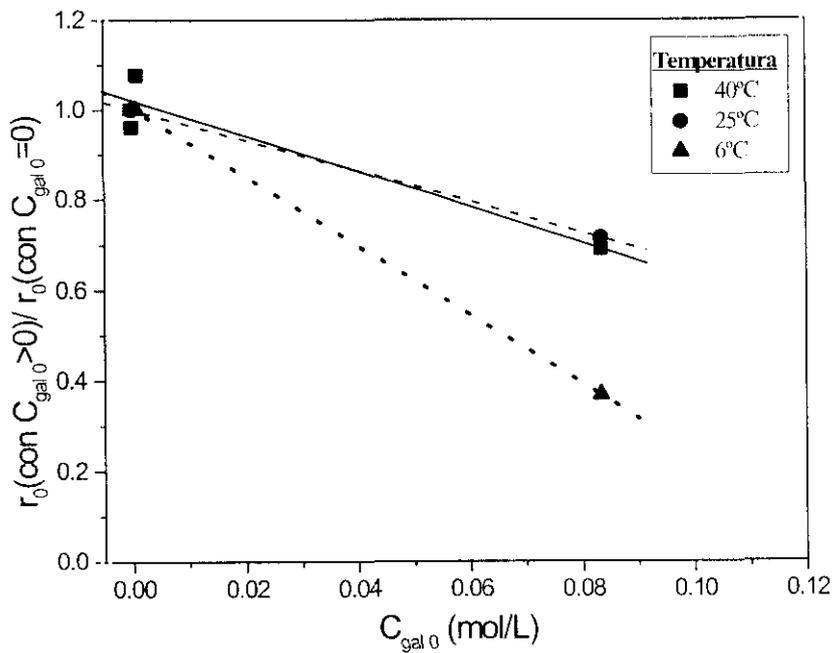


Figura 3.52. - Hidrólisis de ONPG con la enzima de *E.coli*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin galactosa inicial vs C_{gal0} a varias temperaturas. $C_{ONPG0} = 0,5$ g/L; $C_{ONP0} = 0$ g/L.

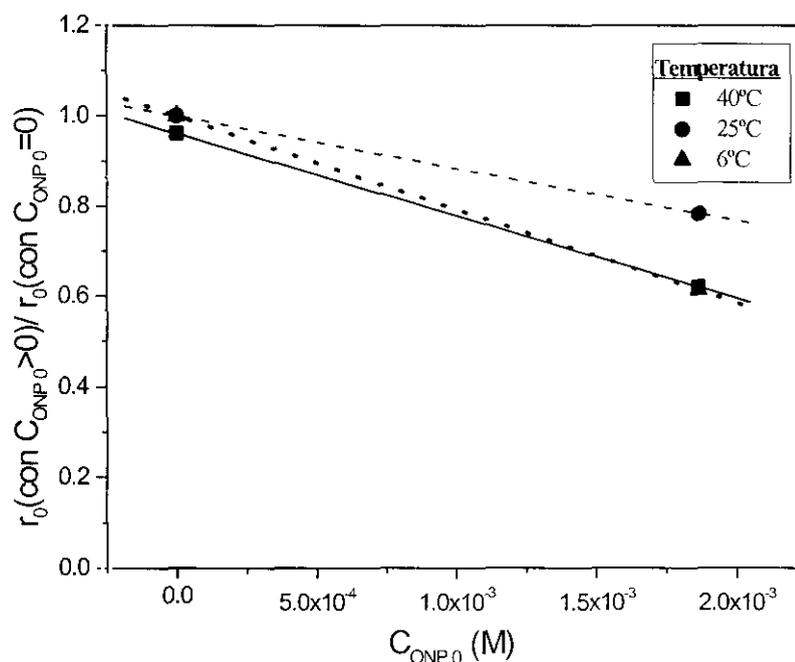


Figura 3.53. - Hidrólisis de ONPG con la enzima de *E.coli*: cociente entre las velocidades iniciales con y sin ONP inicial vs C_{ONP_0} a varias temperaturas. $C_{ONPG_0} = 0,5$ g/L; $C_{ONP_0} = 0$ g/L.

3.3.3.3.- Discriminación del modelo cinético

Como ya se indicó en el punto 3.3.2.3, se ha seleccionado el método integral como el más adecuado para la discriminación del modelo cinético, con el ajuste de los datos experimentales con la temperatura como variable. Se han considerado los modelos cinéticos de las Tablas 3.2 y 3.3. Los modelos que aparecen en la tabla 3.2 no tienen en cuenta la inhibición por sustrato o productos o consideran que, únicamente, el sustrato o un solo producto actúa como inhibidor. Los modelos de la Tabla 3.3 tienen en cuenta la inhibición conjunta por los dos productos de la hidrólisis. El ajuste de los datos de las Tablas 3.51 a 3.54 se realiza por regresión no lineal acoplada a una técnica numérica de integración (Runge-Kutta).

Los parámetros cinéticos obtenidos para los modelos de la Tabla 3.2, así como el residuo que genera cada modelo se recogen en las tablas 3.55 a 3.58. Los parámetros que no cumplen los criterios estadísticos o físicos del apartado 3.1.3.2 están sombreados en estas tablas. En la Tabla 3.59 muestra el grado de cumplimiento de los criterios estadísticos y físicos por los parámetros cinéticos.

Pasan los criterios estadísticos los modelos 1, 2, 4, 8, 9, 12, 13, 18 y 20. Los criterios físicos los pasan los modelos 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 18 y 20, los demás modelos tienen energías de activación excesivamente altas.

De los modelos cinéticos considerados, el que genera el menor residuo es el 18 (SQR= 1,08), el segundo modelo que mejor ajusta es el modelo 12 (SQR=1,18). El modelo 13 tiene un residuo próximo al del modelo 12 (SQR=1,20). En esta etapa no se puede discriminar entre ellos, porque los residuos de estos modelos son muy parecidos y los tres pasan los criterios estadísticos y físicos aplicados.

3.3.3.4.- Discusión

En el análisis de las velocidades iniciales se llegó a la conclusión de que el modelo cinético debería incluir inhibición por ONP y por galactosa, teniendo en cuenta que la inhibición por galactosa sólo se observa a concentraciones altas de la misma.

Del ajuste de los datos experimentales de las Tablas 3.54 a 3.57 a los modelos de las Tablas 3.2 y 3.3 se pueden seleccionar los modelos 12, 13 y 18, ya que generan los menores residuos y pasan los criterios impuestos. Estos modelos tienen en cuenta la *inhibición por los dos productos, lo que confirma los resultados del análisis de las velocidades iniciales.*

Se ha seleccionado el modelo 12, ya que tanto la K_M como la $K_{i\ gal}$ siguen la tendencia marcada en el análisis de las velocidades iniciales: las dos aumentan al *aumentar la temperatura. Por lo mismo, se desecha el modelo 13, que predice la tendencia contraria con la temperatura del parámetro $K_{i\ gal}$.*

En la Figura 3.54 se analizan los residuos calculados con los valores obtenidos del modelo 12 y los datos experimentales. La diferencia entre el valor calculado y el experimental es menor del 10% en la mayoría de los casos y dichas diferencias se distribuyen de forma aleatoria en torno al cero, sin mostrar tendencia alguna, por lo que el error debido al modelo no es sistemático. El modelo 12 se recoge en las ecuaciones [3.61 a] y [3.61 b]:

$$r = \frac{k_2 C_E C_{ONPG}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{ONP}}{K_{IONP}} \right) + C_{ONPG}} \quad [3.82 a]$$

donde:

$$\begin{aligned} k_2 &= \exp\left(18,20 \pm 4,28 - \frac{7878 \pm 1236}{T}\right) \\ K_M &= \exp\left(41,50 \pm 12,80 - \frac{14761 \pm 4100}{T}\right) \\ K_{Igal} &= \exp\left(9,78 \pm 6,04 - \frac{3799 \pm 1894}{T}\right) \\ K_{IONP} &= \exp\left(42,72 \pm 14,50 - \frac{15197 \pm 4580}{T}\right) \end{aligned} \quad [3.82 b]$$

En las figuras donde se muestra la conversión en función del t_{C_E} (Figuras 3.55 a 3.63) se muestran con líneas continuas los valores obtenidos de la reproducción de los resultados experimentales con el modelo seleccionado (ecuaciones [3.61 a] y [3.61 b]).

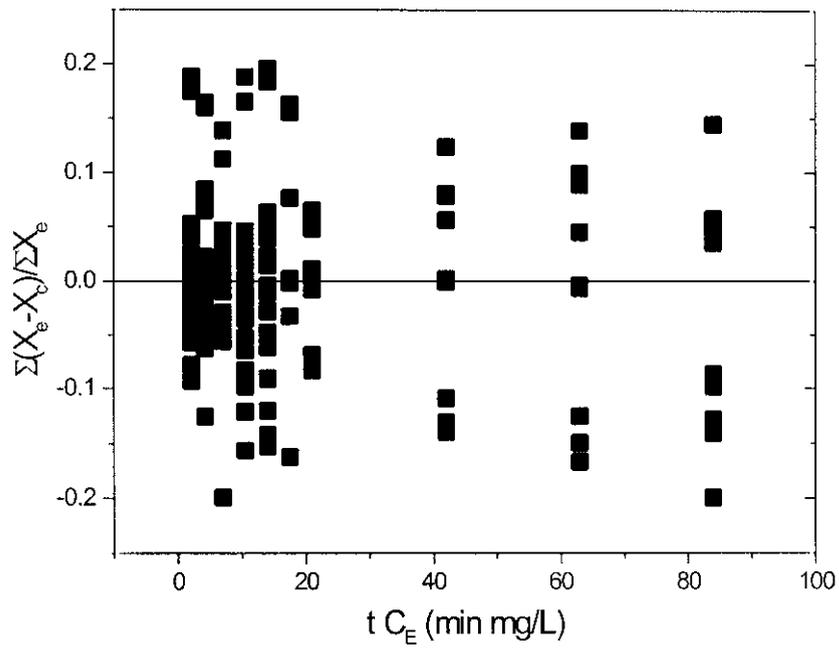


Figura 3.54.- Análisis de residuos comparando los datos experimentales con los valores calculados a partir del modelo 12.

Tabla 3.55.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, T como variable)

MODELO	Orden 1 (1)	Michaelis-Menten simple (2)	Michaelis-Menten con inhibición por ONPG (3)
Ln k_0	34,56 ± 4,03	26,18 ± 5,12	27,19 ± 6,84
E_a/R	11539 ± 5289	10260 ± 1426	10856 ± 5429
Ln K_{M0}	-	25,60 ± 6,40	26,49 ± 11,23
E_{aM}/R	-	9563 ± 1810	10642 ± 5439
Ln K_{I0}	-	-	56,29 ± 45,92
E_{aI}/R	-	-	19365 ± 21598
SQR	3,12	2,80	2,16
F	1123	928	627

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP (4)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP (5)
Ln k_0	14,50 ± 3,80	35,25 ± 17,60
E_a/R	6871 ± 1104	10117 ± 4974
Ln K_{M0}	58,56 ± 38,40	33,45 ± 17,80
E_{aM}/R	20309 ± 12612	9523 ± 4826
Ln K_{I0}	65,90 ± 38,40	-370,2 ± 174,0
E_{aI}/R	22448 ± 12256	-1,02 · 10 ⁵ ± 4,85 · 10 ⁴
SQR	1,68	1,85
F	1008	913

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP (6)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por ONP (7)
Ln k_0	11,06 ± 4,48	15,53 ± 5,28
E_a/R	5801 ± 1348	7088 ± 1538
Ln K_{M0}	-16,09 ± 7,48	4,32 ± 10,32
E_{aM}/R	-2754 ± 2246	3334 ± 3086
Ln K_{I0}	-1559 ± 330,0	27,80 ± 12,64
E_{aI}/R	4,86 · 10 ⁵ ± 1,14 · 10 ⁵	10010 ± 3600
Ln K'_{I0}	-	-582,3 ± 742,2
E'_{aI}/R	-	-1,80 · 10 ⁵ ± 2,30 · 10 ⁵
SQR	1,63	1,39
F	1049	911

Tabla 3.56.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli* en disolución. (*Método integral, regresión no lineal, T como variable*)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)
$\text{Ln } k_0$	$30,50 \pm 7,60$	$38,78 \pm 14,20$
E_a/R	11404 ± 2108	13710 ± 3950
$\text{Ln } K_{M0}$	$27,36 \pm 7,60$	$31,36 \pm 13,80$
E_{aM}/R	9930 ± 2156	10890 ± 3980
$\text{Ln } K_{I0}$	$9,39 \pm 8,76$	$-49,50 \pm 15,90$
E_{aI}/R	3637 ± 2624	-13759 ± 4550
SQR	2,09	2,15
F	826	791

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)
$\text{Ln } k_0$	$34,11 \pm 8,82$	$28,12 \pm 7,44$
E_a/R	12405 ± 2448	10709 ± 2080
$\text{Ln } K_{M0}$	$29,02 \pm 8,48$	$21,05 \pm 8,54$
E_{aM}/R	10319 ± 2346	8034 ± 2424
$\text{Ln } K_{I0}$	$-8,14 \pm 7,16$	$-380,4 \pm 7290$
E_{aI}/R	-1777 ± 2140	$-1,18 \cdot 10^7 \pm 2,30 \cdot 10^7$
$\text{Ln } K'_{I0}$	-	$-1,03 \pm 1880$
E'_{aI}/R	-	$-393,4 \pm 530,2$
SQR	2,10	1,99
F	818	644

Tabla 3.57.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como variable)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y competitiva por galactosa (12)	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (13)	Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (14)
Ln k_0	18,20 ± 4,28	21,77 ± 5,32	20,67 ± 4,44
E_a/R	7878 ± 1236	8890 ± 1510	8570 ± 1268
Ln K_{M0}	41,50 ± 12,80	38,46 ± 9,60	39,65 ± 9,98
E_{aM}/R	14761 ± 4100	13731 ± 3044	14145 ± 3142
Ln $K_{I gal 0}$	9,78 ± 6,04	-24,09 ± 9,00	39,00 ± 12,00
$E_{aI gal}/R$	3799 ± 1894	-6333 ± 2950	14036 ± 3780
Ln $K_{I ONP 0}$	42,72 ± 14,50	37,66 ± 11,90	-4,84 ± 6,22
$E_{aI ONP}/R$	15197 ± 4580	13583 ± 3700	-707 ± 1860
SQR	1,18	1,20	1,11
F	1096	1042	1127

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y competitiva por galactosa (15)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (16)	Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y no competitiva por galactosa (17)
Ln k_0	429,0 ± 118,0	615,6 ± 46,4	495,4 ± 92,64
E_a/R	$1,22 \cdot 10^3 \pm 3,03 \cdot 10^4$	$1,75 \cdot 10^3 \pm 2,13 \cdot 10^4$	$1,41 \cdot 10^3 \pm 2,58 \cdot 10^4$
Ln K_{M0}	410,0 ± 108,06	596,5 ± 76,80	476,5 ± 92,80
E_{aM}/R	$1,16 \cdot 10^3 \pm 3,06 \cdot 10^4$	$1,68 \cdot 10^3 \pm 2,13 \cdot 10^4$	$1,34 \cdot 10^3 \pm 2,30 \cdot 10^4$
Ln $K_{I gal 0}$	-4,54 ± 6,32	-614,5 ± 76,62	-12,82 ± 5,40
$E_{aI gal}/R$	502 ± 1880	$-1,71 \cdot 10^3 \pm 2,14 \cdot 10^4$	-3019 ± 1636
Ln $K_{I ONP 0}$	-448,8 ± 109,2	-638,0 ± 76,40	-514,6 ± 92,40
$E_{aI ONP}/R$	$-1,24 \cdot 10^3 \pm 3,04 \cdot 10^4$	$-1,77 \cdot 10^3 \pm 2,13 \cdot 10^4$	$-1,42 \cdot 10^3 \pm 2,58 \cdot 10^4$
SQR	1,11	1,22	1,10
F	1141	1035	1149

Tabla 3.58.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG con β -galactosidasa de *E. coli* en disolución. (Método integral, regresión no lineal, *T* como variable)

MODELO	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y competitiva por galactosa (18)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (19)	Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (20)
Ln k_0	11,49 ± 5,10	36,65 ± 174,1	40,83 ± 11,98
E_a/R	5828 ± 1500	$1,05 \cdot 10^3 \pm 5,00 \cdot 10^4$	14144 ± 5256
Ln K_{M0}	-16,58 ± 7,20	35,11 ± 178,3	26,96 ± 12,20
E_{aM}/R	-2975 ± 2142	$9,99 \cdot 10^4 \pm 4,99 \cdot 10^4$	9538 ± 3240
Ln $K_{I gal 0}$	-12,91 ± 6,64	-15,31 ± 6,54	-12,92 ± 6,02
$E_{aI gal}/R$	-2937 ± 1942	-2632 ± 1956	-3004 ± 1798
Ln $K_{I ONP 0}$	-56,59 ± 18,22	-36,83 ± 18,20	-15,61 ± 6,62
$E_{aI ONP}/R$	-15484 ± 5742	$-1,02 \cdot 10^3 \pm 4,98 \cdot 10^4$	-2733 ± 1982
SQR	1,08	1,32	1,27
F	1171	935	981

Tabla 3.59.- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *E.coli*.
Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Orden 1 (1)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=3,12 (20°)
	E_a/R	+	> 0	
Michaelis-Menten simple (2)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=2,80 (19°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición por ONPG (3)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=2,16 (18°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
	E_{aI}/R	0	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP (4)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=1,68 (12°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
	E_{aI}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP (5)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,85 (13°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
	E_{aI}/R	+	< 0 (valor alto)	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP (6)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,63 (11°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	< 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
	E_{aI}/R	+	> 0 (valor alto)	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por ONP (7)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,38 (10°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	0		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	+		
	E_{aI}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_I$	0		
E_{aI}/R	0	< 0		

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo

> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza

+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.59 (cont.).- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *E.coli*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa (8)	$\ln k_0$	+		No pasa. SQR=2,09 (15°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_I$	+		
	E_{aI}/R	+	> 0	
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por galactosa (9)	$\ln k_0$	+		Pasa. SQR=2,15 (16°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_I$	+		
	E_{aI}/R	+	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por galactosa (10)	$\ln k_0$	+		No pasa. SQR=2,10 (17°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_I$	+		
	E_{aI}/R	0	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición mixta por galactosa (11)	$\ln k_0$	+		No pasa. SQR=1,99 (14°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_I$	0		
	E_{aI}/R	0	< 0	
	$\ln K_I$	0		
	E_{aI}/R	0	< 0	
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y competitiva por galactosa (12)	$\ln k_0$	+		Pasa. SQR=1,18 (5°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_{I\text{ gal}}$	+		
	$E_{aI\text{ gal}}/R$	+	> 0	
	$\ln K_{I\text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI\text{ ONP}}/R$	+	> 0	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo
> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza
+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.59 (cont.).- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *E.coli*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (13)	$\text{Ln } k_0$	+		Pasa. SQR=1,20 (6°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	< 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
Michaelis- Menten con inhibición competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (14)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,11 (4°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	0		
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y competitiva por galactosa (15)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,11 (3°)
	E_a/R	+	> 0 (valor altísimo)	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0 (valor altísimo)	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	> 0	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
Michaelis-Menten con inhibición acompetitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (16)	$\text{Ln } k_0$	+		No pasa. SQR=1,22 (7°)
	E_a/R	+	> 0 (valor altísimo)	
	$\text{Ln } K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0 (valor altísimo)	
	$\text{Ln } K_{I \text{ gal}}$	+		
	$E_{aI \text{ gal}}/R$	+	< 0 (valor altísimo)	
	$\text{Ln } K_{I \text{ ONP}}$	+		
	$E_{aI \text{ ONP}}/R$	+	< 0 (valor altísimo)	

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo

> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza

+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

Tabla 3.59 (cont.).- Discriminación de modelos: Hidrólisis de ONPG con enzima de *E.coli*. Método integral: regresión no lineal de datos a temperatura variable.

MODELO	PARA-METRO	CRITERIOS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS FÍSICOS	OBSERVACIONES
Michaelis-Menten con inhibición a-competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (17)	$\ln k_0$	+		No pasa. SQR=1,10 (2°)
	E_a/R	+	> 0 (valor altísimo)	
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	0	> 0 (valor altísimo)	
	$\ln K_{I gal}$	+		
	$E_{aI gal}/R$	+	< 0	
	$\ln K_{I ONP}$	+		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y competitiva por galactosa (18)	$\ln k_0$	+		Pasa. SQR=1,08 (1°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\ln K_M$	+		
	E_{aM}/R	+	< 0	
	$\ln K_{I gal}$	+		
	$E_{aI gal}/R$	+	< 0	
	$\ln K_{I ONP}$	+		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y acompetitiva por galactosa (19)	$\ln k_0$	0		No pasa. SQR=1,32 (9°)
	E_a/R	+	> 0 (valor altísimo)	
	$\ln K_M$	0		
	E_{aM}/R	+	> 0 (valor altísimo)	
	$\ln K_{I gal}$	+		
	$E_{aI gal}/R$	+	< 0	
	$\ln K_{I ONP}$	+		
Michaelis-Menten con inhibición no competitiva por ONP y no competitiva por galactosa (20)	$\ln k_0$	+		No pasa. SQR=1,27 (8°)
	E_a/R	+	> 0	
	$\ln K_m$	+		
	E_{aM}/R	+	> 0	
	$\ln K_{i1}$	+		
	E_{ai1}/R	+	< 0	
	$\ln K_{i2}$	+		
E_{ai2}/R	+	< 0		

Clave: Criterios físicos: < 0 Parámetro negativo

> 0 Parámetro positivo

Criterios estadísticos: 0 incluye el cero en el intervalo de confianza

+ pasa

Observaciones: al valor de SQR le sigue el n° de orden de mejor a peor ajuste, entre paréntesis.

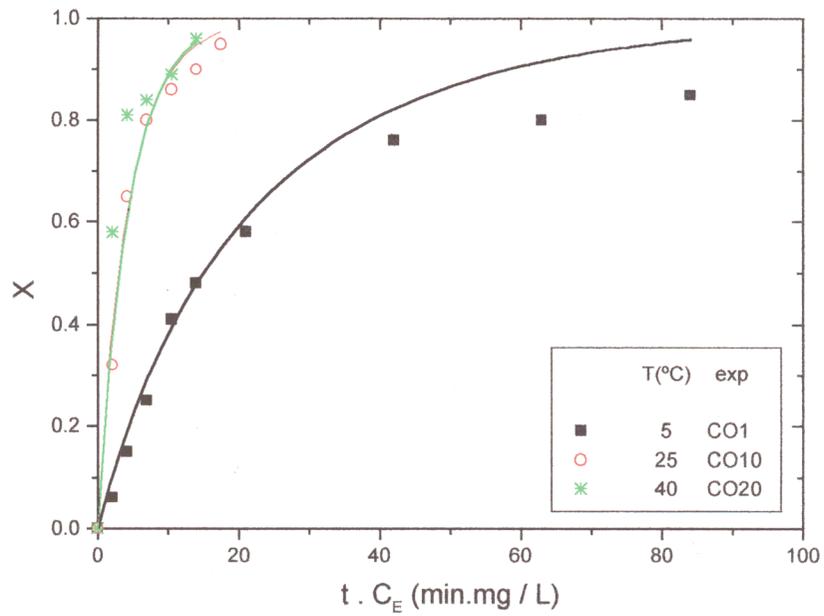


Figura 3.55.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la temperatura. $C_{ONPG\ 0}=0,25$ g/L, $C_{gal\ 0}=0$ g/L, $C_{ONP\ 0}=0$ g/L.

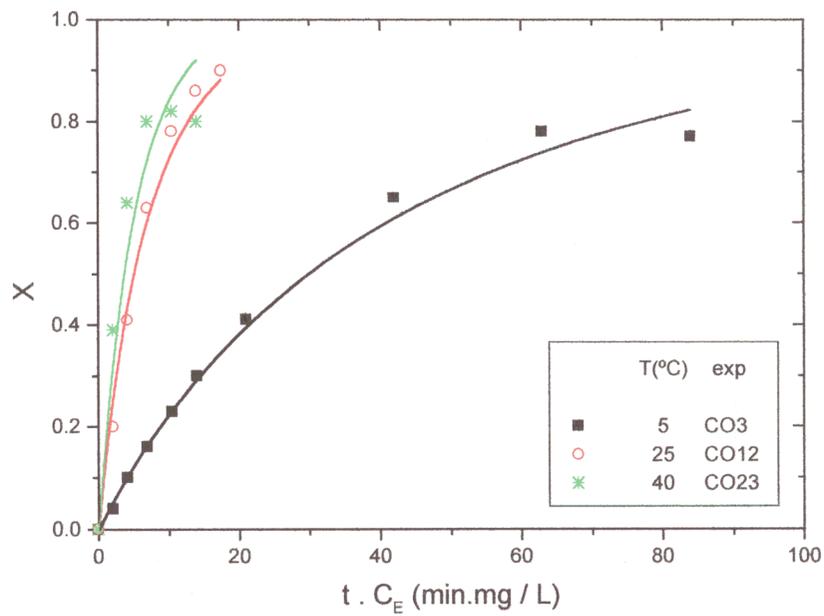


Figura 3.56.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la temperatura. $C_{ONPG\ 0}=0,5$ g/L, $C_{gal\ 0}=0$ g/L, $C_{ONP\ 0}=0$ g/L.

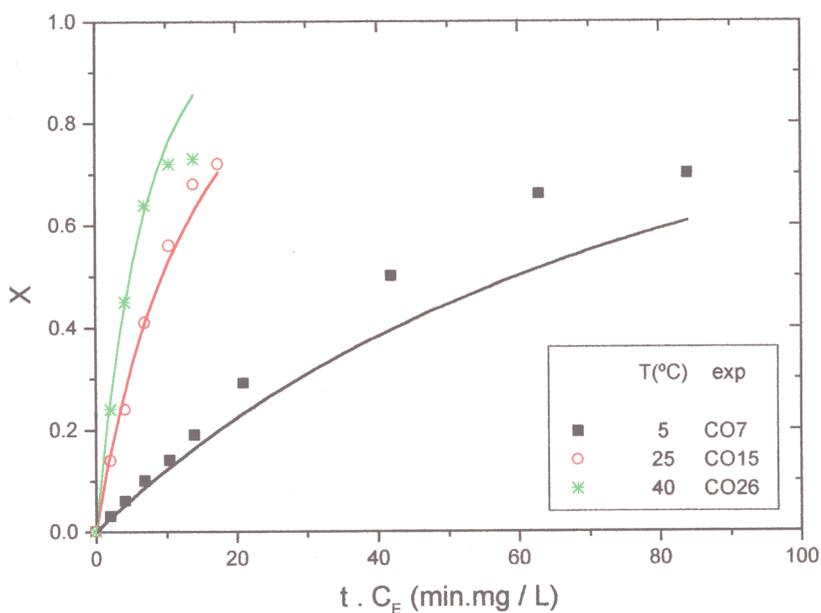


Figura 3.57.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la temperatura. $C_{\text{ONPG}0}=1$ g/L, $C_{\text{gal}0}=0$ g/L, $C_{\text{ONP}0}=0$ g/L.

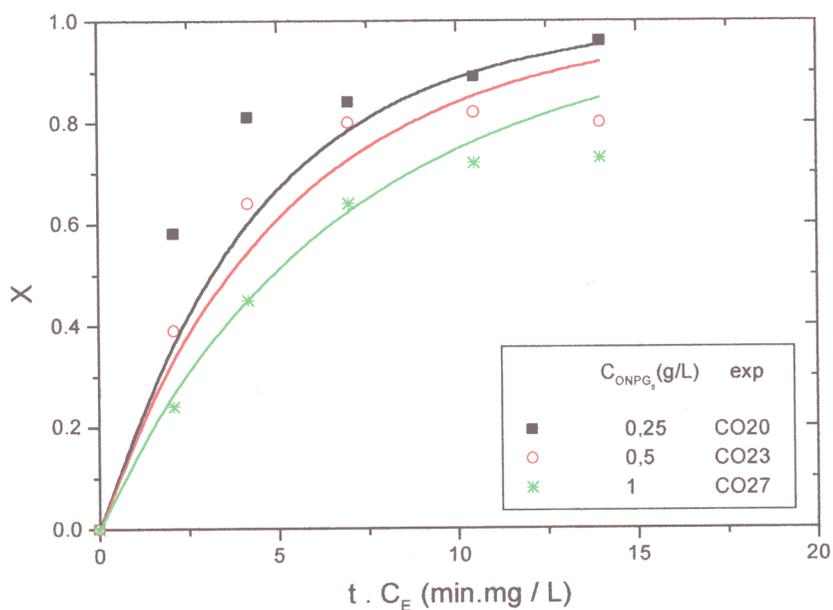


Figura 3.58.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración de ONPG. $T: 40^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{gal}0}=0$ g/L, $C_{\text{ONP}0}=0$ g/L.

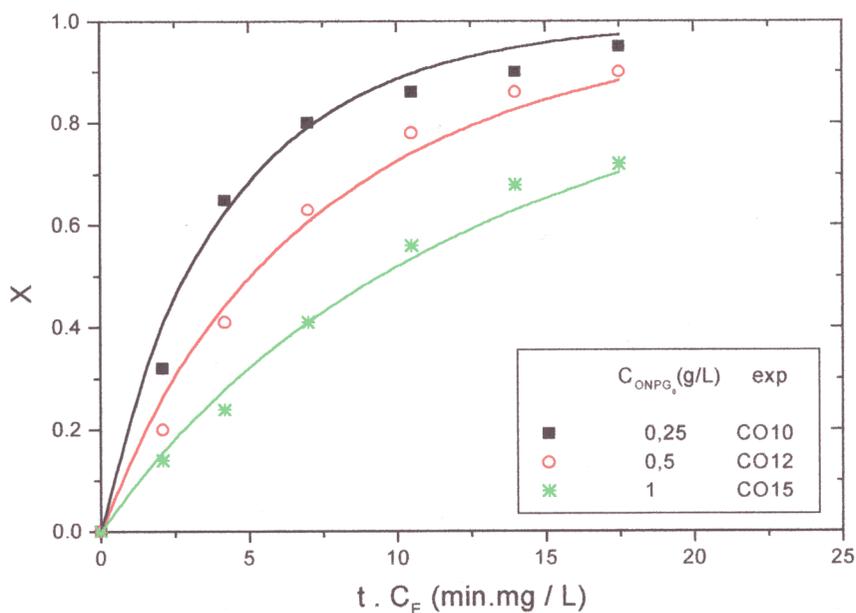


Figura 3.59.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración de ONPG. T: 25°C, $C_{gal\ 0}=0$ g/L, $C_{ONP\ 0}=0$ g/L

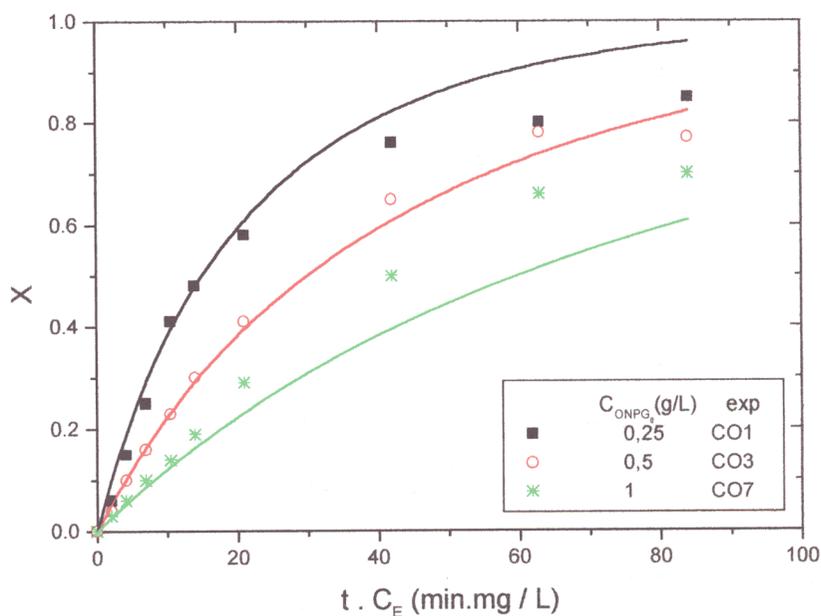


Figura 3.60.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración de ONPG. T: 5°C, $C_{gal\ 0}=0$ g/L, $C_{ONP\ 0}=0$ g/L.

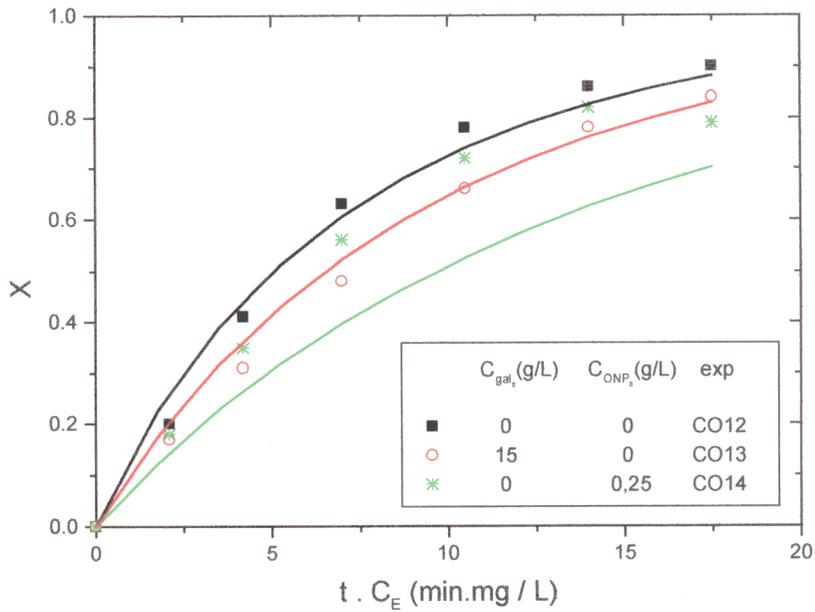


Figura 3.61.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración de galactosa y ONP. T: 40°C, $C_{ONPG0}=0,5g/L$.

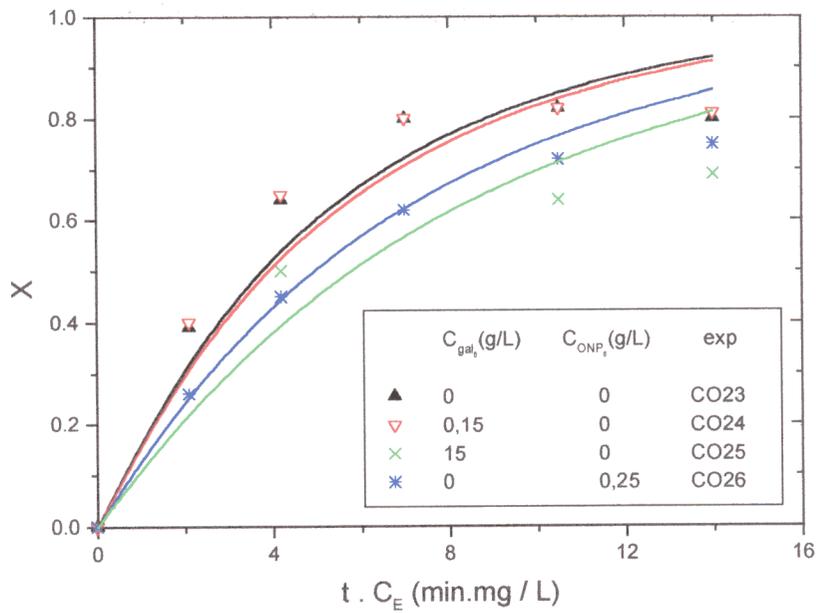


Figura 3.62.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración de galactosa y ONP. T: 25°C, $C_{ONPG0}=0,5g/L$

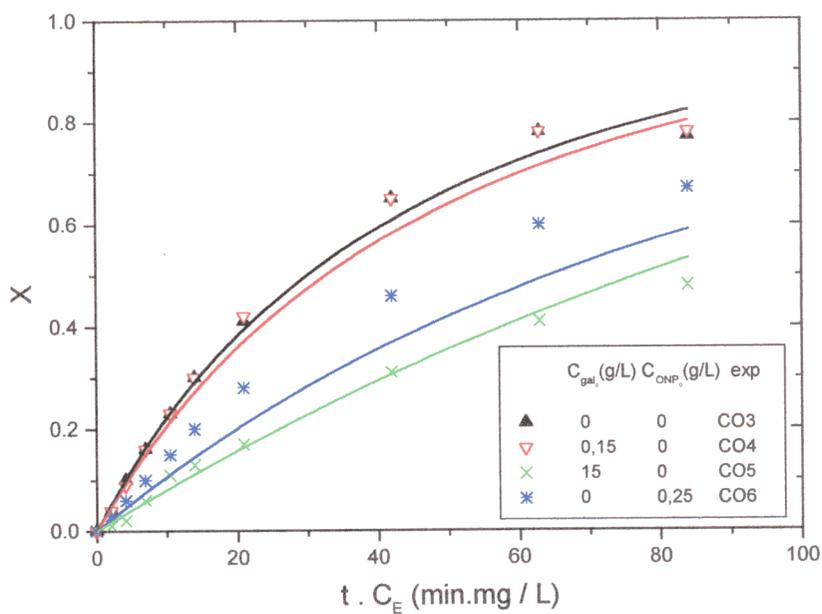


Figura 3.63.- Datos experimentales de la hidrólisis de ONPG con enzima de *E. coli*: Influencia de la concentración de galactosa y ONP. T: 5°C, $C_{ONPG0}=0,5g/L$.

3.4.- COMPARACIÓN DE LAS DOS ENZIMAS EN DISOLUCIÓN

En este apartado se compara el comportamiento de las dos enzimas frente a las dos reacciones de hidrólisis consideradas. Se analiza la estabilidad y actividad de las dos enzimas frente a las características del medio de reacción: composición iónica, pH, temperatura, y se comparan los modelos cinéticos seleccionados para cada enzima y cada reacción.

3.4.1.- Actividad y estabilidad

En la Figura 3.64 se compara el efecto del pH sobre la actividad de las enzimas utilizadas en las dos reacciones de hidrólisis, tanto en BM como en BP.

- En la hidrólisis de lactosa, la enzima de *K. fragilis* muestra una actividad máxima en torno a un pH de 6,5 tanto en tampón BP como en tampón BM. Sin embargo, la actividad es superior en BP que en BM (un 45% más).
- En esta misma reacción, la enzima de *E. coli* tiene su máxima actividad cuando el pH es, aproximadamente, 6,5 en los dos tampones. También se observa que la actividad es mayor cuando el medio de reacción es BP (un 30% más que en BM).
- Comparando las dos enzimas, se observa que el pH óptimo es el mismo y que el comportamiento con cada tampón es similar. Sin embargo, la actividad que muestra la enzima presente en Lactozym sobre lactosa es tres veces mayor que la mostrada por la enzima de *E. coli*.
- Cuando la reacción que se produce es la hidrólisis de ONPG, la enzima de *K. fragilis* muestra una actividad máxima a un pH entre 6,8 y 7,2 en los dos tampones, siendo la actividad de la enzima similar en ambos medios de reacción.
- En la reacción de hidrólisis de ONPG con la β -galactosidasa de *E. coli*, el pH óptimo está en torno a 7,0 cuando el medio de reacción es BM y sobre 7,5 cuando es BP.
- Comparando el comportamiento de las enzimas frente al pH en esta reacción, se observa que el tampón utilizado sólo afecta a la enzima de *E. coli*, por lo que se puede deducir que la interacción de esta enzima con el ONPG es algo diferente a la de la enzima de *K. fragilis*, si se mide la actividad por el test habitual, empleando ONPG,

las dos enzimas se comportan de forma parecida, lo que no es cierto cuando el sustrato es lactosa.

- Comparando el comportamiento con los dos sustratos y en los dos tampones, se observa que la reacción de hidrólisis de ONPG transcurre a la máxima velocidad a un pH algo superior que el de la reacción de hidrólisis de lactosa, tanto con la enzima de *E. coli* como en la de *K. fragilis*. El ONPG forma un dipolo permanente, mientras que la lactosa es una molécula neutra. Según el mecanismo propuesto para la acción de las β -galactosidasas, las enzimas interaccionan con el grupo glicón, la galactosa. En la lactosa, el grupo glicón es neutro; en el ONPG, este grupo está cargado positivamente, mientras que el resto o-nitrofenol tiene carga negativa. Cuanto más ácido es el pH, más positiva es la carga global de una proteína. Una molécula con carga positiva interaccionará mejor con la enzima a pH más alto.
- Se ha observado, como ya se ha indicado anteriormente, que la hidrólisis de ONPG con la enzima de *E. coli* transcurre a la máxima velocidad a pH más ácido en BM que en BP. Como el tampón BP tiene una fuerza iónica mayor que la del tampón BM, puede ejercer un mayor efecto de apantallamiento que dificulte la interacción sustrato-enzima. Como el pH óptimo es mayor en el tampón BP que en el tampón BM, parece que hay que disminuir el número de cargas positivas globales en el medio en el caso del BP para que la atracción entre la enzima y el sustrato sea máxima. Parecen ser las cargas positivas del medio las que bloquean la interacción. Hay que recordar que la galactosa del ONPG tiene una ligera carga positiva y que es la parte de la molécula que se hidroliza que está más ligada a la enzima.

Cuando se compara la estabilidad de las enzimas frente al pH (Figura 3.65) se observa que la enzima de *E. coli* es más estable que la de *K. fragilis* a pH ácido. La enzima de *E. coli* presenta una estabilidad máxima a pH 8,0, mientras que la de *K. fragilis* la presenta a pH 7,0. Las dos enzimas tienen una estabilidad máxima a un pH ligeramente superior a los valores de pH donde su actividad hidrolítica es máxima. Este hecho es explicable si se considera que la estabilidad de la enzima al pH depende de la influencia de los iones H_3O^+ sobre toda la estructura proteica, mientras que el efecto del pH sobre la actividad es debido a la interacción de los H_3O^+ con los aminoácidos que forman el centro activo de la enzima.

Cuando se somete a las enzimas a temperaturas altas durante periodos largos de incubación (Figura 3.66), se observa que la enzima de *E. coli* es más termoestable que la enzima contenida en Lactozym. Las tendencias de las curvas de desactivación son algo diferentes:

- En el caso de la enzima de *E. coli*, se observa un ligero aumento de actividad a 40°C durante los primeros minutos de exposición, seguido por una pérdida progresiva de la actividad a tiempos de exposición mayores. Este hecho parece indicar que hay cierta activación térmica de la enzima cuando se incuba a esa temperatura, relativamente moderada, lo que podría explicarse si la enzima pasara de una conformación plegada y estable a otra desplegada, más activa pero más inestable, que luego degeneraría en una conformación inactiva. A 50°C, da la impresión de que la enzima se estabiliza cuando su actividad se ha reducido al 50%, lo que está de acuerdo con los resultados de otro autor (Wadiak y Carbonell, 1975). Parece que la enzima llegue a una segunda conformación más estable, aunque menos activa, que luego se desactiva si se deja incubar más tiempo a dicha temperatura.
- La enzima presente en Lactozym presenta una leve desactivación a 40°C, que es mucho mayor si se aumenta la temperatura de incubación. En ambos casos, la desactivación es progresiva y se podría pensar que la enzima activa degenera directamente en una forma inactiva, sin otras formas enzimáticas intermedias.

El medio en el que se hicieron las incubaciones fue tampón BP.

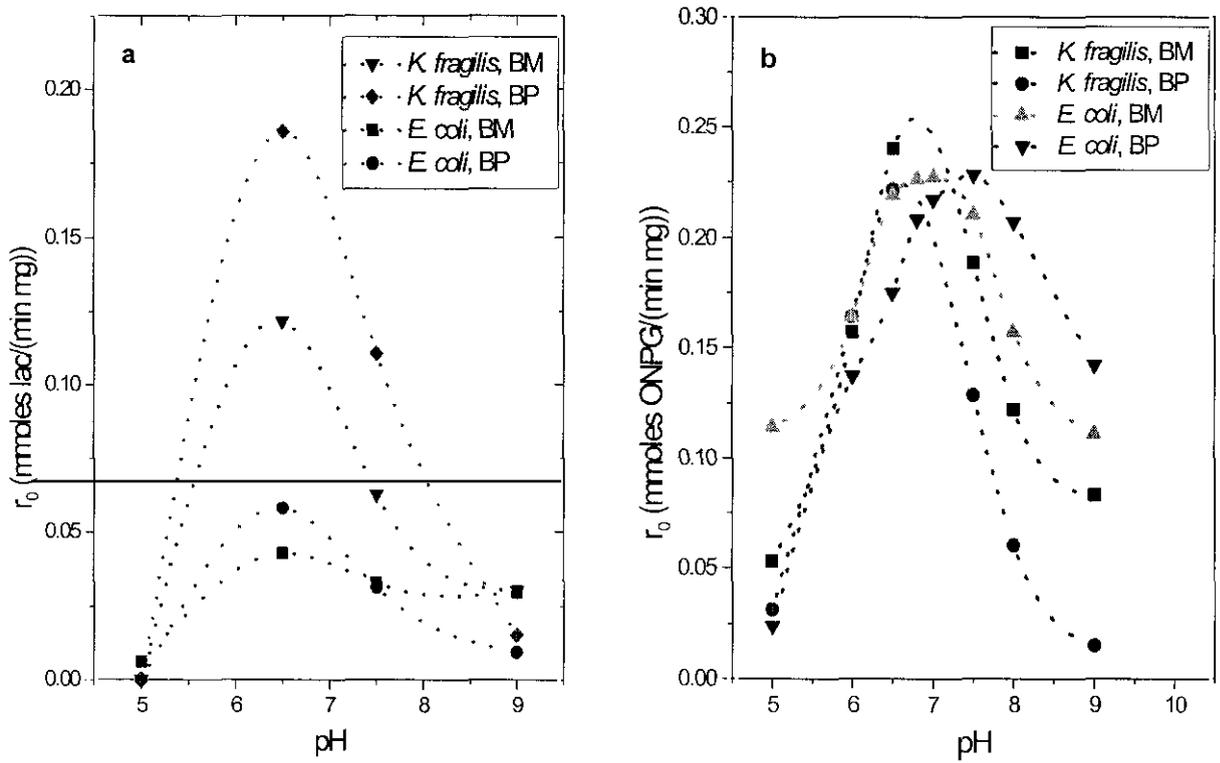


Figura 3.64.- Efecto del pH en las reacciones de hidrólisis de lactosa y ONPG por β -galactosidasas de *K. fragilis* y de *E. coli*.

Lactosa: $T=40^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{lac } 0}=50 \text{ g/L}$; $C_E=7 \text{ mg/L}$
 ONPG: $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG } 0}=50 \text{ g/L}$; $C_E=0,7 \text{ mg/L}$

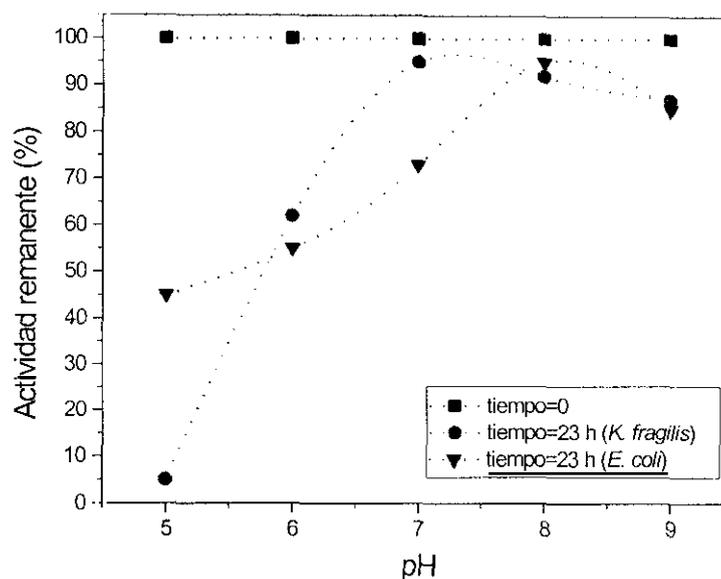


Figura 3.66.- Estabilidad de las enzimas frente al pH. Actividad residual vs tiempo de incubación.
Medida de actividad estándar: $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG}0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_{\text{E}}=0,7 \text{ mg/L}$

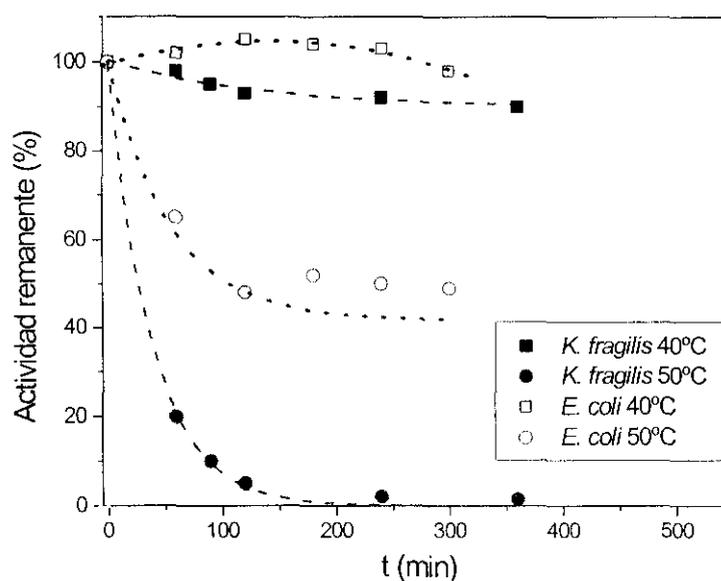


Figura 3.68.- Estabilidad de las enzimas frente a la temperatura. Actividad residual vs tiempo de incubación.
Medida de actividad estándar: $T=25^{\circ}\text{C}$; $C_{\text{ONPG}0}=0,5 \text{ g/L}$; $C_{\text{E}}=0,7 \text{ mg/L}$.

3.4.2.- Modelo cinético de la hidrólisis de lactosa

Como ya se comentó, la enzima de *E. coli* es menos activa que la de *K. fragilis* en la reacción de hidrólisis de lactosa. Si se comparan las velocidades iniciales de reacción obtenidas con ambas enzimas a varias temperaturas, Lactozym es, aproximadamente, 5 veces más activa a 40°C, unas 10 veces más a 25°C y unas 20 veces más a 5°C. Teniendo en cuenta que la temperatura máxima de trabajo con ambas enzimas es de 40°C, para evitar la desactivación de las mismas, la mayor actividad de Lactozym hace esta enzima preferible en la posible utilización comercial.

Si se compara el efecto de la concentración inicial de sustrato a las velocidades iniciales de reacción con ambas enzimas (Figuras 3.10 y 3.41), se observa que, a la misma temperatura, el aumento de la concentración inicial de lactosa provoca un mayor aumento de la velocidad inicial de reacción cuando la enzima utilizada es la de *K. fragilis*. Esto significa que el orden global de reacción para la lactosa está más cerca de orden 1 en el caso de la enzima de *K. fragilis*. Por tanto, el valor de K_M es mayor para esta enzima que para la de *E. coli*, es decir, que su afinidad por la lactosa es menor.

La galactosa parece inhibir más la reacción catalizada por Lactozym (Figuras 3.11 y 3.42). La inhibición por galactosa disminuye con el aumento de temperatura en las reacciones con la enzima de *K. fragilis*, pero la tendencia no está clara en el caso de la enzima de *E. coli*.

La glucosa no inhibe la reacción de hidrólisis de lactosa con Lactozym excepto a temperaturas bajas, mientras que, si se utiliza como catalizador de la reacción la enzima de *E. coli*, se aprecia una moderada inhibición por este producto en todo el intervalo de temperaturas (Figuras 3.12 y 3.43). La inhibición por glucosa disminuye con la temperatura en el caso de la enzima de *E. coli*.

Tabla 3.60.- Resumen de modelos cinéticos para la reacción de hidrólisis de lactosa con β -galactosidasas de *K. fragilis* y de *E. coli*.

Fuente de la enzima	Modelo	Parámetros del modelo
<i>K. fragilis</i>	Modelo 8 (Tabla 3.2) $r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} \right) + C_{lac}}$	$k_2 = \exp\left(11,30 \pm 1,55 - \frac{5870 \pm 441}{T}\right)$ $K_M = \exp\left(28,54 \pm 12,23 - \frac{10110 \pm 6200}{T}\right)$ $K_{Igal} = \exp\left(24,58 \pm 13,96 - \frac{9001 \pm 6230}{T}\right)$
<i>E. coli</i>	Modelo 6 (Tabla 3.2) $r = \frac{k_2 C_E C_{lac}}{K_M + C_{lac} \left(1 + \frac{C_{glu}}{K_{Iglu}} \right)}$	$k_2 = \exp\left(13,71 \pm 0,60 - \frac{7239 \pm 180}{T}\right)$ $K_M = \exp\left(11,32 \pm 5,94 - \frac{4894 \pm 1840}{T}\right)$ $K_{Iglu} = \exp\left(1,32 \pm 1,28 - \frac{1007 \pm 596}{T}\right)$

En la Tabla 3.60 se comparan los modelos cinéticos seleccionados para las dos enzimas en la reacción de hidrólisis de lactosa. Se observa que Lactozym presenta inhibición competitiva por galactosa, lo que está de acuerdo con el mecanismo ping-pong que se presenta en las β -galactosidasas, considerando que la enzima queda unida al galactósido y que éste sale posteriormente al grupo aglicón, pudiendo competir con las moléculas de sustrato. Con la enzima de *E. coli* se observa inhibición por glucosa de tipo incompetitivo, es decir, que el inhibidor se une a un centro alostérico presente en la enzima. La galactosa no actúa como inhibidor de la enzima de *E. coli*.

La energía de activación de la constante cinética, k_2 , en el caso de la enzima de *E. coli* es mayor que en Lactozym, por lo que una disminución de temperatura afecta más a la actividad de la primera enzima. La constante K_M varía de forma más brusca con la temperatura en Lactozym, por lo que la enzima pierde rápidamente afinidad por la lactosa según aumenta la temperatura. La constante K_I con Lactozym varía de la misma forma que K_M con la temperatura, lo cual es lógico, ya que la galactosa y la lactosa deberían unirse de forma similar al centro activo, según el mecanismo propuesto para la acción de las β -galactosidasas. Con la enzima de *E. coli*, K_I varía muy suavemente con la

temperatura, siendo su energía de activación cuatro veces inferior a la de la constante K_M . La E_a de la constante de inhibición de la glucosa es muy pequeña, parecida a las que son propias de las constantes de adsorción física.

3.4.3.- Modelo cinético de la hidrólisis de ONPG

Comparando el efecto que tiene la concentración de sustrato en la velocidad inicial de reacción para las dos enzimas (Figuras 3.23 y 3.52), se observa que el orden neto respecto al ONPG es más próximo a cero en la enzima de *K. fragilis*. Por ello, la constante de Michaelis con la enzima de *K. fragilis* es mayor que con la de *E. coli*, por lo que su afinidad por el sustrato es menor. Por otra parte, en los dos casos, al aumentar la temperatura, aumenta K_M , es decir, disminuye la afinidad de las enzimas por el sustrato.

El efecto de la galactosa sobre la velocidad inicial (Figuras 3.24 y 3.53) es similar con ambas enzimas: la galactosa sólo inhibe cuando se encuentra en el medio de reacción en altas concentraciones. También el efecto del ONP sobre la velocidad inicial de reacción es muy parecido, inhibiendo a concentraciones similares a las del sustrato con las dos enzimas (Figuras 3.25 y 3.54).

Analizando los modelos cinéticos seleccionados para la reacción de hidrólisis de ONPG con ambas enzimas, se observa que se discriminan modelos diferentes. Aunque en ambos casos existe inhibición competitiva por la galactosa, cuando este producto se encuentra en concentraciones elevadas. La principal diferencia es que la enzima de *K. fragilis* presenta inhibición acompetitiva por ONP, mientras que la de *E. coli* presenta inhibición competitiva por este producto. Ambas tienen una gran afinidad por el ONP, similar a la que presentan por el ONPG, pero el punto de unión del sustrato a la enzima puede ser algo diferente. En la de *E. coli*, el ONP puede fijarse fuera del centro activo y no interaccionar con la entrada de sustrato. En la enzima presente en Lactozym, el punto de unión del ONP puede estar muy cerca del centro activo, por lo que el ONP bloquea estéricamente el centro activo.

Tabla 3.61.- Resumen de modelos cinéticos para la reacción de hidrólisis de ONPG con β -galactosidasas de *K. fragilis* y de *E. coli*.

Fuente de la enzima	Modelo	Parámetros del modelo
<i>K. fragilis</i>	Modelo 15 (Tabla 3.3) $r = \frac{k_2 C_E C_{ONPG}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}}\right) + C_{ONPG} \left(1 + \frac{C_{ONPG}}{K_{I ONP}}\right)}$	$k_2 = \exp\left(34,00 \pm 13,20 - \frac{12160 \pm 4203}{T}\right)$ $K_M = \exp\left(22,34 \pm 13,52 - \frac{8141 \pm 3700}{T}\right)$ $K_{Igal} = \exp\left(6,29 \pm 6,14 - \frac{2883 \pm 1704}{T}\right)$ $K_{I ONP} = \exp\left(-35,86 \pm 14,23 + \frac{8085 \pm 3982}{T}\right)$
<i>E. coli</i>	Modelo 12 (Tabla 3.3) $r = \frac{k_2 C_E C_{ONPG}}{K_M \left(1 + \frac{C_{gal}}{K_{Igal}} + \frac{C_{ONPG}}{K_{I ONP}}\right) + C_{ONPG}}$	$k_2 = \exp\left(18,20 \pm 4,28 - \frac{7878 \pm 1236}{T}\right)$ $K_M = \exp\left(41,50 \pm 12,80 - \frac{14761 \pm 4100}{T}\right)$ $K_{Igal} = \exp\left(9,78 \pm 6,04 - \frac{3799 \pm 1894}{T}\right)$ $K_{I ONP} = \exp\left(42,72 \pm 14,50 - \frac{15197 \pm 4580}{T}\right)$

Al comparar los valores y signos de las energías de activación de los parámetros cinéticos obtenidos, se observa que la constante cinética (k_2) obtenida con la enzima de *K. fragilis* tiene una energía de activación mayor que la de la enzima de *E. coli*. Además, esta enzima alcanza su máxima actividad a 35-40°C, mientras que la de *E. coli* tiene su máxima actividad a mayor temperatura, en torno a 40-45°C. La energía de activación de la constante K_M con Lactozym es, en cambio, menor que con la otra enzima, lo que indica que hay diferencia en la unión al sustrato y en la variación de la fuerza de dicha unión con la temperatura. La afinidad enzima-sustrato disminuye con el aumento de temperatura en ambos casos, aunque con Lactozym la disminución es más lenta. Para la constante de inhibición de la galactosa, la energía de activación en *E. coli* es similar a la obtenida con Lactozym. Por tanto, la inhibición disminuye suavemente con el aumento de temperatura en ambos casos. La constante de inhibición del o-nitrofenol para Lactozym tiene una E_a negativa, indicando una mayor inhibición a mayor temperatura. Esta constante para *E. coli* tiene un E_a positiva y mayor en valor absoluto a la de la constante obtenida con

Lactozym, lo que indica una brusca disminución de la inhibición por ONP con el aumento de la temperatura.

Con ambas enzimas, se observa que la energía de activación de la constante de Michaelis es similar a la de la constante de inhibición por o-nitrofenol. Considerando que las enzimas presentan una afinidad similar por el ONPG y por el ONP a todas las temperaturas, se podría deducir que el ONPG se une prioritariamente a las enzimas por el grupo o-nitrofenol, no por la galactosa.

ABRIR CAPÍTULO 4.-

