

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA



* 5 3 0 9 5 8 5 2 0 3 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA

MEMORIA
que para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas
presenta

LOURDES RODRIGUEZ MAYOR

Madrid, 1991

JOSE AGUADO ALONSO Y M. DOLORES ROMERO DIAZ, PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICAN: Que el presente trabajo de investigación titulado "Hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada", constituye la memoria que presenta la Licenciada Dña. Lourdes Rodríguez Mayor para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas y ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química bajo nuestra dirección.

Para que conste, firmamos el presente en Madrid a 15 de Febrero de 1991

José Aguado Alonso

M. Dolores Romero Díaz

A mis padres y
a Jose Luis

La presente investigación se realizó en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Profesores Titulares Dr. D. José Aguado Alonso y Dra. Dña. M. Dolores Romero Díaz, en quienes siempre encontré el estímulo, la ayuda y los consejos que posibilitaron mi labor, y a quienes expreso mi más sincero agradecimiento.

Asímismo, deseo manifestar mi gratitud a todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química, en especial a Rafa y a mis compañeros de promoción (Poten, Juan Miguel, Manolo y Jose Luis), así como, a los que durante estos años fueron mis tesis, ya que con su inestimable ayuda hicieron posible la realización de este trabajo.

Por último, he de citar al Claustro de Profesores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid al que debo mi formación científica y técnica y al Ministerio de Educación y Ciencia por la Beca del Plan de Formación del Personal Investigador (FPI) recibida.

Madrid, Febrero de 1991

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	6
2.1. GENERALIDADES	7
2.2. LOS RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS	10
2.2.1. HIDROLISIS DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS	10
2.2.2. EL COMPLEJO ENZIMATICO CELULASAS	12
2.2.3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DEL COMPLEJO CELULASAS	14
2.2.4. PRODUCCION DE β -GLUCOSIDASA	17
2.3. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELOBIOSA	17
2.3.1. CATALISIS ENZIMATICA	17
2.3.2. CINETICA ENZIMATICA	19
2.3.3. INHIBICION ENZIMATICA	22
i) <i>Inhibición competitiva</i>	23
ii) <i>Inhibición acompetitiva</i>	23
iii) <i>Inhibición no competitiva</i>	24
iv) <i>Inhibición por sustrato</i>	25
v) <i>Inhibición por producto</i>	26
2.3.4. VARIABLES QUE INFLUYEN SOBRE LA CINETICA ENZIMA- TICA: pH Y TEMPERATURA	27
i) <i>Efecto del pH</i>	27
ii) <i>Efecto de la temperatura</i>	28
2.3.5. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA LIBRE E INMOVILIZADA	28
2.4. DESNATURALIZACION ENZIMATICA	31
2.5. INMOVILIZACION DE ENZIMAS	33
2.5.1. METODOS PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS	33
i) <i>Atrapamiento</i>	33
ii) <i>Inmovilización sobre soportes sólidos</i>	35
iii) <i>Entrecruzamiento</i>	42
2.5.2. SELECCION DEL METODO DE INMOVILIZACION	43
2.5.3. SELECCION DEL SOPORTE	45
2.5.4. EFECTO DEL METODO DE INMOVILIZACION SOBRE LA CINETICA Y LAS PROPIEDADES ENZIMATICAS	47
i) <i>Modificación de los parámetros cinéticos: Constante de Michaelis y velocidad máxima</i>	

	de reacción	48
	ii) Perfil de actividad frente al pH	48
	iii) Perfil de actividad frente a la temperatura	49
	iv) Estabilidad frente a la temperatura y al almacenamiento	49
	2.5.5. INMOVILIZACION DE LA ENZIMA β -GLUCOSIDASA	50
	2.6. OBJETO Y ALCANCE DE LA PRESENTE INVESTIGACION	53
3.	APARATOS	55
3.1.	INCUBADORA	56
3.2.	BAÑO TERMOSTATICO	57
4.	MATERIALES Y PROCEDIMIENTO	59
4.1.	MATERIALES	60
	i) Enzimas	60
	ii) Soportes	61
	iii) Otros reactivos	61
4.2.	PROCEDIMIENTO	62
4.2.1.	INMOVILIZACION POR ADSORCION	62
4.2.2.	INMOVILIZACION POR ENTRECruzAMIENTO CON GLUTARAL- DEHIDO	62
4.2.3.	INMOVILIZACION SOBRE SILICA GEL-60 POR FORMACION DE UNION METALICA CON $TiCl_4$	62
4.2.4.	INMOVILIZACION MEDIANTE FORMACION DE UN ENLACE COVALENTE SOBRE NYLON EN POLVO	63
4.2.5.	ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TERMICA DE LAS ENZIMAS .	65
4.2.6.	HIDROLISIS ENZIMATICA	65
5.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	66
5.1.	EXPERIMENTOS PREVIOS	68
5.1.1.	SELECCION DEL SOPORTE Y DE LA TECNICA DE INMOVILI- ZACION	68
5.1.2.	INFLUENCIA DEL ORIGEN DE LA β -GLUCOSIDASA EMPLEADA EN LA INMOVILIZACION	69
5.2.	INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE <i>Penicillium funiculosum</i> SOBRE NYLON EN POLVO	69
5.2.1.	INFLUENCIA DE LAS VARIABLES DE INMOVILIZACION	69
	5.2.1.1. Repetitividad de resultados	69

5.2.1.2.	Activación del soporte	70
	i) Aminoactivación	70
	ii) Activación con glutaraldehído	70
5.2.1.3.	Inmovilización propiamente dicha	70
5.3.	ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE <i>Penicillium</i> <i>funiculosum</i>	71
5.3.1.	DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA LIBRE	71
5.3.2.	DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA	72
5.4.	HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE <i>Penicillium funiculosum</i>	72
5.4.1.	HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA LIBRE	72
	i) Influencia de la temperatura	72
	ii) Influencia de la concentración inicial de celobiosa	72
	iii) Influencia de la concentración inicial de glucosa	73
	iv) Influencia de la actividad de β -glucosidasa ...	
	v) Influencia del pH	73
5.4.2.	HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO	73
	i) Influencia de la velocidad de agitación	73
	ii) Influencia de la temperatura	74
	iii) Influencia de la concentración inicial de celobiosa	74
	iv) Influencia de la concentración inicial de glucosa	74
	v) Influencia de la actividad de β -glucosidasa ...	75
	vi) Influencia del pH	75
6.	DISCUSION DE RESULTADOS	139
6.1.	EXPERIMENTOS PREVIOS	140
6.1.1.	SELECCION DEL SOPORTE Y DE LA TECNICA DE INMOVILIZACION	140
6.1.2.	INFLUENCIA DEL ORIGEN DE LA β -GLUCOSIDASA EMPLEADA EN LA INMOVILIZACION	156
6.2.	INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE <i>Penicillium funiculosum</i> SOBRE NYLON EN POLVO	158

6.2.1.	INFLUENCIA DE LAS VARIABLES DE INMOVILIZACION	158
6.2.1.1.	Repetitividad de resultados	158
6.2.1.2.	Activación del soporte	158
	<i>i) Aminoactivación</i>	160
	<i>ii) Activación con glutaraldehido</i>	163
6.2.1.3.	Inmovilización propiamente dicha	169
6.3.	ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE <i>Penicillium</i> <i>funiculosum</i>	176
6.3.1.	DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA LIBRE.....	176
6.3.1.1.	Modelo cinético para la desactivación de la enzima libre	182
6.3.2.	DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO	188
6.3.2.1.	Modelo cinético para la desactivación de la enzima inmovilizada	191
6.4.	HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE <i>Penicillium</i> <i>funiculosum</i>	192
6.4.1.	HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA LIBRE	192
	<i>i) Influencia de la temperatura</i>	194
	<i>ii) Influencia de la concentración inicial de celobiosa</i>	196
	<i>iii) Influencia de la concentración inicial de glucosa</i>	196
	<i>iv) Influencia de la actividad de β-gluco- sidasas</i>	199
	<i>v) Influencia del pH</i>	201
6.4.1.1.	Modelo cinético para la hidrólisis de celo- biosa con β -glucosidasas libres	203
6.4.2.	HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO	215
	<i>i) Influencia de la velocidad de agita- ción</i>	216
	<i>ii) Influencia de la temperatura</i>	218
	<i>iii) Influencia de la concentración inicial de celobiosa</i>	218
	<i>iv) Influencia de la concentración inicial</i>	

	de glucosa	221
	v) Influencia de la actividad de β -glucosidasa	221
	vi) Influencia del pH	224
	6.4.2.1. Modelo cinético para la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada	224
7.	CONCLUSIONES	235
8.	RECOMENDACIONES	239
9.	APENDICE	242
9.1.	DETERMINACION DE LAS ACTIVIDAD DE β -GLUCOSIDASA	243
9.1.1.	MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA EN DISOLUCION ..	243
9.1.2.	MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA ...	244
9.1.3.	OBTENCION DE LA RECTA PATRON PARA EL ANALISIS DE ACTIVIDAD DE β -GLUCOSIDASA	245
9.2.	ANALISIS DE GLUCOSA Y CELOBIOSA	247
9.2.1.	OBTENCION DE LA CURVA DE CALIBRADO DE GLUCOSA Y CELOBIOSA	251
9.3.	CARACTERIZACION DE LA β -GLUCOSIDASA DE <i>Penicillium funiculosum</i> : PERFILES DE pH Y TEMPERATURA	251
9.3.1.	PERFIL DE pH	251
9.3.2.	PERFIL DE TEMPERATURA	253
9.4.	CALCULO DE UN EXPERIMENTO COMPLETO	255
10.	BIBLIOGRAFIA	258

La investigación objeto del presente trabajo, forma parte de un programa, que se viene desarrollando en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, sobre el aprovechamiento de la biomasa como fuente alternativa de energía.

La tradición agrícola y forestal de nuestro país, permite disponer de grandes cantidades de residuos lignocelulósicos, como paja de cereales, residuos de poda, etc. Una de las posibilidades de aprovechamiento de estos materiales consiste en su transformación via hidrólisis enzimática, para obtener azúcares reductores fácilmente fermentables a etanol, butanol, ácido acético, acetona, ácido láctico, etc.

La hidrólisis enzimática exige una etapa previa consistente en la obtención del complejo enzimático celulasas por fermentación de diferentes microorganismos, principalmente hongos.

Las celulasas constituyen un complejo enzimático formado por tres componentes principales: β -1,4-endoglucanasa, β -1,4-exoglucanasa y β -glucosidasa. Esta última enzima cataliza la transformación de celobiosa en glucosa.

Aunque son muchos los microorganismos productores de dicho complejo enzimático, las investigaciones hasta ahora realizadas coinciden en señalar al hongo *Trichoderma reesei* como el principal productor del mismo. Sin embargo este hongo presenta el inconveniente de que sus caldos de fermentación proporcionan bajos niveles de la enzima β -glucosidasa, por lo que para evitar problemas de inhibición debido a altos niveles de celobiosa en el medio, sería recomendable la adición de β -glucosidasa suplementaria al medio de reacción para mejorar la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos.

Entre las posibles soluciones, la inmovilización de la enzima β -glucosidasa presenta determinadas ventajas entre las que se encuentran la posibilidad de reutilizar la enzima en diferentes sacarificaciones y el hecho frecuente de que la inmovilización conduce a un aumento de la estabilidad térmica y del tiempo de vida medio de la enzima.

Por ello se consideró interesante el estudio de la hidrólisis de celobiosa mediante β -glucosidasa de diferentes orígenes inmovilizada sobre diferentes soportes, comparándose los resultados con los obtenidos en la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa libre.

El programa de investigación planteado en el presente trabajo fue el siguiente:

1. Selección del método de inmovilización y del soporte más adecuados para llevar a cabo la inmovilización de β -glucosidasa.
2. Estudio de la influencia del origen de la β -glucosidasa empleada en la inmovilización
3. Estudio de la influencia de las variables de inmovilización.

4. Estudio de la desactivación térmica de la enzima, tanto libre como inmovilizada.
5. Estudio de la hidrólisis enzimática de celobiosa, tanto con la enzima libre como con la enzima inmovilizada. Concretamente se estudió la influencia de las siguientes variables:

Temperatura
 Concentración inicial de celobiosa
 Concentración inicial de glucosa
 Actividad enzimática inicial
 pH

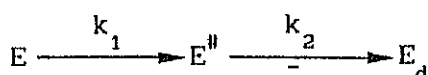
6. Estudio cinético de la hidrólisis de celobiosa con las enzimas libre e inmovilizada.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las siguientes condiciones de inmovilización:

- Origen de la β -glucosidasa: *Penicillium funiculosum*
- Soporte: Nylon en polvo
- Activación del soporte: Mediante o-alkilación durante 15 minutos con tetrafluoruro de trietiloxonio al 12.5 % en diclorometano, posterior aminoactivación durante 120 minutos con etilendiamina y activación final con glutaraldehído al 5 % en agua destilada durante 15 minutos.
- Inmovilización propiamente dicha: a 25 °C durante 15 horas empleando una disolución enzimática de actividad 1.17 UI/ml.

Empleando estas condiciones de activación e inmovilización se obtiene un soporte con una retención activa del 70 % y una elevada estabilidad térmica a 50 °C (97.6 % de la inicial al cabo de 25 horas).

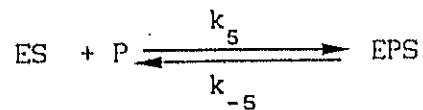
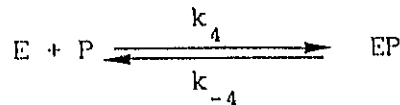
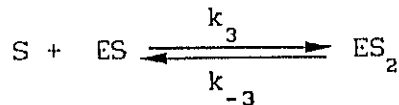
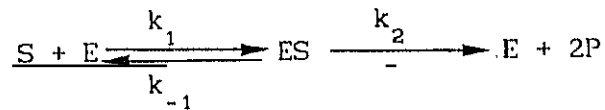
La inmovilización en las condiciones indicadas aumenta notablemente la estabilidad térmica de la enzima a todas las temperaturas estudiadas, siendo posible describir esta desnaturalización mediante dos modelos cinéticos diferentes, uno para la enzima libre, que supone la formación de un complejo intermedio de mayor actividad que la enzima primitiva, que evoluciona rápidamente hacia la forma inactiva:



y otro empírico para la enzima inmovilizada que consiste en el ajuste de los resultados obtenidos a una ecuación de tipo hiperbólico:

$$a(t) = 1 - \frac{B t}{C + t}$$

Para la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa tanto libre como inmovilizada, se ha propuesto el siguiente mecanismo de reacciones que implica efectos de inhibición por sustrato y por producto (de tipo competitivo):



Este mecanismo conduce a la siguiente ecuación de velocidad:

$$r = \frac{k_2' E_{total} S}{K_m + S + K_1 S P + K_2 P + K_3 S^2}$$

que reproduce los resultados experimentales con un error inferior al 10 %

2. INTRODUCCION

2.1. GENERALIDADES

La energía obtenida de la biomasa ha sido, con diferencia, la más utilizada por el hombre hasta el siglo XIX, a partir del cual empieza a ser progresivamente reemplazada por el carbón y el petróleo, de tal forma que, a mediados del presente siglo, si bien seguía siendo la principal fuente de energía del tercer mundo, su aportación a la estructura energética de los países desarrollados era prácticamente nula.

Tal y como indica el profesor Fernández (1989) se suele aplicar en un sentido estricto el término "biomasa" al "grupo de productos energéticos y materias primas de tipo renovable que se originan a partir de la materia orgánica formada por vía biológica". En este sentido, la biomasa comprende, además de la producida en los ecosistemas naturales, la de origen re-

sidual constituida principalmente por los residuos forestales, agrícolas y los residuos líquidos ganaderos, urbanos y algunos industriales, cuya carga orgánica es de origen biológico.

En el año 1973, con la primera crisis del petróleo, crece el interés por la sustitución de éste por otras fuentes de energía alternativas que pudieran suponer una mayor independencia de la sociedad respecto de los productos energéticos fósiles. Es entonces cuando la biomasa vuelve a revelarse como una de las alternativas más factibles a corto plazo y de mayor potencial, para realizar la deseada sustitución. Así, la aportación de la biomasa a la energía total consumida en los países industrializados, vuelve a alcanzar cotas significativas, prediciéndose una evolución creciente de la misma hasta el horizonte del año 2000 (tabla 2.1).

El primer gran paso en lo referente a la promoción de la biomasa frente a los combustibles fósiles lo dio Brasil con el establecimiento, en el año 1975, del denominado Programa Proalcohol. Su objetivo era llegar a sustituir la gasolina consumida en el país por etanol, obtenido por la fermentación del jugo de caña de azúcar.

TABLA 2.1

APORTACION AL CONSUMO ENERGETICO DE LA BIOMASA. PANORAMA INTERNACIONAL

(Fuente: Agencia Internacional de la Energía, 1983)

PAISES	CONSUMO ENERGETICO 1980 MTEC *	BIOMASA			
		CONSUMO ACTUAL		UTILIZABLE AÑO 2000	
		MTEC *	%	MTEC *	%
CANADA	362	6.700	1.8	22.000	6.0
DINAMARCA	27	0.041	0.2	1.200	4.4
ALEMANIA	388	2.060	0.5	-----	---
ITALIA	203	3.840	1.9	10.000	5.0
NORUEGA	34	0.810	2.4	1.700	5.0
PORTUGAL	15	0.780	5.2	1.400	9.3
SUECIA	68	3.770	5.5	6.200	9.1
U. S. A.	2583	36.000	2.0	204.000	8.0
ESPAÑA	104	2.600	2.4	8.000	7.7

* MTEC: Miles de Toneladas de carbón equivalentes

Por otra parte, a partir de los primeros años de la década de los 80, nuevas situaciones surgidas en el contexto internacional y en este momento la actual crisis del Golfo Pérsico, han añadido un interés renovado por la producción y uso de la biomasa con fines energéticos. En lo referente al medio ambiente, la utilización de la biomasa y productos derivados de ella como combustibles presenta una serie de ventajas frente al carbón y al petróleo, entre las que cabe citar el muy bajo o nulo contenido en azufre de los productos biomásicos (por lo general inferior al 0.1 % de su peso seco) y el hecho de que el CO_2 formado en su combustión no contribuya a aumentar la concentración de este producto en la biosfera, por provenir de una fijación previa de este CO_2 a cargo de las plantas verdes, durante el proceso de la fotosíntesis.

Otra circunstancia que determina, directa o indirectamente, el creciente interés por los usos energéticos de la biomasa son los enormes contingentes de excedentes agrícolas generados por muchos países, especialmente los más industrializados, como EEUU y la CEE. A fin de reducir los tremendos costes que supone la gestión de tales excedentes, los gobiernos de estos países han adoptado políticas diferentes, pero todas ellas contemplan el posible papel de la biomasa como fuente de energía y de productos de utilidad industrial (Instituto de la Ingeniería de España, 1981).

Además del caso de Brasil antes citado, en Estados Unidos se ha adoptado un extenso programa para la transformación de los excedentes de cereales en bioetanol, que se utiliza en mezclas con gasolina. Estos programas están teniendo una incidencia favorable sobre el medio ambiente, debido a las excelentes cualidades del etanol como combustible, tanto en forma pura como en mezclas con gasolina, en las que dado su elevado índice de octano, evita la utilización de plomo como agente antidetonante.

En nuestro país puede afirmarse que, en líneas generales, la evolución de la situación en lo referente a la utilización de la biomasa como fuente de energía ha sido comparable a la de otros países de la CEE, si bien dicha evolución se ha producido, en cada etapa, con un evidente retraso.

Entre los residuos químico-energéticos renovables derivados de la biomasa, adquieren una particular importancia, por su constitución y dis-

ponibilidad, los residuos lignocelulósicos. Entre ellos destacan:

- Paja de cereales (trigo, cebada, avena, arroz, etc.)
- Caña de maíz
- Residuos forestales
- Residuos de cultivos industriales (algodón, caña de azúcar...)
- Residuos sólidos urbanos

2.2. LOS RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS

Los residuos lignocelulósicos están constituidos principalmente por tres tipos de componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina, agrupándose los dos primeros bajo el nombre de holocelulosa, si bien, hay grandes diferencias entre ellos, en lo que a estructura y reactividad química se refiere.

Estos tres componentes suponen aproximadamente el 90 % del material lignocelulósico, incluyéndose en el 10 % restante, cenizas, humedad y otros productos químicos.

2.2.1. HIDROLISIS DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS:

La hidrólisis de los residuos lignocelulósicos tiene como finalidad la transformación de los polisacáridos que estos contienen en azúcares sencillos, fermentables a su vez a distintos productos de interés industrial, como etanol, acetona, butanol, etc. Esta hidrólisis puede llevarse a cabo tanto por vía química como por vía enzimática.

a) Hidrólisis química:

Puede realizarse mediante álcalis a presión (hidrólisis alcalina), en cuyo caso el proceso parece ser que transcurre a través de radicales libres, pudiendo aumentarse su velocidad mediante la adición de catalizadores, tales como magnesio y cobalto (Hagglund, 1951; Calbin, 1957; Wenzl, 1970).

También pueden emplearse ácidos, concentrados o diluidos, a temperatura relativamente elevada (150-250 °C). La hidrólisis ácida tiene el in-

conveniente de que los oligosacáridos obtenidos pueden hidrolizarse a su vez por la acción de los ácidos y a una velocidad mayor que la propia celulosa, por lo que el rendimiento en azúcares reductores suele ser muy pequeño (Saeman, 1945 y 1979; Wilke, 1981; Knapper, 1981).

b) Hidrólisis enzimática:

Durante la década de los 70, comenzaron a desarrollarse procesos de hidrólisis de celulosa basados en la actuación de un complejo enzimático denominado genéricamente *celulasas* (Suzuki, 1977; Emert, 1980), obtenido por fermentación de diversos microorganismos productores del mismo.

La hidrólisis enzimática de la celulosa es una reacción catalítica heterogénea, caracterizada por un reactivo insoluble (celulosa) y un catalizador soluble (complejo celulasas); la velocidad de reacción está influenciada tanto por la estructura de la celulosa como por el modo de actuación de las enzimas.

La hidrólisis enzimática presenta como principales ventajas (Martín, 1986):

- Condiciones suaves de temperatura (30-50 °C) y presión atmosférica.
- La no utilización de agentes químicos enérgicos, evitándose así la corrosión de los equipos y la degradación de los azúcares producidos. También se elimina la necesidad de recuperación de los mismos.
- Alta especificidad.

Existen, sin embargo, una serie de dificultades que han motivado que este proceso no se aplique todavía a escala industrial, entre las que se encuentran:

- La baja actividad específica de las enzimas.
- La lentitud del proceso debido a la propia estructura de los sustratos celulósicos nativos.

- La necesidad de recuperación de las enzimas del medio de reacción.

2.2.2. EL COMPLEJO ENZIMATICO CELULASAS:

El complejo enzimático celulasas está constituido por un conjunto de enzimas extracelulares pertenecientes al grupo de las carbohidrolasas, enzimas capaces de degradar los enlaces glicosídicos de los polisacáridos, liberando al medio glucosa y otros monosacáridos.

Está constituido al menos por catorce componentes, de los cuales destacan tres por su importancia (Eriksson, 1975; Fogarty, 1979):

- β -1,4-glucanohidrolasa (Endoglucanasa):

Hidroliza al azar los enlaces β -1,4-glicosídicos de la celulosa, consiguiendo una rápida reducción del grado de polimerización, pero obteniendo baja producción de azúcares reductores. Este sistema se inhibe competitivamente o no por la celobiosa y glucosa formadas.

- β -1,4-celobiohidrolasa (Exoglucanasa):

Actúa sobre la celulosa dando lugar a unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor de la cadena. Su acción es fundamental para la hidrólisis de las zonas cristalinas de la celulosa. Es inhibida competitivamente o no, tanto por la celobiosa formada como por la glucosa existente en el medio.

- β -glucosidasa (celobiasa):

Hidroliza específicamente la celobiosa para dar lugar a glucosa, siendo inhibida por esta y por la celobiosa presente en el medio.

Existen varias teorías sobre el mecanismo de actuación del complejo celulasas, la mayoría de ellas basadas en la acción conjunta de las enzimas antes indicadas. El más aceptado en la actualidad es el propuesto por Montenecourt y col. (1979), cuyo esquema se presenta en la figura 2.1.

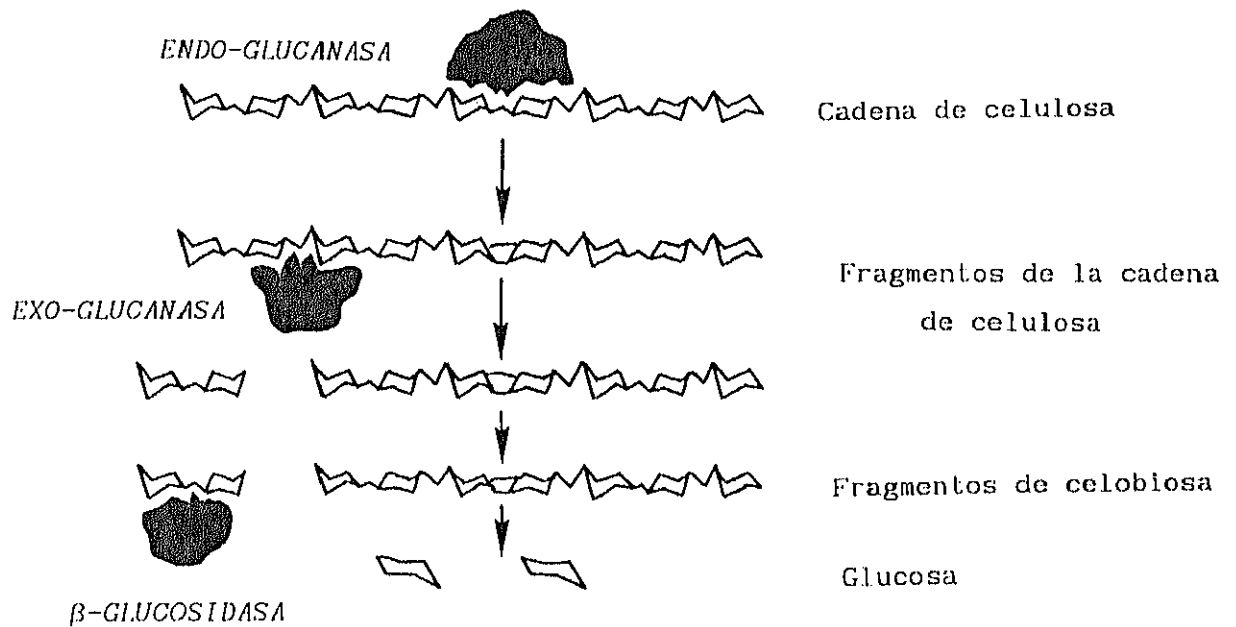


Figura 2.1. Esquema de Montencourt de actuación del complejo enzimático celulasas

Otra teoría sobre la actuación del complejo enzimático celulasas mantiene una acción diferenciada y sinérgica, de forma que es el conjunto del complejo enzimático el que solubiliza la celulosa. La endoglucanasa y la exoglucanasa hidrolizan las cadenas celulósicas en el interior o desde los extremos, respectivamente, produciendo finalmente celobiosa sobre la que actúa la β -glucosidasa liberando las moléculas de glucosa. El esquema del proceso se detalla en la figura 2.2 (Lee, 1980; Tyu, 1980).

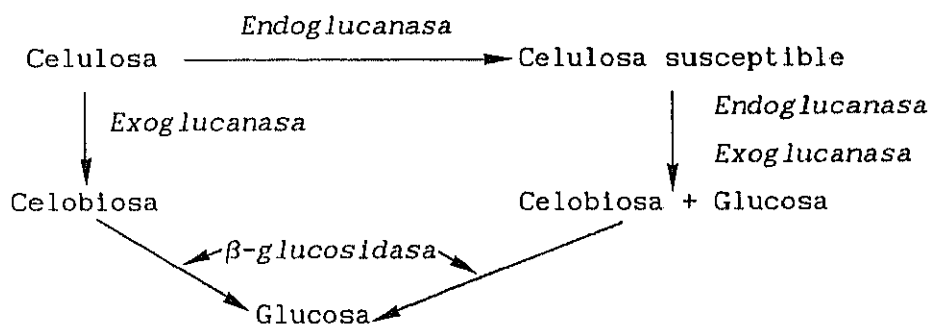


Figura 2.2. Esquema de actuación del complejo celulasas

2.2.3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DEL COMPLEJO CELULASAS:

Aunque son muchos los microorganismos (bacterias, actinomicetos y hongos) capaces de degradar materiales lignocelulósicos, son pocos los cultivos filtrados de los mismos que poseen actividad celulolítica (Mandels, 1978). En la tabla 2.2 se muestran los microorganismos más importantes productores de enzimas celulolíticas.

Los rendimientos en celulasas que se obtienen utilizando hongos, son superiores a los conseguidos con bacterias, por ello, gran parte de las investigaciones se centran en la producción del complejo enzimático a partir de hongos, principalmente de las especies *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Streptomyces*.

La comparación entre los datos proporcionados por diferentes autores sobre la producción de enzimas es siempre difícil y más aún en el caso de las celulasas ya que los ensayos de medidas de actividad no están estandarizados y cada método de análisis individual responde sólo a ciertas enzimas. Aún teniendo esto en cuenta, parece ser que es en los cultivos del hongo *Trichoderma reesei* donde se han alcanzado los más altos niveles de actividad celulolítica (Mandels, 1969).

Se ha conseguido aumentar la actividad enzimática de los caldos de cultivo con la selección de mutantes de la cepa salvaje del *Trichoderma reesei* QM-6a. Entre ellos cabe destacar el QM-9414, NG-14, Rut C-30 y MCG-77, cuyas actividades celulásicas se detallan en la tabla 2.3 (Andreotti, 1980).

TABLA 2.2
PRINCIPALES MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS

BACTERIAS:

<i>Cellvibrio fulvus</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Cellvibrio vulgaris</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Cellulomonas</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Clostridium thermocellulaseum</i>	Anaerobio	Termófilo

ACTINOMICETOS:

<i>Streptomyces</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Thermoactinomycece</i>	Aerobio	Termófilo
<i>Thermonospora curvata</i>	Aerobio	Termófilo
<i>Thermonospora fusca</i>	Aerobio	Termófilo

HONGOS:

<i>Aspergillus niger</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Pestalotiopsis mesterdijkii</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Penicillium friensis</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Penicillium funiculosum</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Polyporus tulipiferse</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Fusarium solani</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Trichoderma reesei</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Trichoderma lignorum</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Trichoderma koningii</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Neurospora crassa</i>	Aerobio	Mesófilo
<i>Sporotrichum pulverulentus</i>	Aerobio	Termófilo
<i>Sporotrichum pruinosum</i>	Aerobio	Termófilo
<i>Sporotrichum dimorphosporum</i>	Aerobio	Termófilo
<i>Sporotrichum thermofilum</i>	Aerobio	Termófilo
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Aerobio	Termófilo

TABLA 2.3
ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS CALDOS DE DIFERENTES CEPAS DEL
HONGO TRICHODERMA REESEI

Cepa	Sustrato 6 %	Proteína soluble mg/ml	Actividad celulásica CMC UI/ml
QM-6a	Lactosa	0.9	8
	Pulpa molida	0.8	76
	Algodón	7.4	88
QM-9414	Lactosa	0.9	10
	Pulpa molida	8.7	178
	Algodón	13.6	109
MCG-77	Lactosa	3.7	36
	Pulpa molida	9.6	125
	Algodón	16.2	104
Rutgers MG-14	Pulpa molida	14.4	No presenta actividad
	Algodón	21.2	133
Rutgers C-30	Lactosa	3.5	27
	Pulpa molida	17.8	116
	Algodón	20.8	181

Sin embargo, aunque estos microorganismos producen altos niveles de actividad celulolítica, los niveles de β -glucosidasa extramicelial producidos en los cultivos filtrados de los mismos son bajos y de relativamente poca estabilidad térmica (Woodward, 1982). Por ello, y con el fin de evitar la inhibición que provocaría una elevada concentración de celobiosa, es preciso complementar el complejo con β -glucosidasa obtenida a partir de otros microorganismos o incluso de fibras vegetales. Esta β -glucosidasa puede ser adicionada al medio tanto en forma libre como inmovilizada.

2.2.4. PRODUCCION DE β -GLUCOSIDASA:

Los estudios hasta ahora realizados sobre la producción de β -glucosidasa por diferentes organismos se han centrado en la búsqueda de aquellos microorganismos capaces de producir altas cantidades de esta enzima recuperables del medio de cultivo.

El hongo *Aspergillus niger* es superior a muchos otros microorganismos, incluido el *Trichoderma reesei*, en lo que se refiere a la producción de β -glucosidasa extracelular. Además la β -glucosidasa producida por *A. niger* es particularmente atractiva por su elevada actividad frente a la celobiosa (Sternberg, 1977).

También se han detectado altos niveles de β -glucosidasa en los cultivos del hongo *Penicillium funiculosum* (Lachke, 1983; 1986) y del hongo *Neurospora crassa*, en cuyos cultivos puede ser inducida por celobiosa 1 mM (Eberhart, 1973) o por concentraciones de celulosa cristalina superiores al 20% (Woodward, 1990).

Sin embargo, la obtención a escala industrial de β -glucosidasa suele realizarse, habitualmente, a partir de las almendras dulces. La β -glucosidasa de almendras es fácil de purificar pues no se presenta acompañada de las restantes enzimas celulolíticas existentes en los sistemas comentados anteriormente, pero posee una estabilidad térmica muy baja y escasa afinidad por la celobiosa como sustrato.

También se ha intentado aumentar la proporción de β -glucosidasa del complejo celulasas producido por el hongo *T. reesei*, mediante el empleo de inductores como la Sepharosa, lográndose un aumento de hasta el 45 % de actividad extramcelial empleando concentraciones de Sepharosa entre 10^{-2} y 10^{-1} M (Mandels, 1960; Nisizawa, 1971).

2.3. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELOBIOSA

2.3.1. CATALISIS ENZIMATICA

Las enzimas son catalizadores biológicos específicos y están sujetas a las mismas restricciones cinéticas y termodinámicas que los catalizado-

res químicos, es decir, modifican la velocidad a la que tiene lugar una reacción pero no el punto final del equilibrio entre el sustrato y el producto.

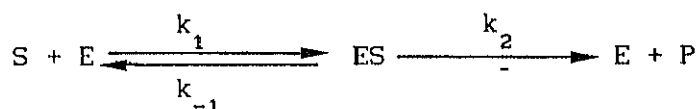
A lo largo de una reacción enzimática, generalmente es posible distinguir tres etapas. En la primera, que es prácticamente instantánea, la concentración de enzima libre cae bruscamente, debido a que la mayor parte de la misma se combina con el sustrato para formar un complejo enzima-sustrato. En la segunda etapa, se alcanza la máxima actividad enzimática, ya que una vez transformada la molécula de sustrato, la enzima puede unirse rápidamente a otra molécula del mismo formando un nuevo complejo enzima-sustrato. Esta etapa continua mientras la concentración de sustrato en el medio es superior a la concentración de enzima. En la última etapa de la reacción, la concentración de sustrato aparece apreciablemente disminuida y por esta razón la velocidad de reacción cae asintóticamente. Esta fase es especialmente importante en algunos procesos industriales en los que se busca la conversión total con el fin de hacer máxima la producción y la concentración de producto obtenidas, por lo que la interacción entre variables como la concentración de sustrato y producto y las condiciones de reacción es muy importante. Esta última fase suele ocupar la mayor parte del tiempo de reacción.

La actividad catalítica de las enzimas depende, fundamentalmente de dos factores: la forma en que se lleve a cabo la unión entre la enzima y el sustrato para dar lugar al complejo enzima-sustrato y la naturaleza polifuncional de su centro activo en el que diferentes grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo, sulfhidrilo, amino e imidazol) junto con algunos ligandos metálicos, participan, de forma combinada, en la unión entre la enzima y el sustrato. Cada uno de estos grupos funcionales es, individualmente, un agente bastante pobre, sin embargo su acción se ve facilitada primero por la hidrofobidad del centro activo de la enzima que tiende a expulsar el agua para aumentar la velocidad de la reacción, de naturaleza orgánica, que tiene lugar; segundo, por la capacidad de la enzima para atraer las moléculas de sustrato aumentando su concentración en la zona próxima al centro activo y, por tanto, aumentando la velocidad de reacción.

Otra dificultad importante en el estudio de la catálisis enzimática, es que la reacción tiene lugar en el centro activo de la enzima, por lo que es necesario que el sustrato llegue a este punto y se una, covalentemente, con los grupos activos que en él existen, pasando a formar parte de la propia molécula, por lo que además de la reacción propiamente dicha es necesario tener en cuenta otros pasos que pueden modificar de forma importante la velocidad de reacción.

2.3.2. CINETICA ENZIMATICA

Para explicar la conversión de un sustrato en un único producto por la acción de una enzima, se suele aplicar el siguiente esquema general de reacción:



Cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que la de enzima, la velocidad de reacción es de orden cero con respecto a los reactivos, es decir, depende únicamente de la concentración de enzima presente. De esta forma, la velocidad de reacción permanece prácticamente constante hasta que la mayor parte del sustrato se ha consumido; a partir de este momento, la velocidad pasa a ser dependiente de la concentración de sustrato existente en el medio y de primer orden con respecto a la misma.

La cinética enzimática puede describirse por la bien conocida ecuación de Michaelis-Menten que tiene en cuenta la formación de un complejo intermedio enzima-sustrato:

$$r = \frac{k_2 [E] [S]}{[S] + K_m} \quad [2.1]$$

donde $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ y representa la concentración de sustrato que proporciona una velocidad de reacción igual a la mitad de la velocidad de reacción máxima. Esta velocidad máxima será por tanto:

$$r_{\max} = k_2 [E] \quad [2.2]$$

Los valores de los parámetros K_m y r_{\max} pueden determinarse mediante la linearización de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{K_m}{r_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad [2.3]$$

Este tipo de representación se denomina de Lineweaver-Burk (figura 2.3).

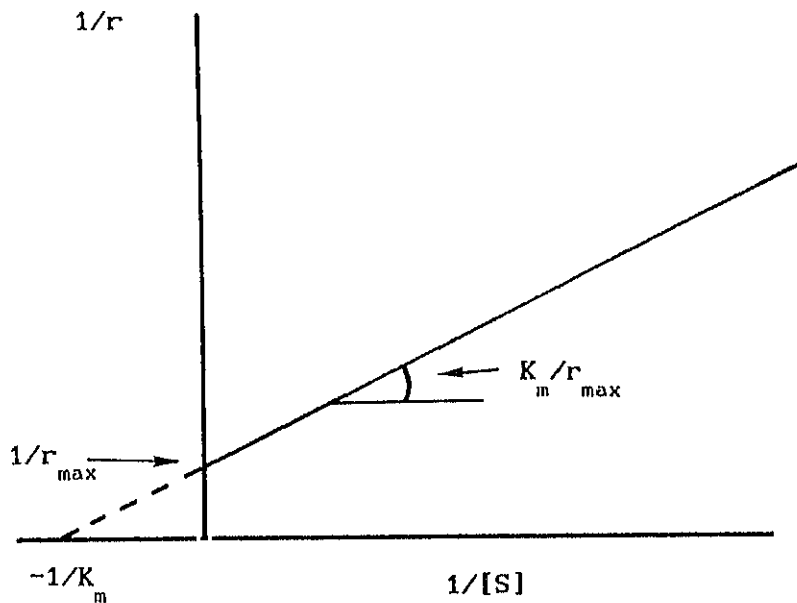


Figura 2.3. Linearización de Lineweaver-Burk

Algunas veces es más sencillo utilizar una versión adimensional de la ecuación de Michaelis,

$$\gamma = \frac{\sigma}{1+\sigma} \quad [2.4]$$

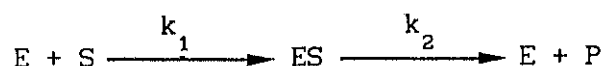
donde $\gamma = r/r_{\max}$ y $\sigma = [S]/K_m$

Generalmente la etapa controlante suele ser, la de descomposición del complejo enzima-sustrato para dar enzima libre y moléculas de producto. En estos casos, la constante k_2 es muy pequeña y K_m es aproximadamente igual a k_{-1}/k_1 y por tanto igual a K_s , constante de disociación del complejo enzima-sustrato. Puesto que bajo estas condiciones, k_2 controla la velocidad de reacción, a menudo se denomina k_{cat} (constante catalítica) y representa el número de turnover de la enzima, que es una medida de su actividad frente a una determinada reacción a temperatura ambiente y que se mide en moles de sustrato/centro activo/tiempo.

La cinética de Michaelis-Menten supone que tanto enzima como sustrato son solubles en el medio de reacción, sin embargo esto no siempre ocurre en los procesos industriales, donde a menudo se utilizan sustratos sólidos o líquidos muy viscosos o concentrados.

La presencia de varios sustratos y productos participando en la reacción conducen a mayores complicaciones en la descripción cinética de las reacciones enzimáticas. En estos casos, aunque la cinética está basada en la ecuación de Michaelis-Menten, las expresiones a que se llega se hacen muy complejas, no siendo posible el cálculo de los parámetros característicos mediante linerizaciones del tipo Lineweaver-Burk, requiriendo, a menudo, el uso de técnicas matemáticas mucho más complejas. Sin embargo, en el caso de que uno de los sustratos se encuentre en gran exceso respecto del resto, se simplifica el tratamiento, ya que esta concentración se convierte en el factor limitante de la velocidad de reacción, pudiéndose desprestigiar el efecto que sobre la velocidad ejercen los restantes sustratos presentes en el medio.

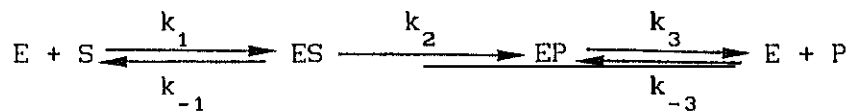
Van Slyke y Cullen en 1914 propusieron un nuevo mecanismo, cuya principal diferencia radica en considerar el primer paso del proceso como una reacción irreversible, según el esquema de reacciones:



que proporcionan una ecuación de velocidad igual a la de Michaelis-Menten pero con un significado diferente de K_m :

$$K_m = \frac{k_2}{k_1} \quad [2.5]$$

Un último mecanismo más general, basado en la analogía de las enzimas con los catalizadores sólidos utilizados habitualmente en reacciones heterogéneas, incluye un paso de adsorción y otro de desorción, ambos reversibles, mientras que la reacción propiamente dicha se considera irreversible. Este mecanismo basado en los propuestos por Langmuir-Hinshelwood (1940) y Hounge-Watson (1947), está constituido por el siguiente esquema de reacciones:



y conduce a la siguiente expresión para la velocidad de reacción:

$$r = \frac{r_{\max} S}{1 + K_{\text{ads}} S + K_{\text{des}} P} \quad [2.6]$$

donde

$$K_{\text{ads}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{1}{K_m} \quad [2.7]$$

$$K_{\text{des}} = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad [2.8]$$

2.3.3. INHIBICION ENZIMATICA

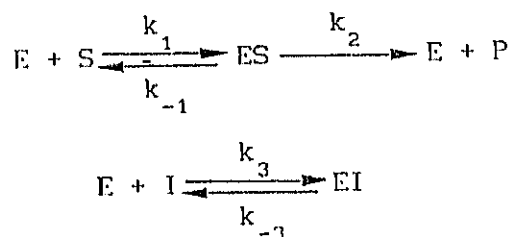
La presencia de sustancias extrañas o incluso de elevadas concentraciones de sustrato o producto en el medio de reacción, puede provocar una disminución de la actividad enzimática e incluso su total desaparición. Este efecto de pérdida de actividad se denomina *inhibición*, y la sustancia que lo provoca *inhibidor*.

La inhibición de una enzima puede ser reversible o irreversible. Cuando la inhibición es reversible, la actividad inicial de la enzima puede recuperarse eliminando el inhibidor por métodos físicos (diálisis, fil-

tración mediante un gel, etc.), ya que se trata simplemente de un equilibrio químico entre la enzima y el inhibidor que puede ser desplazado a favor de la primera. Sin embargo, la inhibición irreversible consiste en la pérdida definitiva de la actividad de la enzima tras un periodo de tiempo en presencia del inhibidor. No es posible recuperar la actividad enzimática mediante tratamientos físicos, sin embargo puede ser posible su recuperación mediante tratamientos químicos adecuados. A continuación nos ocuparemos, únicamente de la inhibición reversible dentro de la cual pueden distinguirse varios tipos:

i) Inhibición competitiva:

También llamada "inhibición por afinidad" ya que inhibidor y sustrato compiten por un mismo centro activo de la enzima. Generalmente el inhibidor presenta importantes semejanzas estructurales con el sustrato específico de la enzima, pero no se une a esta si su centro activo está ocupado por una molécula de sustrato. El mecanismo puede describirse por el siguiente esquema de reacciones:



y la expresión para la velocidad de reacción toma la forma:

$$r = \frac{r_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad [2.9]$$

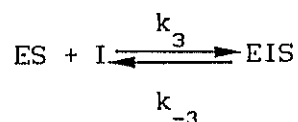
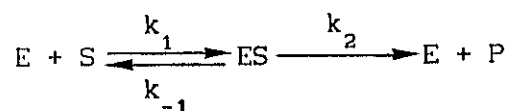
donde:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad [2.10]$$

ii) Inhibición acompetitiva:

Este tipo de inhibición se presenta cuando el inhibidor sólo se une

al complejo enzima-sustrato. El mecanismo de reacciones propuesto sería el siguiente:



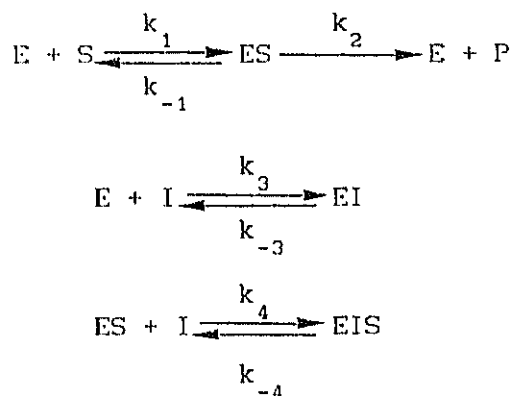
Para este sistema es sencillo demostrar que:

$$r = \frac{r_{\max} [S]}{K_m + [S] \{1 + ([I]/K_I)\}} \quad [2.11]$$

donde K_I tiene el mismo significado que en el Apartado anterior.

iii) Inhibición no competitiva:

También denominada "inhibición sin afinidad" ya que el inhibidor no se une al centro activo de la enzima sino a algún otro punto de la misma. Este inhibidor se puede unir tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato para dar los complejos EI y ESI. Este proceso puede describirse según el siguiente mecanismo:



con una velocidad de reacción expresada por:

$$r = \frac{r_{\max} [S]}{\{ 1 + ([I]/K_I) \} (K_S + [S])} \quad [2.12]$$

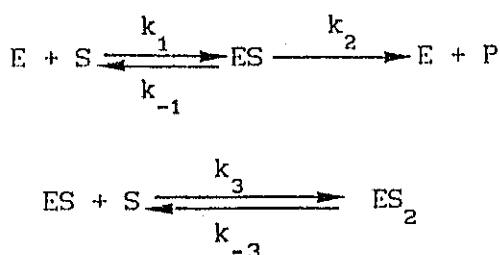
donde:

$$K_S = k_{-1}/k_1 \quad [2.13]$$

$$K_I = k_{-3}/k_3 = k_{-4}/k_4 \quad [2.14]$$

iv) *Inhibición por sustrato:*

Puede tener lugar cuando existen altas concentraciones de sustrato en el medio de reacción y se debe a la unión del complejo enzima-sustrato con una molécula de sustrato formandose un complejo sustrato-enzima-sustrato improductivo. El esquema de reacciones para este mecanismo sería de la forma:



con una velocidad de reacción:

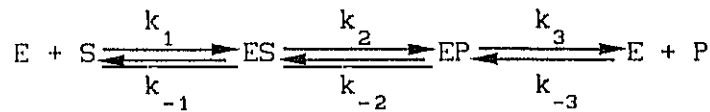
$$r = \frac{r_{\max} [S]}{[S] + K_m + [S]^2/K_s} \quad [2.15]$$

donde:

$$K_s = k_{-3}/k_3 \quad [2.16]$$

v) *Inhibición por producto:*

La presencia de elevadas concentraciones del producto resultante de una determinada reacción enzimática, puede provocar la inhibición de la enzima mediante cualquiera de los tipos de inhibición anteriormente citados, con la única diferencia de que el inhibidor I es ahora el producto P. Además existe otro posible mecanismo de inhibición mediante la formación de un complejo enzima-producto en equilibrio con el producto final. El mecanismo de reacciones sería entonces:



En este caso se obtiene una expresión para la velocidad mucho más compleja que en los anteriores tipos de inhibición estudiados:

$$r = \frac{r_{\max}^* \{ [S] - ([P]/K_{eq}) \}}{K_s + [S] + (K_s/K_p)[P]} \quad [2.17]$$

donde:

$$r_{\max}^* = \frac{k_2 k_3 [E_0]}{(k_{-2} + k_3 + k_2)} \quad [2.18]$$

$$K_s = \frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_1 (k_2 + k_{-2} + k_3)} \quad [2.19]$$

$$K_p = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_{-3}(k_{-1} + k_2 + k_{-2})} \quad [2.20]$$

$$K_{eq} = \frac{K_p}{K_s} \quad [2.21]$$

Si se intenta ajustar una reacción enzimática con inhibición a la ecuación de Michaelis-Menten, los efectos observados según el tipo de inhibición que tiene lugar en cada caso, son los siguientes:

- Si la inhibición es competitiva se obtiene un valor aparente de K_m mayor del esperado.

- Si la inhibición es acompetitiva se obtienen valores aparentes diferentes de los esperados para ambos parámetros, pero manteniéndose siempre una relación constante entre ambos.

- Si la inhibición es no competitiva se obtienen valores aparentes de K_m mayores de lo esperado y valores aparentes de r_{max} menores de lo esperado.

- Si la inhibición es por sustrato, se observa una disminución drástica de la velocidad para valores grandes de S, sin cambios apreciables a bajos valores de S.

2.3.4. VARIABLES QUE INFLUYEN SOBRE LA CINETICA ENZIMATICA: pH Y TEMPERATURA

1) Efecto del pH:

En general las enzimas poseen un pH óptimo de actuación bien definido, ya que, como otras proteínas, poseen muchos grupos ionizables por lo que los cambios de pH pueden alterar su conformación, y por lo tanto se modifican los grupos funcionales de los centros activos, lo que puede repercutir en el tipo de unión enzima-sustrato. Estos efectos pueden provocar cambios en la velocidad máxima de reacción (r_{max}), en la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m) o en la estabilidad de la enzima. Esta última alteración dependerá del tiempo de contacto de la enzima con el me-

dio de pH desfavorable y puede llegar a ser permanente si este tiempo es suficientemente elevado.

ii) Efecto de la temperatura:

Las reacciones catalizadas por enzimas, al igual que otras reacciones químicas, aumentan su velocidad con la temperatura. Este efecto se puede describir mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad [2.22]$$

donde k es la constante de velocidad de reacción, A el factor preexponencial, E_a la energía de activación, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. Las energías de activación para las reacciones catalizadas por enzimas están normalmente dentro del intervalo 4-20 kcal/mol. La temperatura también influye sobre la estabilidad de la enzima cuyas energías de desactivación (energía de activación de las reacciones de desnaturalización térmica de proteínas) oscilan entre 40-130 kcal/mol por lo que la temperatura óptima estará determinada en cada caso por la resultante de estos dos efectos.

2.3.5. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA LIBRE E INMOVILIZADA:

Dada la gran variedad de procedencias para la enzima β -glucosidasa (hongos, bacterias y tejidos vegetales), así como la abundante información bibliográfica publicada durante los últimos años, resulta difícil unificarla y obtener conclusiones de validez general.

A modo de ejemplo, en la tabla 2.4, se presenta un resumen de los parámetros característicos correspondientes a β -glucosidasa de diferentes orígenes, pudiéndose observar las notables diferencias en sus valores.

Así, se observa que el pH óptimo está comprendido entre 3 y 7, y la temperatura óptima entre 50 y 70 °C, siendo la primera la más frecuente. La afinidad frente a la celobiosa, medida por el parámetro cinético K_m , varía ampliamente según la β -glucosidasa utilizada. La velocidad máxima de reacción, $r_{máx}$, varía también de forma apreciable aunque estas variaciones

TABLA 2.4
PARAMETROS CARACTERISTICOS DE β -GLUCOSIDASA

ENZIMA LIBRE:					
	pH _{opt}	T _{opt}	K _m	r _{max}	REFERENCIA
HONGOS:					
<i>T. reesei</i>	----	----	1.5	----	Sternberg, 1976
<i>T. reesei</i>	4.75	50.0	2.6	----	Gong, 1977
<i>T. reesei</i>	4.80	50.0	5.6	----	Hong, 1981
<i>T. reesei</i>	6.50	----	3.3	----	Inglin, 1980
<i>T. reesei</i>	4.80	50.0	1.9	----	Woodward, 1981
<i>P. etchellsii</i>	6.50	50.0	12.2	1.33	Jain, 1984
<i>T. pullulous</i>	----	----	15.5	1.90	Adami, 1988
<i>P. funiculosum</i>	----	----	2.0	0.40	Rao, 1983
<i>A. phoenicis</i>	4.50	60.0	0.8	----	Bisset, 1978 a
<i>A. phoenicis</i>	3-4	----	0.8	1.60	Sundstrom, 1981
<i>A. niger</i>	3.5-6	----	1.7	0.29	Woodward, 1982
<i>A. niger</i>	----	----	1.1	20.83	Alfani, 1987
<i>A. fumigatus</i>	4-5	----	0.8	----	Rudick, 1975
BACTERIAS:					
<i>T. ethanolicus</i>	5-7	70.0	4.2	----	Mitchell, 1982
<i>C. thermocellum</i>	6.00	65.0	83.0	----	Ait, 1979
<i>B. succinogenes</i>	6.80	----	4.3	----	Groleau, 1981
TEJIDOS VEGETALES:					
<i>Almendras</i>	5.50	----	9.3	3.17	Sarkar, 1983
	5.60	----	2.3	4.17	Miyairi, 1979
	5.50	----	118.8	6.88	Vernardos, 1980
ENZIMA INMOVILIZADA:					
	pH _{opt}	T _{opt}	K _m	r _{max}	REFERENCIA
HONGOS:					
<i>P. etchellsii</i>	----	----	31.0	1.05	Jain, 1984
<i>T. pullulous</i>	----	----	62.0	0.79	Adami, 1988
<i>P. funiculosum</i>	----	----	4.0	0.16	Rao, 1983
<i>A. phoenicis</i>	4.50	75.0	4.4	----	Bisset, 1978 a
<i>A. phoenicis</i>	3-4	----	2.7	1.03	Sundstrom, 1981
<i>A. niger</i>	3.5-6	----	1.7	0.22	Woodward, 1982
			1.2	0.11	
			1.1	0.10	
<i>A. niger</i>	----	----	1.7	10.33	Alfani, 1987
			2.4	5.40	
TEJIDOS VEGETALES:					
<i>Almendras</i>	5.5-6.5	----	97.0	0.29	Sarkar, 1983
	5.80	----	3.9	1.70	Miyairi, 1979
	5.50	----	216.0	1.30	Vernardos, 1980

no siempre concuerdan con las observadas en K_m . Para la enzima inmovilizada se observa que, en general K_m aumenta tras la inmovilización pero en diferente proporción según el origen de la enzima. Por el contrario r_{max} disminuye en todos los casos.

Por otra parte, los resultados obtenidos por otros autores parecen indicar que la importancia de la inhibición por sustrato está determinada por la procedencia y pureza de la enzima. Así, Gong y col. (1977) aislaron tres fracciones de enzima procedente de *T. reesei* y encontraron que sólo una de ellas parece presentar inhibición por sustrato a concentraciones de celobiosa superiores a 20 mM.

Sternberg (1976) observó que las preparaciones crudas procedentes de *T. reesei* no presentan inhibición por sustrato, y sí cuando se purifican posteriormente.

Bisset y col. (1978 a) y Sternberg (1977) indican que en el caso de la enzima obtenida a partir del hongo *A. phoenicis* se detecta inhibición por sustrato a concentraciones superiores a 10 mM.

Woodward y col. (1981) no encontraron inhibición por producto para la enzima procedente de *T. reesei* para concentraciones de celobiosa inferiores a 20 mM.

También el mecanismo para explicar la inhibición por producto parece depender de la procedencia de la enzima. Así, Gong y col. (1977) y Hong y col. (1981) encontraron que la inhibición es de tipo no competitivo, utilizando β -glucosidasa procedente de *T. reesei*. A la misma conclusión llegan Jain y col. (1984) para la enzima procedente de *Pichia etchellsii*, mientras que Bisset y col. (1978 b) con respecto a la enzima procedente del *A. phoenicis* y Woodward y col. (1981) con la de *T. reesei* determinan que la inhibición por producto es competitiva.

El estudio cinético realizado por Camacho y col. (1987) sugiere inhibición débil por sustrato e inhibición por producto de tipo parabólico que se describe según un mecanismo diferente a los clásicos anteriormente mencionados.

2.4. DESNATURALIZACION ENZIMATICA

Una de las características biotecnológicas más importantes de una enzima es su estabilidad. Puesto que las condiciones en los reactores enzimáticos pueden ser desfavorables para las enzimas (temperatura, pH, presencia de impurezas inactivantes, abrasión, etc.), la mayor parte de ellas no son suficientemente estables en las condiciones de operación. Sin embargo, se conoce relativamente poco sobre los mecanismos de desactivación, por lo que encontrar métodos para aumentar la estabilidad resulta frecuentemente tarea compleja.

Entre las posibles causas de la pérdida de actividad enzimática el calor es, con diferencia, la principal en los reactores industriales, ya que, a menudo, es necesario operar a elevadas temperaturas, con el fin de aumentar la conversión y evitar la contaminación microbiana. Aunque los detalles del mecanismo de desnaturalización térmica de las enzimas no están totalmente esclarecidos, si se conocen determinados aspectos. Por ejemplo, no existe ninguna duda de que la inactivación térmica implica importantes cambios conformacionales en las moléculas de proteína debido a la ruptura de parte de los enlaces de hidrógeno y a veces, incluso de los enlaces sulfuro, que contribuyen al mantenimiento de las estructuras secundaria y terciaria, y cuando la poseen, de la cuaternaria y que son responsables de su actividad específica. A consecuencia de estos cambios las moléculas de proteína resultan parcialmente deformadas como se observa en la figura 2.4 (Klibanov, 1983). Por el contrario, tras la desnaturalización térmica no suelen presentarse importantes cambios en los enlaces covalentes que forman la base de la proteína. Si una disolución caliente de proteína se enfría lentamente, hasta su temperatura biológica habitual, puede tener lugar el proceso inverso o renaturalización, con restauración de la función de la enzima.

La cinética del proceso de desnaturalización puede describirse mediante diferentes mecanismos, más o menos complejos. Los más sencillos consisten en suponer un paso directo desde un estado inicial, con una determinada estructura activa, hasta una final, totalmente inactiva. La cinética de este tipo de proceso es, generalmente, irreversible y de primer orden, según una expresión de la forma:

$$- \frac{dE}{dt} = k_d E \quad [2.23]$$

donde E representa la actividad de la enzima y k_d la constante cinética de desactivación. Este tipo de mecanismo, "en un paso", resulta adecuado para describir la desactivación de moléculas de enzima que posean una única configuración activa, por lo que su destrucción es suficiente para hacer desaparecer la actividad enzimática (Reiner, 1969).

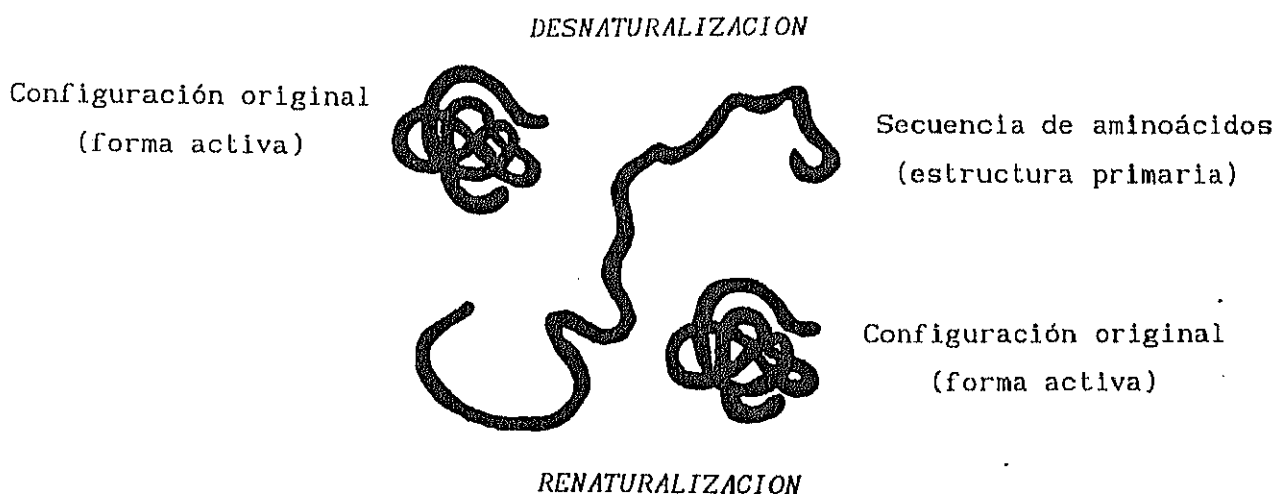


Figura 2.4. Esquema de desnaturalización y renaturalización de una enzima

En ocasiones, debido a la compleja naturaleza de las moléculas de enzima, la constante de desactivación, k_d , del proceso de primer orden propuesto, no permanece constante, pudiendo aumentar o disminuir con el tiempo (Cardoso, 1978; O'Malley, 1973; Lemputten, 1974; Sadana, 1980).

Recientemente se ha demostrado (Gianfreda, 1984; Greco, 1985) que la desnaturalización puede ocurrir también a través de una serie de mecanismos que implican la existencia de una estructura nativa que otorga a la enzima su actividad, una intermedia, de actividad variable, y una final, totalmente degradada. La estructura intermedia no es única, sino que está constituida por una distribución de diferentes estructuras activas en equilibrio. Además, la actividad específica total de estas estructuras intermedias puede ser tanto mayor como menor que la de la enzima inicial.

2.5. INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Las enzimas inmovilizadas se definen como enzimas confinadas físicamente o localizadas en una determinada región del espacio con retención de su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente y de forma continuada.

Existen diferentes formas de clasificar los distintos tipos de enzimas inmovilizadas. Kennedy y Cabral (1983), proponen una clasificación basada en una combinación de la naturaleza de la interacción responsable de la inmovilización y la naturaleza del soporte que se presenta en la figura 2.5, en la que aparecen los métodos de inmovilización más comúnmente utilizados.

2.5.1. MÉTODOS PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS:

Durante los últimos años el número de métodos para la inmovilización de enzimas ha aumentado de forma espectacular. A continuación se describen los más habituales.

i) Atrapamiento:

El método de inmovilización por atrapamiento se basa en la oclusión de la enzima en el interior de una membrana o matriz de polímero con el fin de impedir la pérdida de proteína permitiendo la entrada de sustrato y salida de producto. Esto restringe la aplicación del método a reacciones que implican moléculas de sustrato y producto relativamente pequeñas.

Puesto que la enzima no se une a la membrana o matriz, el método se puede aplicar a cualquier tipo de enzima sin pérdida apreciable de sus propiedades y escasa destrucción de su actividad biológica. El atrapamiento se puede subdividir en atrapamiento en un gel, atrapamiento en fibra y microencapsulación.

a) Atrapamiento en un gel:

Consiste en la obtención de una forma insoluble de la enzima por atrapamiento de la misma en el interior de los espacios intersticiales du-

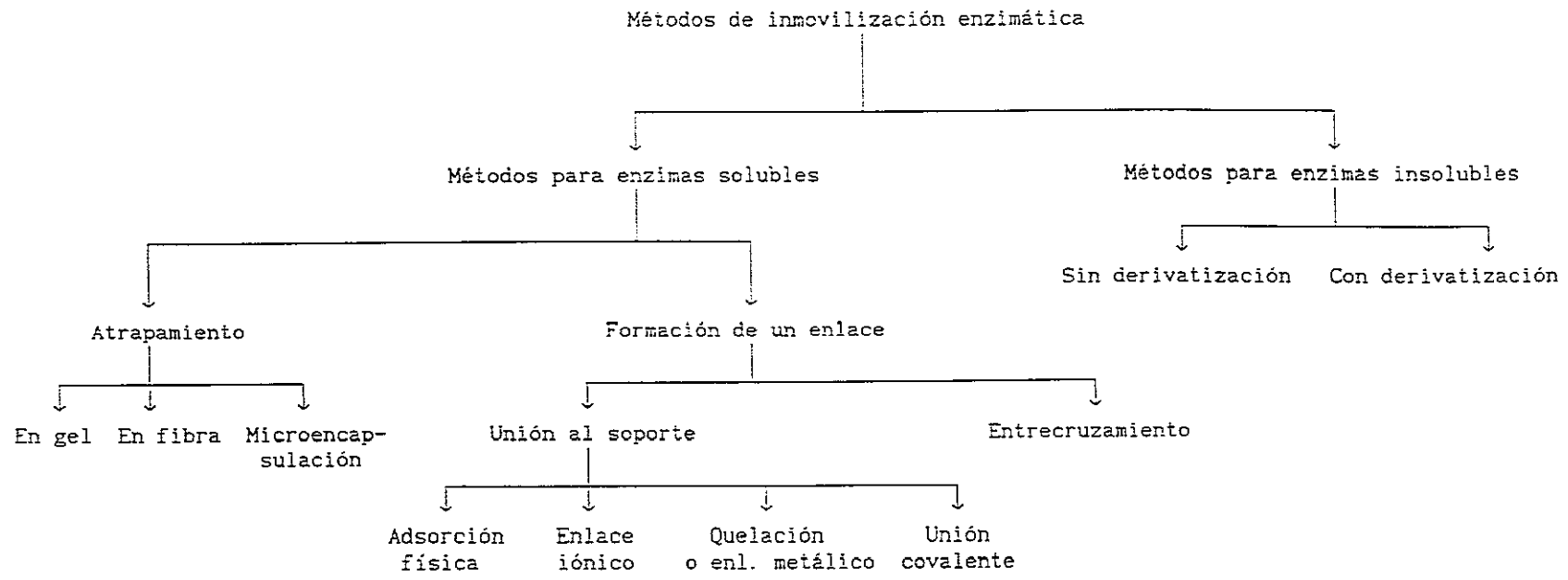


Figura 2.5. Clasificación de los principales métodos de inmovilización

rante la formación de un gel de polímero. El bloque de gel resultante puede dispersarse posteriormente mediante tratamientos mecánicos en partículas del tamaño deseado (figura 2.6 a).

b) Atrapamiento en fibra:

Este método constituye el atrapamiento de la enzima en las microcavidades de fibras sintéticas. Presenta algunas ventajas sobre el atrapamiento en gel. El uso de fibras muy finas proporciona grandes superficies específicas para la unión de la enzima, las fibras son resistentes a los ácidos y bases fuertes, a las altas fuerzas iónicas y a algunos disolventes orgánicos y, en función del polímero utilizado, presentan alta resistencia al ataque de los microorganismos (figura 2.6 b y c).

c) Microencapsulación:

Las enzimas microencapsuladas se forman confinando las enzimas en membranas semipermeables de polímero con forma esférica y diámetros en el intervalo entre 1-100 μm .

Este método de inmovilización presenta dos desventajas importantes: la posible inactivación de la enzima durante la microencapsulación y la necesidad de altas concentraciones de enzima. Las principales ventajas del método son: gran superficie específica y posibilidad de inmovilización simultánea de varias enzimas en un paso único (figura 2.6 d).

ii) *Inmovilización sobre soportes sólidos:*

La unión de una enzima a un soporte sólido es el método más antiguo y más utilizado para la inmovilización de enzimas. Dependiendo de la forma en que se lleve a cabo la unión entre la enzima y el soporte, puede subdividirse en: adsorción física, enlace iónico, quelación o enlace metálico y unión covalente. En cualquiera de estos métodos la selección del tipo de enlace así como del soporte insoluble empleado es de gran importancia. El soporte ideal para una aplicación determinada sería aquel capaz de facilitar la formación del complejo enzima-sustrato, de disminuir la inhibición por producto, de modificar el pH óptimo al valor deseado, de aumentar la estabilidad térmica de la enzima y de permitir que la enzima inmovilizada sea fácilmente recuperable para su reutilización.

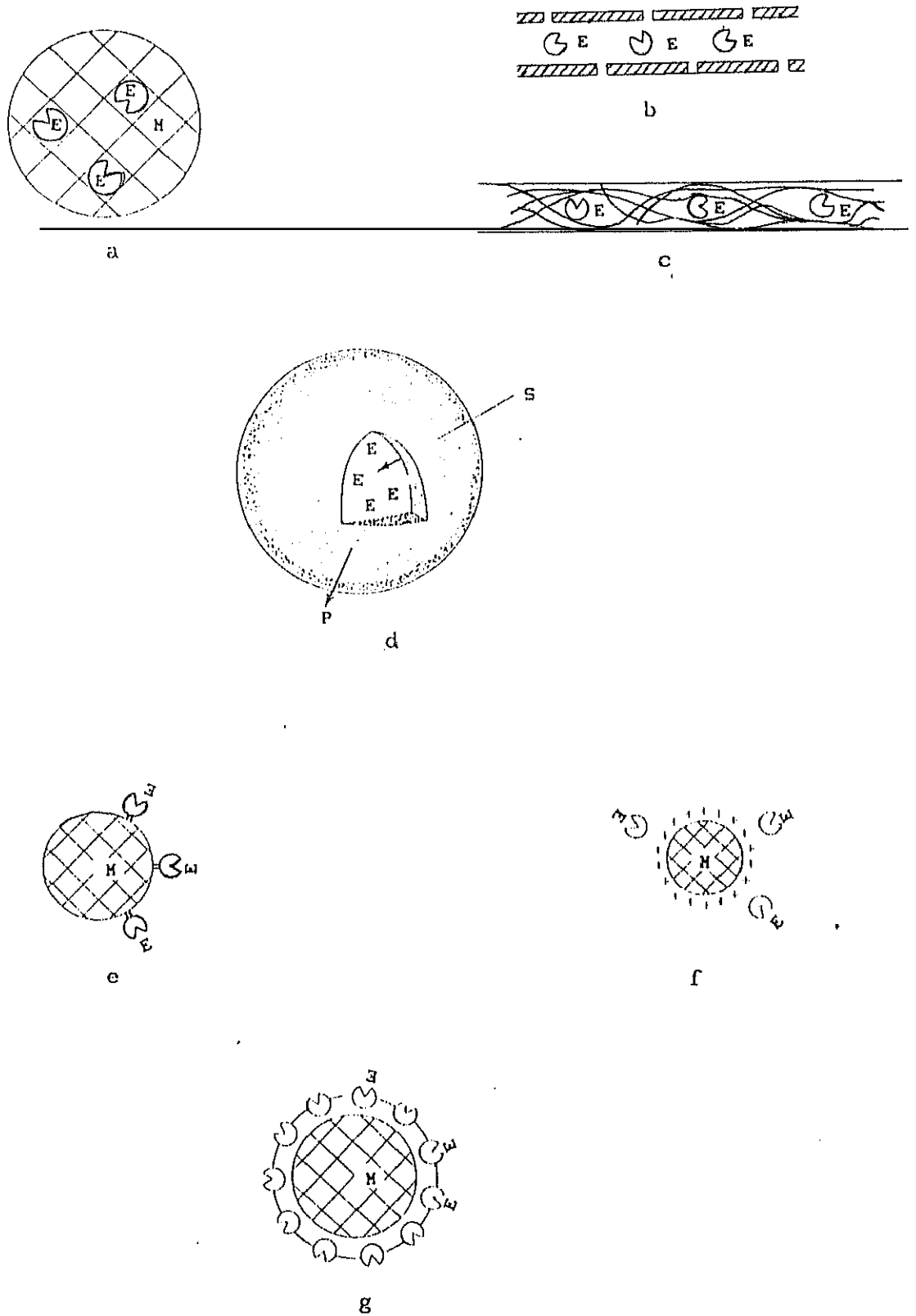


Figura 2.6. Métodos de inmovilización: a) Atrapamiento en un gel, b y c) Atrapamiento en fibra, d) Microencapsulación, e) Adsorción, f) Enlace covalente, g) Entrecruzamiento.

a) Adsorción física:

La adsorción física fue el primer método artificial empleado para inmovilizar enzimas (Nelson y Griffin, 1916). Constituye la técnica de inmovilización más sencilla y esta basada en la adsorción física de las moléculas de enzima sobre la superficie de la matriz sólida empleada como soporte (figura 2.6 e).

Al no existir reacción química, los cambios configuracionales observados en la enzima tras el proceso de inmovilización son prácticamente nulos obteniéndose una especie inmovilizada que conserva gran parte de la actividad de la disolución enzimática empleada para la inmovilización.

El factor que influye de manera más importante sobre la cantidad de enzima inmovilizada es la concentración de enzima puesta en contacto con cada unidad de superficie de soporte durante el proceso de inmovilización. La actividad inmovilizada aumenta al hacerlo la concentración de enzima acercándose a un valor asintótico que indica la saturación del soporte para valores elevados de concentración enzimática. El tiempo y la temperatura son también parámetros importantes en este proceso de inmovilización, particularmente cuando se emplean soportes porosos en los que la difusión ejerce un papel importante en el proceso de inmovilización.

Entre las principales desventajas de este tipo de proceso destaca la desorción de la proteína durante su utilización debido a las débiles fuerzas que unen enzima y soporte (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc.). Esta desorción provoca una importante pérdida de actividad catalítica y contaminación de los productos. La velocidad de desorción aumenta con el contenido en sales o la concentración de sustrato.

b) Enlace iónico:

La inmovilización via enlace iónico se basa en la unión de moléculas de enzima a soportes sólidos que contengan residuos de intercambio iónico. La principal diferencia entre el enlace iónico y la adsorción física es la fuerza con la que la enzima se une al soporte, mucho mayor en el caso del enlace iónico aunque menor que en el covalente.

Puesto que este método de inmovilización requiere condiciones suaves de pH y temperatura, los cambios conformacionales producidos en la proteína son escasos, obteniéndose altas actividades inmovilizadas.

c) Quelación o unión metálica:

Una técnica relativamente nueva de inmovilización consiste en la utilización de compuestos de metales de transición para activar la superficie del soporte y unirlo directamente a la enzima, sin previa derivatización del soporte activado, mediante la formación de quelatos.

Este método fue desarrollado por Kennedy y Doyle (1973), utilizando soportes de diferente naturaleza como celulosa, gelatina, alginato cálcico, sílice, etc. Los metales empleados incluyen titanio (III y IV) y circonio (IV) que son capaces de formar óxidos e hidróxidos poliméricos.

Aunque este método se define como una quelación o por algunos autores como la formación parcial de un enlace covalente, puede existir desorción al ser sometido el complejo a las condiciones de operación o a un largo periodo de almacenamiento.

d) Enlace covalente:

Se basa en la unión covalente de las enzimas a matrices insolubles y constituye la técnica más utilizada y por lo tanto una de las más investigadas en lo que se refiere a la inmovilización. La selección de las condiciones de inmovilización por enlace covalente es más difícil que en los otros métodos descritos y, a menudo, implica técnicas más complicadas y condiciones menos suaves, sin embargo, las preparaciones enzimáticas son muy estables y no existen prácticamente pérdidas de enzima al medio en presencia de sustrato o de soluciones con alta concentración iónica (figura 2.6 f).

La inmovilización de una enzima por unión covalente a un soporte debe implicar sólo grupos funcionales de la enzima que no sean esenciales para su acción catalítica, además, no se pueden utilizar agentes que puedan afectar a su unión al sustrato o a los centros activos de la enzima. Se ha

descrito un gran número de métodos para alcanzar grandes actividades de la preparación de enzima inmovilizada resultante, evitando las reacciones de inactivación con los residuos aminoácidos de los centros activos. Entre ellos se pueden destacar:

- 1- Unión covalente de la enzima en presencia de un inhibidor competitivo o de sustrato.
- 2- Formación de un complejo enzima-inhibidor reversible que se une covalentemente a la matriz.
- 3- Modificación química de la enzima soluble cuya unión a la matriz se realiza a través de los nuevos residuos incorporados.
- 4- Empleo de un zimógeno precursor.

La amplia variedad de reacciones de unión y de portadores con grupo funcional capaces de llevar a cabo una unión covalente, o de ser activados para dar alguno de estos grupos, lo convierten en un método de inmovilización aplicable de forma general. Sin embargo, la complejidad de la composición y la estructura de las proteínas no permite, salvo en casos especiales, la aplicación de recetas generales o la posibilidad de seleccionar previamente el método más adecuado en cada caso.

Las enzimas son heteropolímeros constituidos por más de veinte aminoácidos diferentes, la mayor parte de los cuales poseen grupos funcionales que pueden ser utilizados para su unión con la matriz soporte (tabla 2.5). Sin embargo, aún cuando la inmovilización se realice a través de uno de estos residuos, pueden producirse modificaciones en la estructura de las proteínas, con pérdida de la actividad enzimática.

Los grupos funcionales de los portadores que pueden reaccionar directamente con la enzima aparecen en la tabla 2.6, junto con el grupo de la enzima con el que pueden reaccionar. Sin embargo, la mayor parte de los soportes utilizados no poseen estos grupos reactivos pero tienen grupos hidroxilo, amino, amida o carboxilo que requieren una activación tras la cual pueden ser utilizados en la inmovilización. Las reacciones desarrolladas para llevar a cabo la activación de los soportes se pueden clasifi-

car en los siguientes grupos:

- 1) Diazotación
- 2) Formación de un enlace amida
- 3) Alquilación y arilación
- 4) Formación de una base de Schiff
- 5) Reacción de Ugi
- 6) Reacciones de amidinación
- 7) Intercambio tiol-disulfuro
- 8) Interacciones mercurio-enzima
- 9) Acoplamiento inducido por radiación γ

TABLA 2.5
RESIDUOS REACTIVOS DE LAS PROTEINAS

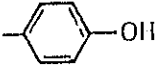
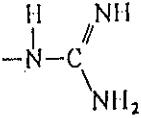
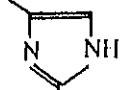
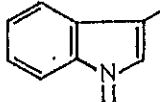
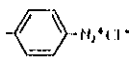
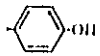
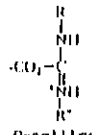


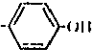
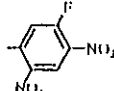

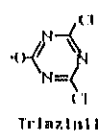


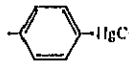

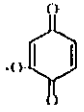
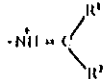

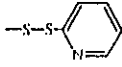
Residuo	Aminoácido original
$-\text{NH}_2$	ϵ -Amino de la L-lisina y N-terminal del grupo amino
$-\text{SH}$	Tiol de la L-cisteina
$-\text{COOH}$	Carboxilo del L-aspartato y L-glutamato y C-terminal del grupo carboxilo
	Grupo fenólico de la L-tirosina
	Grupo guanidino del L-arginato
	Grupo imidazol de la L-histidina
$-\text{S}-\text{S}-$	Disulfuro de la L-cisteina
	Grupo indol del L-triptófano
$\text{CH}_3-\text{S}-$	Grupo tioéter de la L-metionina
$-\text{CH}_2\text{OH}$	Hidroxilo de la L-serina y L-treonina

TABLA 2.6
GRUPOS FUNCIONALES DE LOS PORTADORES QUE PUEDEN REACCIONAR DIRECTAMENTE
CON LA ENZIMA Y GRUPO DE ESTA CON EL QUE REACCIONAN

Grupo reactivo del portador	Grupo reactivo de la enzima	Reacción de unión	Grupo reactivo del portador	Grupo reactivo de la enzima	Reacción de unión
 Sal de diazonio	-NH ₂ -SH 	Unión diazo	 O-acetylourea	-NH ₂	Formación de un enlace amida
 Anhídrido ácido	-NH ₂	Formación de un enlace amida	 Derivado k del reactivo de Woodward	-NH ₂	Formación de un enlace amida
-CH ₂ COON ₃ Azida acida	-NH ₂ -SH 	Formación de un enlace amida	 5-Fluoro-2,4-dinitroanilina	-NH ₂	Arlilación
 Isocianato	-NH ₂	Formación de un enlace amida	 Triazinilol	-NH ₂	Arlilación
-R-NCS Isocianato	-NH ₂	Formación de un enlace amida	 X = >NH, >O, >S Oxirano	-NH ₂ -OH	Alquilación
 Cloruro de acilo	-NH ₂	Formación de un enlace amida	 Derivado de mercurio	-SH	Interacción enzima mercurio
 Carbonato cíclico	-NH ₂ -SH -OH	Alquilación	M ⁺ Radical-matriz	R ⁺ Radical-enzima	Inducción al enlace por radiación y
-O-CH ₂ -CH ₂ -SO ₂ -CH=CH ₂ Vinilsulfonilo	-NH ₂ -SH -OH	Arlilación	-NH ₂ Amina	-NH ₂ -CO, II	Formación de un enlace amida (en presencia de agentes de condensación)
 Vinilcetona	-NH ₂ -SH -OH	Arlilación	-CONHNH ₂ Acil hidrazina	-NH ₂ -CO, II	
-CHO Aldehído	-NH ₂	Formación de una base de Schiff		-CO, II -NH ₂	Reacción de Ugi
 Imido ester	-NH ₂	Reacción de amidinación			
-CN Cianuro	-NH ₂	Reacción de amidinación			
 Residuo disulfuro	-SH	Intercambio tiol-disulfuro			

iii) Entrecruzamiento:

Este método se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima, mediante el empleo de agentes bi o multifuncionales que conducen a agregados entrecruzados de tres dimensiones, totalmente insolubles en agua por lo que no es necesario el empleo de soportes insolubles. Este método implica la adición de la cantidad adecuada de agente de entrecruzamiento a una disolución de enzima en las condiciones que conduzcan a la formación del mayor número de enlaces covalentes múltiples. Las condiciones óptimas para obtener la máxima insolubilidad con la máxima retención de actividad deben determinarse por el método de prueba y error ya que es poco frecuente el conocimiento de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de las enzimas para predecir las mejores condiciones que produzcan la mínima alteración de las mismas durante su reacción para formar el complejo insoluble (figura 2.6 g).

El agente utilizado en el entrecruzamiento debe poseer dos grupos funcionales idénticos (agente homobifuncional) o dos o más grupos funcionales diferentes (agente heterobio o heteromultifuncional) siendo los segundos más frecuentes en la unión de enzimas a soportes insolubles que en las reacciones de entrecruzamiento intermolecular. Los principales agentes empleados contienen:

- 1) Grupos funcionales carboxilo que reaccionan con residuos L-lisina mediante la formación de bases de Schiff.
- 2) Grupos diazo que reaccionan con residuos L-lisina, L-histidina, L-tirosina, L-arginina o L-cisteína por reacciones de acoplamiento diazo.
- 3) Grupos isocianato que reaccionan con residuos básicos de los aminoácidos mediante la formación de un enlace amida.
- 4) Derivados alquilyodados que reaccionan con residuos nucleófilos mediante reacciones de alquilación.
- 5) Yodoacetamidas que reaccionan con residuos L-cisteína.

Las principales desventajas del método de entrecruzamiento, que limitan de forma importante su utilización, son: las dificultades para controlar la reacción, la necesidad de grandes cantidades de enzima, gran parte de la cual pierde su actividad por reacciones que tienen lugar en su centro activo y la naturaleza gelatinosa del producto final.

2.5.2. SELECCION DEL METODO DE INMOVILIZACION:

Aunque se han desarrollado numerosas técnicas de inmovilización para gran variedad de enzimas, se puede afirmar que no existe un método que pueda ser considerado el método universal para todas las aplicaciones y todas las enzimas. Esto es debido a las grandes diferencias de composición y características químicas entre ellas; diferentes propiedades de los productos y sustratos y los muy distintos usos a los que el producto de la inmovilización puede ser destinado. Sin embargo, para cada aplicación de una enzima inmovilizada es preciso encontrar un procedimiento sencillo y barato que conduzca a un producto con buena retención de actividad y alta estabilidad operacional.

A pesar de ello, dada la abundante información existente sobre las características de las matrices soporte y sobre los efectos de los métodos de inmovilización utilizados, es posible hacer algunas generalizaciones que pueden ser utilizadas como base para la selección de un método que pueda ser aplicable para un caso específico, sin que puedan darse garantías de éxito. Además es frecuente que sea necesario ensayar más de un método antes de conseguir el proceso más eficaz. En la tabla 2.7 se presenta un breve resumen de las ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización más habituales.

Cuando la inmovilización va acompañada de reacción química, como en el caso de entrecruzamiento o enlace covalente, los cambios conformacionales en la molécula de proteína deben minimizarse para evitar la parcial desactivación debida a la participación del centro activo en la reacción de inmovilización. Esto requiere la utilización de las condiciones más suaves posibles para llevar a cabo la inmovilización. Sin embargo, una vez que una enzima ha sido inmovilizada con éxito mediante un método químico, la estabilidad operacional del producto es alta, debido a la fuerza de los enlaces entre las moléculas de enzima (en el caso del entrecruzamiento) o

TABLA 2.7

COMPARACION ENTRE LAS DIFERENTES TECNICAS DE INMOVILIZACION

Característica	Entrecruzamien.	Adsorción	Enl. iónico	Quelación	Enl. covalente	Atrapamiento
Preparación	Intermedia	Simple	Simple	Simple	Difícil	Difícil
Fuerza enlace	Fuerte	Débil	Intermedia	Intermedia	Fuerte	Intermedia
Actividad enzim.	Baja	Intermedia	Alta	Alta	Alta	Baja
Regenerab. soporte	Imposible	Posible	Posible	Posible	Rara	Imposible
Coste inmoviliz.	Intermedio	Bajo	Bajo	Intermedio	Alto	Intermedia
Estabilidad	Alta	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Alta	Alta
Aplicabilidad	No	Si	Si	Si	No	Si
Protección ataque microbiano	Posible	No	No	No	No	Si

entre la enzima y el soporte (en el caso del enlace covalente). El entrecruzamiento no es un método recomendable para aplicaciones industriales a gran escala, debido a la escasa estabilidad mecánica del producto final.

La adsorción física, el enlace iónico y la quelación o unión metálica son más atractivos para la inmovilización enzimática debido a las suaves condiciones que implica la reacción de unión. Sin embargo, como las fuerzas de enlace son, generalmente, más débiles que en los métodos químicos de enlace, la estabilidad operacional es baja debido a la pérdida de enzima al medio por cambios en la concentración iónica, el pH, la concentración de sustrato o la temperatura del medio de reacción. Por otra parte, utilizando estas técnicas de inmovilización puede ser viable la recuperación del soporte.

Cuando se emplea el método de inmovilización por atrapamiento, se alcanzan elevadas retenciones activas, ya que no existe enlace entre la enzima y el soporte, pero pueden existir importantes limitaciones debidas a problemas difusionales con sustratos y/o productos de gran tamaño. Por esta razón el uso de este método debe limitarse a reacciones que impliquen moléculas de sustrato y producto de pequeño tamaño.

2.5.3. SELECCION DEL SOPORTE

En la selección del soporte deben considerarse su composición, morfología (tipo de superficie y estructura interna) y el método de inmovilización que vaya a ser empleado, con el fin de conseguir que la enzima inmovilizada posea la máxima actividad en el medio de reacción. En la tabla 2.8 se recogen los principales soportes empleados en la inmovilización enzimática, clasificados según su morfología y su composición química.

La morfología del soporte es muy importante, especialmente en lo que concierne a la superficie específica y al tamaño y geometría de los poros. Así, los soportes no porosos tienen un área específica pequeña, pero no presentan problemas difusionales. Por el contrario, los soportes porosos tienen un área específica mucho mayor pero gran parte de esta superficie es interna, y dado que los sustratos suelen ser macromoléculas orgánicas, la difusión interna puede ser la etapa controlante del proceso. Sin embargo, las enzimas retenidas en la superficie interna de los poros se encuen-

TABLA 2.8

PRINCIPALES SOPORTES EMPLEADOS EN LA INMOVILIZACION ENZIMATICA

- CLASIFICACION MORFOLOGICA:

- # SOPORTES NO POROSOS
- # SOPORTES POROSOS

- CLASIFICACION QUIMICA:

SOPORTES ORGANICOS:

i) Polímeros naturales:

- Polisacáridos: celulosa, remolacha, dextrano, agar y agarosa, alginato, carraginato, chitina y chitosan.
- Proteínas: colágeno, gelatina, albúmina, seda.
- Minerales de carbón

ii) Polímeros sintéticos:

- Poliestireno
- Tipo poliacrilato: poliacrilatos y polimetacrilatos, poliacrilamida, hidroxialquilmecrilatos, glicidilmetacrilatos, poliamidas
- Otros tipos: polímeros de anhídrido maléico, polímeros de vinilo.

SOPORTES INORGANICOS:

i) Minerales:

- Arcillas: atapulgita, bentonita
- Piedra pómez

ii) Materiales manufacturados:

- Cristales: tamaño de poro controlado, no porosos
- Metales: óxidos de tamaño de poro controlado
- Cerámicos

tran más protegidas de las condiciones ambientales y del ataque microbiano.

También deben considerarse las características intrínsecas del soporte y de su naturaleza orgánica o inorgánica. Los soportes inorgánicos son muy rígidos y prácticamente no existe posibilidad de deformación, además, existe riesgo de abrasión en reactores agitados o tubulares. Los soportes orgánicos son más flexibles y elásticos, pudiendo resistir mejor a la abrasión. Por el contrario son más susceptibles al ataque microbiano que los inorgánicos.

La influencia del método de inmovilización es decisiva, principalmente cuando se requieren grupos funcionales específicos para la formación de un determinado enlace. De igual forma, la utilización de adsorción física requiere soportes porosos de tamaño de poro suficientemente elevado para aumentar su eficacia.

2.5.4. EFECTO DEL METODO DE INMOVILIZACION SOBRE LA CINETICA Y LAS PROPIEDADES ENZIMATICAS

El proceso de inmovilización puede modificar tanto la cinética como otras propiedades de las enzimas, provocando habitualmente una disminución de la actividad específica de las mismas. Estos cambios en la actividad enzimática pueden considerarse debidos a diferentes factores:

a) Efectos conformacionales: cuando se producen cambios conformacionales en las moléculas de enzima, debido a modificaciones de los aminoácidos que constituyen el centro activo de la misma; cambios en la estructura protéica de la enzima y/o cambios en su carga.

b) Efectos estéricos: cuando el tamaño del sustrato y la enzima puede afectar a la interacción entre ellos.

c) Efectos particionales: relacionados con la naturaleza química del soporte empleado como matriz, el cual puede provocar interacciones electrostáticas o hidrofóbicas entre la matriz y especies de bajo peso molecular presentes en el medio.

d) Efectos difusionales: relacionados con la resistencia al transporte del sustrato desde el seno de la disolución hasta los centros activos y con la difusión de los productos de reacción hasta la disolución. Estas resistencias difusionales se pueden clasificar en: efectos de transferencia de materia intraparticular o interna, cuando la enzima esta inmovilizada sobre una matriz porosa, o efectos de transferencia de materia interparticular o externa, cuando se produce entre el seno de la disolución y la superficie externa de la partícula.

Los cambios observados en las propiedades enzimáticas son el resultado de la combinación de estos factores, si bien, es difícil determinar la medida exacta en que influye cada uno de ellos.

Entre los cambios más importantes producidos por la inmovilización enzimática cabe señalar:

1) Modificación de los parámetros cinéticos: Constante de Michaelis y velocidad máxima de reacción:

La constante de Michaelis, K_m , puede verse modificada por la inmovilización de la enzima, aumentando o disminuyendo dependiendo del método empleado para la inmovilización. El primer efecto es el más frecuente debido generalmente a la aparición de efectos difusionales tanto externos como internos, a problemas de impedimento estérico y a cambios conformacionales, siendo estos últimos más frecuentes en las técnicas de inmovilización por formación de enlace covalente en las que se produce la modificación química de la enzima.

La velocidad máxima de reacción, r_{max} , se modifica menos frecuentemente que la constante de Michaelis si bien se han observado disminuciones de la misma de hasta 1/10 (Usami, 1973).

ii) Perfil de actividad frente al pH:

Cuando una enzima se inmoviliza sobre un determinado soporte pueden aparecer o no cambios tanto en su pH óptimo como en su perfil de actividad frente al pH. Estos cambios dependen de la carga eléctrica de la proteína que constituye la enzima y/o de la carga del soporte. En el método de in-

movilización por formación de un enlace, el comportamiento de la enzima puede verse modificado aunque no exista resistencia a la transferencia de materia, debido a efectos particionales causados por diferencias de concentración de las especies con carga existentes en el medio, causadas por interacciones electrostáticas con las cargas fijadas sobre el soporte. Una de las principales consecuencias de estos efectos de partición es un desplazamiento del pH óptimo y del perfil de pH hacia valores más alcalinos o más ácidos para matrices con carga negativa o positiva, respectivamente (Goldstein, 1976). También hay casos en los que no existe modificación del pH óptimo tras la inmovilización pero sí variación en los perfiles de pH, con un ensanchamiento o un estrechamiento de los mismos (Filipusson, 1970; Bernfield, 1969). Un ensanchamiento del perfil de pH puede explicarse considerando un aumento de la resistencia de la enzima a los cambios de pH tras la inmovilización. Este fenómeno es habitual en enzimas unidas covalentemente a un soporte o atrapadas en un gel. Las enzimas atrapadas sobre polímeros neutros no suelen presentar modificaciones en el pH óptimo ni en su perfil.

iii) Perfil de actividad frente a la temperatura:

En algunas ocasiones, la inmovilización de una enzima sobre un determinado soporte implica una variación de la temperatura óptima de reacción de la misma. La temperatura óptima de las enzimas inmovilizadas por atrapamiento en geles y en algunas ocasiones unidas iónica o covalentemente al soporte puede verse aumentada debido a efectos difusionales en el caso de soportes porosos, que protegen a la enzima contra la desnaturalización, ya que la temperatura en el microentorno de la partícula matriz-enzima es menor que en el seno de la disolución.

Sin embargo, se ha observado también disminución de la temperatura óptima de la enzima (Mori, 1973) e incluso con bastante frecuencia ningún cambio en las mismas (Chibata, 1979).

iv) Estabilidad frente a la temperatura y al almacenamiento:

La influencia de la inmovilización sobre la desnaturalización térmica ha sido motivo de abundantes estudios, existiendo todo tipo de resultados (aumento, disminución y no modificación de la misma) siendo un aumento de

la estabilidad el efecto más frecuente.

Aunque no es posible establecer una correlación entre la estabilidad térmica y el método de inmovilización, se ha observado que los métodos de enlace covalente y atrapamiento conducen en general a especies inmovilizadas con un importante aumento de estabilidad térmica, mientras que la mayor parte de las enzimas inmovilizadas por adsorción física y enlace iónico presentan una disminución de la misma.

La estabilidad térmica a bajas temperaturas (menores de 4 °C) se conoce como estabilidad al almacenamiento y es un parámetro muy importante en lo que se refiere al diseño de sistemas enzimáticos inmovilizados. La mayor parte de las enzimas inmovilizadas por enlace covalente presentan un importante aumento de su estabilidad al almacenamiento, debido probablemente, a la fuerza de los enlaces establecidos entre el soporte y la enzima.

2.5.5. INMOVILIZACION DE LA ENZIMA β -GLUCOSIDASA

Como se ha comentado en apartados anteriores, la β -glucosidasa es el componente minoritario del complejo celulasas producido por el hongo *Trichoderma reesei*. Por ello, y a fin de evitar la inhibición que provocaría una elevada concentración de celobiosa en el medio de reacción y de aumentar la conversión del proceso de sacarificación, es preciso complementar dicho complejo celulasas con β -glucosidasa obtenida a partir de otros organismos, ya comentados con anterioridad, en forma libre o inmovilizada. La β -glucosidasa presenta la ventaja, frente al resto de las enzimas del complejo celulasas, de atacar a un sustrato soluble (celobiosa) siendo por tanto adecuada para la inmovilización porque tanto producto como sustrato pueden difundirse a través de la matriz soporte. Además el uso de β -glucosidasa inmovilizada permite su reutilización en diferentes procesos de sacarificación. Por otra parte, un método de inmovilización adecuado puede aumentar su estabilidad térmica y su tiempo de vida media.

Existe un gran número de trabajos publicados sobre inmovilización de β -glucosidasa. A continuación se han considerado los de mayor interés.

Rao y col. (1983) inmovilizaron β -glucosidasa del hongo *Penicillium funiculosum* sobre poliamida utilizando glutaraldehido como agente de anclaje, obteniendo retenciones activas próximas al 50%. Actividades inmovilizadas mucho más bajas (1-10%) alcanzaron Bissett y col. (1978 a) al inmovilizar β -glucosidasa de *Aspergillus niger* sobre chitosan utilizando también glutaraldehido como agente de anclaje, sin embargo, la enzima inmovilizada presentó un importante aumento de estabilidad térmica. Utilizando la misma enzima sobre diferentes soportes porosos, Woodward y Wolhpart (1982) lograron inmovilizar el 80% de la actividad enzimática, con un importante aumento de la estabilidad térmica. Este aumento fue observado también, al inmovilizar la enzima sobre membranas de ultrafiltración y gel de poliamida (Alfani, 1987) pero con retenciones activas mucho más bajas, del 2 y 26%, respectivamente.

La inmovilización por microencapsulación en partículas de alginato, proporciona soportes de alta estabilidad térmica y al almacenamiento (Matteau, 1982 a y b).

Inmovilizando todo el complejo celulasas procedente de *Trichoderma reesei* sobre diferentes soportes porosos (Sepharosa, partículas de cristal de tamaño de poro controlado) activados con CNBr, Fadda y col. (1984) obtuvieron retenciones activas variables según la concentración de enzima en el medio, comprendidas entre 75 y 90% para bajas concentraciones y 34 y 41% para altas.

Empleando un método de entrecruzamiento por vía fotoquímica, Miyairi (1978) consiguió inmovilizar el 40% de la actividad β -glucosidasa de almendras en láminas de alcohol polivinílico. Dicha enzima inmovilizada presentaba modificaciones en su pH óptimo y en su estabilidad térmica a 60 °C, que aumentaba en un 50% (del 14 al 21% de actividad residual tras 30 minutos de incubación) respecto de la enzima libre. Al utilizar glutaraldehido como agente de anclaje (Miyairi, 1979) observó un ligero aumento de la retención activa (del 40 al 46%) y las mismas modificaciones anteriores del pH óptimo y la estabilidad. Barker y col. (1971) comprobó que al utilizar celulosa microcristalina como soporte para la inmovilización de β -glucosidasa de almendras, la actividad inmovilizada dependía del pH al que la inmovilización tenía lugar. La enzima así inmovilizada presentaba un importante aumento de la estabilidad térmica a 37 °C ya que tras cuatro

días de incubación mantenía un 38% de su actividad inicial mientras que la enzima libre la había perdido en su totalidad. Bajas actividades inmovilizadas obtuvieron también Saddler y col. (1982) al inmovilizar esta misma enzima sobre geles de alginato cálcico mediante formación de un enlace covalente (retención activa entre 0.88 y 12%).

El empleo del método de quelación para la inmovilización de β -glucosidasa de almendras proporciona resultados variables dependiendo del compuesto metálico empleado en la activación del soporte poroso utilizado. Kennedy y col. (1976 a y b) observaron que los mejores resultados se obtenían al emplear compuestos de Fe(III) como agente activante (44% de retención activa) siendo los más desfavorables los compuestos de Sn(II) y de V(III) que sólo retenían un 11% de la actividad inicial.

Johanson y Mosbach (1974) describen distintas formas de inmovilizar la β -glucosidasa en polímeros acrílicos, tanto por confinamiento de la enzima en el polímero como por la formación de enlaces covalentes. Mediante este último procedimiento llevaron a cabo la inmovilización de la enzima sobre poliacrilamida utilizando glutaraldehído, sobre copolímeros acrilamida-2-hidroxietilmetacrilato utilizando bromuro de cianógeno, así como polímeros de acrilamida-ácido acrílico utilizando carbodiimida soluble en agua.

Sarkar y Burns (1983) inmovilizaron β -glucosidasa pura y copolimerizada con resorcinol sobre tres soportes: k-carragenato, DEAE-celulosa y membranas de ultrafiltración, obteniendo mayores actividades cuando se inmovilizaba la enzima copolimerizada.

Gray y Livinstone (1977) utilizaron un método denominado diaminoazotación para inmovilizar β -glucosidasa, basado en el tratamiento del m-diaminobenceno con una disolución ácida de nitrito sódico, formándose un sólido marrón-rojizo, llamado marrón Bismark. Este tratamiento provoca la creación de enlaces entre los grupos diazo y la enzima, no observándose variación notable en el perfil de actividades frente al pH y obteniéndose porcentajes de retención activa próximos al 60%.

2.6 OBJETO Y ALCANCE DE LA PRESENTE INVESTIGACION

En el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, se inició hace algunos años una línea de investigación sobre el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos abundantes en España, como la paja de distintos cereales y residuos de azucareras, mediante hidrólisis enzimática.

Dentro de dicha línea se enmarca el presente trabajo que incluye la inmovilización de β -glucosidasa sobre diferentes soportes mediante diferentes métodos de inmovilización, el estudio de su desnaturalización por efecto de la temperatura y la hidrólisis de celobiosa con dicha enzima tanto libre como inmovilizada.

El programa de investigación planteado incluye las siguientes etapas:

1) Selección del método de inmovilización y del soporte más adecuado para la inmovilización de β -glucosidasa utilizando como criterios de selección la retención de actividad y la estabilidad térmica a 50°C.

2) Selección de la fuente más adecuada de la β -glucosidasa.

3) Estudio de las variables de inmovilización con el soporte, el método y la enzima seleccionados previamente.

4) Estudio de la estabilidad térmica a diferentes temperaturas tanto de la enzima libre como de la inmovilizada.

5) Estudio de las variables que influyen sobre la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa tanto libre como inmovilizada:

- Temperatura
- pH
- Concentración de glucosa y celobiosa
- Agitación
- Actividad de la disolución enzimática o del complejo enzima-soporte.

6) Estudio cinético de la desnaturalización térmica.

7) Estudio cinético de la hidrólisis de celobiosa.

3. APARATOS

3.1. INCUBADORA

Los experimentos de desactivación e hidrólisis tanto de las enzimas en su forma libre como inmovilizada se llevaron a cabo en una incubadora termostatzada con agitación orbital, situando en su interior erlenmeyers de 250 cm³ de capacidad.

La incubadora consta de los siguientes elementos:

- *Cámara de incubación:*

De dimensiones 56x116x78.5 cm. Las paredes se encuentran aisladas térmicamente y dispone de un ventilador para favorecer la circulación interna del aire con el fin de conseguir una temperatura uniforme.

En su interior lleva acoplada una plataforma con soportes metálicos intercambiables para matraces de 250 y 1000 cm³.

- *Sistema de agitación:*

Consiste en una excéntrica conectada a un motor de 1/8 CV de potencia, que produce el movimiento de la plataforma según una órbita elíptica.

Dispone de un reostato para controlar la velocidad de agitación, que puede variarse entre 0 y 500 r.p.m., midiéndose dicha velocidad mediante un tacómetro.

- *Sistema de control de la temperatura:*

Incluye los siguientes elementos: Un elemento calefactor consistente en una resistencia eléctrica, conectado a un termómetro de contacto que permite controlar la temperatura con una precisión de ± 0.5 °C, pudiendo variarse desde la temperatura ambiente hasta 80 °C.

El aparato dispone de un termostato adicional de seguridad que entra en funcionamiento en caso de avería del principal. Así mismo, existe un sistema de alarma que impide que, en caso de avería de ambos termostatos, la temperatura supere la indicada como consigna para la alarma.

3.2. BAÑO TERMOSTÁTICO

Para la medida de las actividades enzimáticas, así como para la inmovilización de la enzima sobre los diferentes soportes, se utilizó un baño termostático orbital de precisión SELECTA UNITRONIC 320 OR que consta de los siguientes elementos:

- *Cuerpo del aparato:*

De 37x80x34 cm con doble pared, la exterior pintada al horno y la interior de acero inoxidable, dotado de un grifo de desagüe para el líquido termostático.

- *Sistema de agitación:*

Constituido por una cubeta móvil inmersa en el líquido termostático, con agitación por vaivén y regulación electrónica de la velocidad de agitación entre 0 y 150 r.p.m.

La cubeta dispone de una gradilla con muelles tensores que permiten adaptar cualquier tipo de frascos y matraces.

- *Sistema de calefacción:*

La calefacción del líquido termostático (agua destilada) se realiza mediante una resistencia eléctrica blindada de 1600 w, con vaina de acero inoxidable.

La regulación y control de la temperatura se lleva a cabo mediante un sistema de termopar y relé, que permite mantener la temperatura del líquido termostático en el valor elegido con una precisión de ± 0.2 °C.

Asímismo se dispone de un agitador de turbina impulsado por una bomba que provoca la turbulencia necesaria para conseguir la homogeneidad de temperatura en el baño termostático.

Los experimentos realizados a temperaturas comprendidas entre 4 y 20 °C se llevaron a cabo con ayuda de una unidad de refrigeración MGW LAUDA K2R con el fin de mantener el agua del baño termostático a la temperatura deseada. La unidad de refrigeración consta de una cubeta de refrigeración de 4 litros de capacidad, en el interior de la cual se sitúa el serpentín encargado de la refrigeración, por cuyo interior circula el líquido refrigerante. El agua del baño termostático es bombeada hasta la cubeta de refrigeración donde se enfría devolviéndose nuevamente al baño.

4. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO

4.1. MATERIALES

i) Enzimas:

Las enzimas comerciales utilizadas fueron:

- β -glucosidasa de almendras, 6-8 UI^{*}/mg sólido. FLUKA
- Complejo enzimático celulasa de *Trichoderma viride* tipo IV, 0.12 UI^{**}/mg sólido, SIGMA.
- Complejo enzimático celulasa de *Aspergillus niger*, 5.1 UI^{**}/mg sólido, SIGMA.
- Complejo enzimático celulasa de *Penicillium funiculosum*, 4.3 UI^{**}/mg sólido, SIGMA.

- Complejo enzimático celulasa de *Neurospora crassa* cell-1, 3.1 UI^{**} /mg sólido, cedida por la Unidad de Biotecnología de la Universidad de Leeds (U.K.)

ii) Soportes:

- Zeolita 5A, SUPELCO
- Zeolita 13X, QUIMIDROGA, S.A.
- Zeolita Y, sintetizada y caracterizada en nuestros laboratorios.
- Sepiolita coloidal, TOLSA.
- Gel de sílice, para cromatografía. MERCK.
- Sílice precipitada, Silicagel-60, tamaño de partícula 80-200 μm . MERCK.
- Poliamida 11, para cromatografía en capa fina. MERCK.

iii) Otros reactivos:

- Tetrafluoroborato de trietiloxonio, puro 95%. FLUKA.
- Etilendiamina, 99.9%. SIGMA.
- Acido cítrico, Normapur. PROLABO.
- p-Nitrofenil- β -D-glucósido (PNPG), pureza superior al 98%. SIGMA.
- Glutaraldehído, solución acuosa al 25% para síntesis. MERCK
- Tetracloruro de titanio, químicamente puro. MERCK
- Hidróxido sódico, químicamente puro. PANREAC.
- Diclorometano, para cromatografía líquida, riqueza mínima 99.8%. PANREAC
- Acetonitrilo, para cromatografía líquida, riqueza mínima 99.7%. SCHARLAU.
- Celobiosa, para fines bioquímicos. MERCK.
- Glucosa anhidra (dextrosa), químicamente pura. PROBUS.

* La Unidad Internacional (UI) de actividad β -glucosidasa se define como el número de μmoles de p-nitrofenol liberados por unidad de tiempo utilizando como sustrato p-nitrofenil- β -D-glucósido a pH 4.8 y 50 °C.

** La Unidad Internacional (UI) de actividad celulásica se define como el número de μmoles de glucosa liberados por unidad de tiempo utilizando como sustrato celulosa a pH 5 y 37 °C.

4.2. PROCEDIMIENTO

4.2.1. INMOVILIZACION POR ADSORCION:

El proceso de inmovilización por adsorción de las enzimas sobre los diferentes soportes incluye las siguientes etapas:

1) Se prepara una disolución de la enzima, con la actividad deseada, en tampón citrato 0.1 M (pH=4.8).

2) Se introducen en un matraz de 250 cm³ 0.5 gramos del soporte, 10 cm³ de tampón citrato 0.1 M y 2.5 cm³ de la solución enzimática previamente preparada.

3) Se incuba durante el tiempo deseado en un baño termostático a temperatura constante.

4) Transcurrido el tiempo de inmovilización se separa la enzima inmovilizada por filtración utilizando una placa porosa de 0.45 µm de tamaño de poro. Se lava repetidamente con tampón citrato hasta que las aguas de lavado no presenten actividad enzimática.

5) Mediante el método descrito en el apartado 9.1 del apéndice se mide la actividad enzimática tanto de la enzima inmovilizada como de las aguas de lavado.

4.2.2. INMOVILIZACION POR ENTRECruzAMIENTO CON GLUTARALDEHIDO

El método de inmovilización sobre los diferentes soportes por entrecruzamiento incluye los mismos pasos que el de adsorción, con la única variación de la adición de 0.5 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído al 25% en el segundo paso.

4.2.3. INMOVILIZACION SOBRE SILICA GEL-60 POR FORMACION DE UNION METALICA CON TiCl₄:

La inmovilización de las enzimas sobre Silicagel-60 mediante la formación de un enlace metálico se llevó a cabo en dos pasos según el método descrito por Kennedy (1982), que se detalla a continuación:

1) *Activación del soporte:*

Se disuelven 0.5 g de soporte en 5 ml de $TiCl_4$ y se agitan a temperatura ambiente. Se introduce la mezcla en un desecador con hidróxido sódico durante 30 minutos y posteriormente se lleva a sequedad total en un horno a 45 °C (24 horas aproximadamente).

El soporte activado con titanio se lava repetidamente con agua destilada para eliminar el metal no reaccionado.

Posteriormente se pone en contacto dicho soporte con una disolución de glutaraldehído al 5% en volumen en tampón citrato (5 ml/g soporte) a temperatura ambiente durante 1 hora.

El soporte se lava repetidamente con tampón citrato hasta eliminar todo el glutaraldehído no reaccionado.

2) *Unión de la enzima al soporte activado:*

El derivado carbonilo formado en el paso anterior se pone en contacto con 2.5 ml de disolución enzimática de actividad conocida y 10 ml de tampón citrato a 4 °C durante 2 horas. Finalizado el tiempo de inmovilización la enzima se separa por filtración como en el caso de inmovilización por adsorción midiéndose la actividad tanto de la enzima inmovilizada como de las aguas de lavado.

4.2.4. INMOVILIZACION MEDIANTE FORMACION DE UN ENLACE COVALENTE SOBRE NYLON EN POLVO:

La inmovilización de las diferentes enzimas sobre nylon en polvo se llevó a cabo mediante un método basado en el desarrollado por Morris (1975) para la inmovilización de hexoquinasa y glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa sobre tubo de nylon 6:6. El procedimiento implica las siguientes etapas:

1) *O*-alquilación:

Se pesan 0.5 g de nylon en polvo y se lavan con acetona con el fin de eliminar la posible humedad. Se mezclan con 2.5 ml de tetrafluoroborato de trietiloxonio al 12.5% en diclorometano y se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. El soporte *O*-alquilado se lava repetidamente con diclorometano.

2) *Amino*-activación:

Se adicionan al soporte *O*-alquilado 5 ml de etilendiamina agitándose a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para la total aminoactivación del mismo. Se filtra con placa porosa y se lava repetidamente con agua destilada.

3) *Activación con glutaraldehído*:

Sobre el soporte aminoactivado se adicionan 5 ml de disolución de glutaraldehído en tampón citrato de concentración conocida y se agita a temperatura ambiente durante el tiempo necesario. Transcurrido este, y con el fin de eliminar el glutaraldehído no reaccionado, se lava bien el soporte con tampón citrato quedando así preparado para la inmovilización.

4) *Inmovilización de la enzima*:

Para inmovilizar la enzima sobre el soporte activado se adicionan 2.5 ml de disolución enzimática y 10 ml de tampón citrato en un matraz de 250 cm³. Se incuba en un baño termostatzado a temperatura constante durante un cierto tiempo. Posteriormente, la enzima inmovilizada se separa por filtración y se lava repetidamente con tampón citrato hasta ausencia total de actividad enzimática en las aguas de lavado.

La actividad de la enzima inmovilizada así como la de las aguas de lavado se mide mediante el procedimiento indicado en el apartado 9.1 del Apéndice.

4.2.5. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS ENZIMAS

Para llevar a cabo el estudio de la estabilidad térmica tanto de las enzimas libres como inmovilizadas se siguió el siguiente procedimiento:

Se suspenden 100 mg de la enzima libre (0.5 g de soporte con enzima inmovilizada en el segundo caso) en 100 ml de tampón citrato en un erlenmeyer de 250 cm³. Se analiza la disolución enzimática tal y como se describe en el apartado 9.1 del apéndice con el fin de conocer su actividad inicial. Se mantiene a temperatura y agitación constantes en una incubadora orbital. A tiempos determinados se toman muestras de 0.5 ml y se mide su actividad β -glucosidasa tal y como se describe en el apartado 9.1. del Apéndice.

4.2.6. HIDROLISIS ENZIMÁTICA:

El proceso de hidrólisis enzimática de celobiosa se lleva a cabo según las siguientes etapas:

1- Se preparan 100 ml de una disolución enzimática en tampón citrato de actividad conocida en un erlenmeyer de 250 cm³. En el caso de utilizar enzimas inmovilizadas se suspende el soporte de actividad conocida en 100 ml de tampón citrato.

2- Se adiciona la cantidad de celobiosa necesaria para lograr la concentración inicial de celobiosa deseada.

3- Se introduce el erlenmeyer en una incubadora orbital, manteniéndose constantes tanto la velocidad de agitación como la temperatura.

4- A tiempos determinados se extraen muestras de 1 ml en las que se determinan las concentraciones de glucosa y celobiosa mediante cromatografía de líquidos de alta presión, tal y como se describe en el apartado 9.2 del Apéndice.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En los resultados experimentales que se presentan en este apartado, se utilizan las siguientes expresiones para la actividad:

Actividad de β -glucosidasa libre (A): Representa la actividad enzimática de la β -glucosidasa disuelta en un medio líquido. Se expresa en Unidades Internacionales por ml de disolución (UI/ml).

Actividad de β -glucosidasa inmovilizada (A₁): Representa la actividad enzimática de la β -glucosidasa retenida sobre el soporte tras la inmovilización. Se expresa en Unidades Internacionales por gramo de soporte (UI/g)

Actividad específica (a): Actividad β -glucosidasa expresada en UI presente en cada mg de proteína (complejo enzimático celulasa)

Retención activa (R): Representa el tanto por ciento de la actividad de la disolución inicial retenido sobre el soporte:

$$R(\%) = \frac{A_I * C_S}{A} * 100 \quad [5.1]$$

donde C_S representa la concentración de soporte en g/ml

Dichas actividades enzimáticas se han determinado utilizando p-nitrofenilglucósido como sustrato, como se describe en el Apéndice, apartado 9.1.

5.1. EXPERIMENTOS PREVIOS

5.1.1. SELECCION DEL SOPORTE Y DE LA TECNICA DE INMOVILIZACION

Se llevaron a cabo experimentos de inmovilización de β -glucosidasa pura de almendras consistentes en la fijación de esta enzima sobre un total de diez soportes diferentes utilizando las técnicas de adsorción y entrecruzamiento empleando glutaraldehído como agente de anclaje.

Asimismo, se llevaron a cabo experimentos de inmovilización de β -glucosidasa sobre sílice precipitada por formación de una unión metálica con $TiCl_4$ y sobre nylon en polvo por formación de un enlace covalente.

Los resultados obtenidos en todos estos experimentos se resumen en las tablas 5.1. a 5.3, en las que se indican las condiciones de inmovilización empleadas.

Con el fin de tener mayor información a la hora de seleccionar el soporte y el método de inmovilización más adecuados para la β -glucosidasa, y dado el interés industrial que presenta la estabilidad de la enzima durante largos periodos de tiempo para poder reutilizarla en procesos de hidrólisis de celobiosa, se realizaron experimentos de estabilidad térmica a 50 °C con los dos soportes que presentaban una mayor retención activa,

sílice precipitada y nylon en polvo, obtenidos por los diferentes métodos de inmovilización empleados. Los resultados obtenidos así como las condiciones de inmovilización empleadas en cada experimento, se presentan en las tablas 5.4 a 5.6. En la tabla 5.4 se presentan, asimismo, los resultados obtenidos al estudiar la desactivación térmica a 50 °C de la β -glucosidasa de almendras libre.

5.1.2. INFLUENCIA DEL ORIGEN DE LA β -GLUCOSIDASA EMPLEADA EN LA INMOVILIZACION

Con el fin de estudiar el efecto que un cambio en el tipo de β -glucosidasa empleada podría tener sobre la inmovilización, se realizó una serie de cinco experimentos de estabilidad térmica a 50 °C, inmovilizando β -glucosidasa pura de almendras dulces y el complejo celulasas de los hongos *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus niger*, si bien en estos últimos casos sólo se consideró la variación de la actividad β -glucosidasa.

Los resultados obtenidos así como las condiciones de inmovilización empleadas se presentan en la tabla 5.7.

5.2. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO

5.2.1. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES DE INMOVILIZACION

Una vez seleccionados el soporte y el método de inmovilización así como la fuente de β -glucosidasa (complejo celulasas de *Penicillium funiculosum*) que proporcionan los mejores resultados en la inmovilización, se realizó una serie de experimentos sobre la influencia de las distintas variables en los procesos de activación del soporte y de inmovilización propiamente dicha.

5.2.1.1. Repetitividad de resultados:

En primer lugar, se realizaron cuatro experimentos en los que se mantuvieron constantes todas las variables de operación con el fin de comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos al inmovilizar

β -glucosidasa sobre nylon en polvo.

En la tabla 5.8 se presentan los resultados obtenidos y las condiciones de inmovilización utilizadas.

5.2.1.2. Activación del soporte:

I) AMINOACTIVACION:

Se llevaron a cabo un total de doce experimentos destinados a estudiar la influencia del tiempo de aminoactivación y de la concentración de etilendiamina utilizados sobre la actividad inmovilizada y la retención activa.

Los resultados obtenidos y las condiciones de inmovilización utilizadas en cada caso, se presentan en las tablas 5.9 y 5.10.

II) ACTIVACION CON GLUTARALDEHIDO:

Se realizaron un total de ocho experimentos con el fin de estudiar la influencia del tiempo y de la concentración de glutaraldehído utilizadas en la activación, manteniendo constantes el resto de las variables.

Los resultados obtenidos y las condiciones empleadas en la inmovilización se presentan en las tablas 5.11 y 5.12.

5.2.1.3. Inmovilización propiamente dicha:

Se realizaron experimentos destinados a conocer la influencia de las variables más importantes sobre el proceso de inmovilización. Las variables estudiadas fueron el tiempo, la temperatura y la actividad inicial de la disolución enzimática.

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos, así como las condiciones de inmovilización utilizadas, se presentan en las tablas 5.13 a 5.15.

A partir de los resultados anteriores se eligieron las siguientes condiciones de inmovilización como óptimas, manteniéndose constantes en el resto de la experimentación:

- **Activación del soporte:**

O-alkilación:

- TEMPERATURA, T_{TT} : Ambiente
- VOLUMEN TETRAFLUOROBORATO DE TRIETILOXONIO, V_{TT} : 2.5 ml
- TIEMPO DE ACTIVACION, t_{TT} : 15 min.
- CONCEN. TETRAFLUOROBORATO DEL TRIETILOXONIO, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

Amino-activación:

- TEMPERATURA, T_{EDA} : Ambiente
- VOLUMEN DE ETILENDIAMINA, V_{EDA} : 5 ml
- TIEMPO DE ACTIVACION, t_{EDA} : 120 min.
- CONCENTRACION DE ETILENDIAMINA, C_{EDA} : 100%

Activación con glutaraldehído:

- TEMPERATURA, T_{GLU} : Ambiente
- VOLUMEN DE GLUTARALDEHIDO, V_{GLU} : 5 ml
- TIEMPO DE ACTIVACION, t_{GLU} : 15 min.
- CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO, C_{GLU} : 12.5% v/v en agua

- **Inmovilización propiamente dicha:**

- TEMPERATURA, T_I : 25 °C
- VOLUMEN DE DISOLUCION, V_I : 12.5 ml
- TIEMPO DE INMOVILIZACION, t_I : 15 horas
- ACTIVIDAD DE LA DISOLUCION ENZIMATICA, A_0 : 1.036 UI/ml

5.3. ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*

5.3.1. DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA LIBRE:

Se llevó a cabo un conjunto de ocho experimentos de una duración aproximada de 24 horas a temperaturas comprendidas entre 30 y 70 °C. En dichos experimentos se utilizó β -glucosidasa disuelta en tampón citrato, determinándose la variación de la actividad de β -glucosidasa del complejo celulasas de *Penicillium funiculosum* de las mismas a lo largo del tiempo.

Los resultados experimentales se presentan en las tablas 5.16 a 5.23.

5.3.2. DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO:

Se llevaron a cabo cinco experimentos de una duración aproximada de 24 horas a temperaturas comprendidas entre 30 y 70 °C, en los que se estudió la variación con el tiempo de la actividad de β -glucosidasa inmovilizada.

Los resultados alcanzados se resumen en las tablas 5.24 a 5.28.

5.4. HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*

5.4.1. HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA LIBRE:

I) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA:

Con objeto de estudiar la influencia de la temperatura de operación sobre la hidrólisis enzimática de celobiosa con β -glucosidasa libre se llevó a cabo una serie de cinco experimentos, a temperaturas comprendidas entre 30 y 70 °C.

En las tablas 5.29 a 5.33 se detallan los resultados obtenidos así como las variables de operación utilizadas en los experimentos.

II) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CELOBIOSA:

Se realizaron cinco experimentos de hidrólisis a 60 °C en los que se varió la concentración inicial de celobiosa en el medio de reacción entre 2 y 25 mM.

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 5.32 y 5.34 a 5.37.

III) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA:

Con el fin de determinar la influencia que la presencia de glucosa en el medio ejerce sobre la hidrólisis enzimática, se realizaron cuatro experimentos en los que se varió la concentración inicial de glucosa en el medio entre 0 y 20 mM.

En las tablas 5.32 y 5.38 a 5.40 se presentan los resultados obtenidos, así como las condiciones en que se realizó cada uno de los experimentos.

IV) INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE β -GLUCOSIDASA:

Se realizó una serie de cuatro experimentos en los que se varió la actividad β -glucosidasa inicial de la disolución enzimática añadida al medio de reacción entre 0.3 y 4 UI/ml.

Los resultados obtenidos y las condiciones en las que se llevó a cabo cada experimento se detallan en las tablas 5.32 y 5.41 a 5.43.

V) INFLUENCIA DEL pH:

Con el fin de estudiar la influencia del pH del medio sobre la velocidad de reacción, se realizaron tres experimentos en los que se varió el pH entre 3.5 y 6.3.

En las tablas 5.32, 5.44 y 5.45 se presentan los resultados obtenidos y las condiciones de operación en las que se llevaron a cabo los experimentos de hidrólisis.

5.4.2. HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO:

1) INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACION:

En primer lugar y debido a que en el caso de la hidrólisis con enzima inmovilizada esta se encuentra retenida sobre un soporte sólido, es posible que existan problemas de difusión externa de los reactivos o de los

productos y por lo tanto que la velocidad de agitación pueda influir sobre la cinética de hidrólisis. A fin de determinar esta influencia, se realizaron tres experimentos, uno de ellos sin agitación y los otros dos con una velocidad de agitación de 200 y 400 r.p.m.

En las tablas 5.46 a 5.48 se detallan los resultados obtenidos manteniéndose constantes las restantes condiciones de operación.

II) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA:

Con objeto de estudiar la influencia de la temperatura de operación sobre la hidrólisis enzimática de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada sobre nylon en polvo se llevó a cabo una serie de cinco experimentos, a temperaturas comprendidas entre 30 y 70 °C.

En las tablas 5.47 y 5.49 a 5.52 se detallan tanto los resultados obtenidos como las restantes variables de operación utilizadas en los experimentos.

III) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CELOBIOSA:

Se realizaron cinco experimentos de hidrólisis a 60 °C en los que se varió la concentración inicial de celobiosa en el medio de reacción entre 2 y 25 mM.

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 5.47 y 5.53 a 5.56.

IV) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA:

Con el fin de determinar la influencia que la presencia de glucosa en el medio ejerce sobre la hidrólisis enzimática, se realizaron cuatro experimentos a 60 °C en los que se varió la concentración inicial de glucosa en el medio entre 0 y 20 mM.

En las tablas 5.47 y 5.57 a 5.59 se presentan los resultados obtenidos, así como las condiciones en que se realizó cada uno de los experimentos.

V) INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD INICIAL DE β -GLUCOSIDASA:

Se realizaron tres experimentos en los que, con el fin de estudiar la influencia de la actividad enzimática inmovilizada sobre el proceso de hidrólisis, se varió la concentración de soporte, de actividad 17.5 UI/gr entre 0.06 y 0.24 g de soporte/ml de disolución.

Los resultados obtenidos y las condiciones en las que se llevó a cabo cada experimento se detallan en las tablas 5.47, 5.60 y 5.61.

VI) INFLUENCIA DEL pH:

Con el fin de estudiar la influencia del pH del medio sobre la velocidad de reacción, se realizaron tres experimentos en los que se varió el pH entre 3.5 y 6.3.

En las tablas 5.47, 5.62 y 5.63 se presentan los resultados obtenidos y las condiciones de operación en las que se llevaron a cabo los experimentos de hidrólisis.

TABLA 5.1
 INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS POR ADSORCION
 SOBRE DIFERENTES SOPORTES

- Temperatura de inmovilización: 25 °C
- pH: 4.8
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.125 UI/ml
- Concentración de soporte (C_s): 40 g/l

SOPORTE	A_I (UI/g)	R (%)
Sepiolita	9.366	33.3
Gel de sílice	3.713	13.2
Alúmina	2.728	9.7
Almidón	0.000	0.0
Zeolita 5A	2.363	8.4
Zeolita 13X	5.456	19.4
Zeolita 4A	0.000	0.0
Zeolita Y	6.497	23.1
Sílice precipitada	14.288	50.8
Nylon en polvo	5.541	19.7

TABLA 5.2
INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS POR ENTRECruzAMIENTO
CON GLUTARALDEHIDO SOBRE DIFERENTES SOPORTES

- Temperatura de inmovilización: 25 °C
- pH: 4.8
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.125 UI/ml
- Concentración de soporte (C_s): 40 g/l
- Concentración de glutaraldehido: 0.5 % v/v en agua

SOPORTE	A_I (UI/g)	R (%)
Sepiolita	9.788	34.8
Gel de sílice	10.997	39.1
Alúmina	2.700	9.6
Almidón	0.000	0.0
Zeolita 5A	5.569	15.5
Zeolita 13X	4.359	19.8
Zeolita 4A	0.000	0.0
Zeolita Y	10.884	38.7
Sílice precipitada	13.838	49.2
Nylon en polvo	13.275	47.2

TABLA 5.3
 INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS SOBRE DIFERENTES
 SOPORTES POR FORMACION DE UN ENLACE ENZIMA-SOPORTE

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA LA SILICE PRECIPITADA:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- T_{SECADO} : 45 °C
- t_{SECADO} : 24 horas
- C_{TICl_4} : 15 % v/v en HCl

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 4 °C
- t_I : 2 horas

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA EL NYLON EN POLVO:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- O-ALQUILACION:

- # $C_{\text{TT}} = 12.5\% \text{ v/v Cl}_2\text{CH}_2$
- # $t_{\text{TT}} = 15 \text{ min.}$
- # $V_{\text{TT}} = 2.5 \text{ ml}$

- AMINOACTIVACION:

- # $C_{\text{EDA}} = 100\%$
- # $t_{\text{EDA}} = 120 \text{ min.}$
- # $V_{\text{EDA}} = 5 \text{ ml}$

- ACTIVACION CON GLUTARAL:

- # $C_{\text{GLU}} = 5\% \text{ v/v agua}$
- # $t_{\text{GLU}} = 15 \text{ min.}$
- # $V_{\text{GLU}} = 5 \text{ ml}$

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- $T_I = 4 \text{ °C}$
- $A_0 = 1.125 \text{ UI/ml}$
- pH: 4.8
- $C_S = 40 \text{ g/l}$

SOPORTE	A_I (UI/g)	R (%)
Silice precipitada	15.609	55.5
Nylon en polvo	17.156	61.0

TABLA 5.4

DESACTIVACION TERMICA DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS INMOVILIZADA
POR ADSORCION SOBRE SILICE PRECIPITADA Y NYLON EN POLVO

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- Temperatura: 25 °C
- pH: 4.8
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.125 UI/ml
- Concentración del soporte: 40 g/l

CONDICIONES DE DESACTIVACION:

- Temperatura: 50 °C
- pH: 4.8
- Concentración del complejo enzima-soporte (sílice): 0.075 g/ml
- Concentración del complejo enzima-soporte (nylon): 0.20 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte (sílice): 14.29 UI/g
- Actividad del complejo enzima-soporte (nylon): 5.54 UI/g

t(horas)	% ACTIVIDAD INICIAL		
	Enzima libre	Soporte: Sílice	Soporte: Nylon
0.0	100.0	100.0	100.0
2.0	98.5	85.0	80.0
4.0	96.0	48.5	59.0
10.0	39.5	20.2	40.0
24.0	8.0	13.0	22.0
30.0	4.0	12.8	21.6
40.0	0.0	12.7	21.4

TABLA 5.5

DESACTIVACION TERMICA DE β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA POR ENTRECruzAMIENTO
CON GLUTARALDEHIDO SOBRE SILICE PRECIPITADA Y NYLON EN POLVO

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- Temperatura: 25 °C
- pH: 4.8
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.125 UI/ml
- Concentración del soporte: 40 g/l
- Concentración de glutaraldehido: 0.5 % v/v en agua

CONDICIONES DE DESACTIVACION:

- Temperatura: 50 °C
- pH: 4.8
- Concentración del complejo enzima-soporte (sílice): 0.08 g/ml
- Concentración del complejo enzima-soporte (nylon): 0.083 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte (sílice): 13.84 UI/g
- Actividad del complejo enzima-soporte (nylon): 13.28 UI/g

t(horas)	% ACTIVIDAD INICIAL	
	Soporte: Sílice	Soporte: Nylon
0.0	100.0	100.0
2.0	87.0	92.0
4.0	66.5	81.5
10.0	51.8	62.0
24.0	42.0	61.0
30.0	40.0	61.0
40.0	39.5	60.8

TABLA 5.6

DESACTIVACION TERMICA DE β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE
SILICE PRECIPITADA Y NYLON EN POLVO
POR FORMACION DE UN ENLACE ENTRE EL SOPORTE Y LA ENZIMA

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA LA SILICE PRECIPITADA:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- T_{SECADO} : 45 °C
- t_{SECADO} : 24 horas
- C_{TICl_4} : 15 % en HCl

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 4 °C
- t_I : 2 horas

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA EL NYLON EN POLVO:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- O-ALQUILACION:

- # C_{TT} = 12.5% v/v Cl_2CH_2
- # t_{TT} = 15 min.
- # V_{TT} = 2.5 ml

- AMINOACTIVACION:

- # C_{EDA} = 100 %
- # t_{EDA} = 120 min.
- # V_{EDA} = 5 ml

- ACTIVACION CON GLUTARAL:

- # C_{GLU} = 5% v/v agua
- # t_{GLU} = 15 min.
- # V_{GLU} = 5 ml

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- $T_I = 4$ °C
- A_0 : 1.125 UI/ml
- pH: 4.8
- C_s : 40 g/l

CONDICIONES DE DESACTIVACION:

- Temperatura: 50 °C
- pH: 4.8
- Concentración del complejo enzima-soporte (sílice): 0.07 g/ml
- Concentración del complejo enzima-soporte (nylon): 0.064 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte (sílice): 15.61 UI/g
- Actividad del complejo enzima-soporte (nylon): 17.16 UI/g

t(horas)	% ACTIVIDAD INICIAL	
	Soporte: Sílice	Soporte: Nylon
0.0	100.0	100.0
2.0	90.0	98.5
4.0	80.0	96.0
10.0	76.5	94.5
24.0	72.0	90.5
30.0	71.8	89.4
40.0	71.9	86.4

TABLA 5.7

ESTABILIDAD TERMICA DE β -GLUCOSIDASA PROCEDENTE DE DIFERENTES
FUENTES INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA EL NYLON EN POLVO:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- O-ALQUILACION:

$C_{TT} = 12.5\%$ v/v Cl_2CH_2 # $t_{TT} = 15$ min.# $V_{TT} = 2.5$ ml

- AMINOACTIVACION:

$C_{EDA} = 100\%$ # $t_{EDA} = 120$ min.# $V_{EDA} = 5$ ml

- ACTIVACION CON GLUTARAL:

$C_{GLU} = 5\%$ v/v agua# $t_{GLU} = 15$ min.# $V_{GLU} = 5$ ml

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- $T_I = 4$ °C - $A_0 : 1.125$ UI/ml- pH: 4.8 - $C_s : 40$ g/l

CONDICIONES DE DESACTIVACION:

- Temperatura: 50 °C

- pH: 4.8

- Concentración del complejo enzima-soporte (nylon): 0.064 g/ml

- Actividad del complejo enzima-soporte (nylon): 17.16 UI/g

t(horas)	% ACTIVIDAD INICIAL			
	<i>T. reesei</i>	<i>N. crassa</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. funi.</i>
0.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1.5	60.5	101.6	91.3	98.3
2.5	51.0	99.2	79.6	98.5
3.5	47.8	100.0	79.6	98.1
24.0	39.6	98.9	75.6	98.2
26.5	38.2	97.5	74.5	97.2
44.0	31.5	94.0	74.9	97.1
46.0	31.7	93.0	73.8	96.7
50.5	30.6	93.0	74.2	96.9

TABLA 5.8
 INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: REPETITIVIDAD DE RESULTADOS

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) O-alkilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos

- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos

- Concentración de etilendiamina, C_{EDA} : 100%

111) Activación con glutaraldehído:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos

- Concentración de glutaraldehído, C_{GLU} : 5% v/v en agua

- INMOVILIZACION:

- Tiempo, t_I : 15 horas

- Temperatura, T_I : 25 °C

- Actividad disolución enzimática inicial, A_0 : 0.626 UI/ml

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_S : 40 g/l

Experimento	A_I (UI/gr)	R (%)
1	7.5949	48.53
2	7.6105	48.63
3	7.6747	49.04
4	7.5589	48.30

TABLA 5.9

INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AMINOACTIVACION

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) O-alquilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos

111) Activación con glutaraldehído:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos- Concentración de glutaraldehído, C_{GLU} : 5% v/v en agua- INMOVILIZACION:- Tiempo, t_I : 15 horas- Temperatura, T_I : 25 °C- Actividad disolución enzimática inicial, A_0 : 0.626 UI/ml

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_S : 40 g/l

t_{EDA} (minutos)	A_I (UI/gr)	R (%)
0.0	5.5448	35.43
60.0	5.1066	32.63
90.0	6.6888	42.74
120.0	7.6105	48.63
130.0	6.9705	44.54
180.0	3.5103	22.34

TABLA 5.10

INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ETILENDIAMINA

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) O-alkilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos

- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos

111) Activación con glutaraldehído:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos

- Concentración de glutaraldehído, C_{GLU} : 5% v/v en agua

- INMOVILIZACION:

- Tiempo, t_I : 15 horas

- Temperatura, T_I : 25 °C

- Actividad disolución enzimática inicial, A_0 : 0.626 UI/ml

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_S : 40 g/l

C_{EDA} (%)	A_I (UI/gr)	R (%)
0.0	5.5448	35.43
20.0	4.8765	31.26
40.0	5.5980	35.77
60.0	6.3539	40.63
80.0	6.5339	41.75
100.0	7.6105	48.63

TABLA 5.11

INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACTIVACION
 CON GLUTARALDEHIDO

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) O-alkilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos- Concentración de etilendiamina, C_{EDA} : 100%

111) Activación con glutaraldehido:

- Concentración de glutaraldehido, C_{GLU} : 5% v/v en agua- INMOVILIZACION:- Tiempo, t_I : 15 horas- Temperatura, T_I : 25 °C- Actividad disolución enzimática inicial, A_0 : 0.626 UI/ml

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_S : 40 g/l

t_{GLU} (minutos)	A_I (UI/gr)	R (%)
0.0	6.7452	43.13
15.0	7.6105	48.63
30.0	4.7419	30.34
60.0	1.5963	10.20

TABLA 5.12

INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUTARALDEHIDO

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) O-alquilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos- Concentración de etilendiamina, C_{EDA} : 100%

111) Activación con glutaraldehido:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos- INMOVILIZACION:- Tiempo, t_I : 15 horas- Temperatura, T_I : 25 °C- Actividad disolución enzimática inicial, A_0 : 0.626 UI/ml

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_s : 40 g/l

C_{GLU} (%)	A_I (UI/gr)	R (%)
0.0	6.7452	43.13
5.0	7.5589	48.30
12.5	8.8203	56.36
25.0	7.2882	46.47

TABLA 5.13

INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INMOVILIZACION

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) *O*-alquilación:- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos- Concentración de etilendiamina, C_{EDA} : 100%

111) Activación con glutaraldehido:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos- Concentración de glutaraldehido, C_{GLU} : 12.5% v/v en agua- INMOVILIZACION:- Tiempo, t_I : 15 horas- Actividad disolución enzimática inicial, A_0 : 0.626 UI/ml

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_S : 40 g/l

T_I (°C)	A_I (UI/gr)	R (%)
4	4.5229	28.90
15	6.5261	41.70
25	7.6105	48.63
35	7.4964	47.90
45	3.1457	20.1

TABLA 5.14

INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INMOVILIZACION

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) O-alquilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos- Concentración de etilendiamina, C_{EDA} : 100%

111) Activación con glutaraldehido:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos- Concentración de glutaraldehido, C_{GLU} : 12.5% v/v en agua- INMOVILIZACION:- Temperatura, T_I : 25 °C- Actividad disolución enzimática inicial, A_0 : 0.626 UI/ml

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_S : 40 g/l

t_I (horas)	A_I (UI/gr)	R (%)
2	3.8843	24.82
4	4.5072	28.80
8	6.7529	43.15
10	7.6231	48.71
15	7.6105	48.63

TABLA 5.15
 INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD INICIAL DE LA
 DISOLUCION ENZIMATICA

CONDICIONES DE OPERACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- Temperatura: Temperatura ambiente

1) O-alquilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos

- Concen. tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

11) Aminoactivación:

- Tiempo, t_{EDA} : 120 minutos

- Concentración de etilendiamina, C_{EDA} : 100%

111) Activación con glutaraldehido:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos

- Concentración de glutaraldehido, C_{GLU} : 5% v/v en agua

- INMOVILIZACION:

- Tiempo, t_I : 15 horas

- Temperatura, T_I : 25 °C

CARACTERISTICAS DEL SOPORTE:

- Masa de soporte: 0.5 g

- Concentración del soporte, C_S : 40 g/l

A_0 (UI/ml)	A_I (UI/gr)	R (%)
0.3836	2.2265	23.22
0.6260	7.6105	48.63
0.7688	9.2833	48.50
1.0359	17.2633	66.66
1.2648	17.6835	55.93
1.9754	17.2006	34.83
2.9525	17.6434	23.90

TABLA 5.16
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 30 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	1.062	102.15
2	30	1.076	103.42
3	45	1.094	105.22
4	60	1.141	109.69
5	120	1.156	111.11
6	180	1.123	108.00
7	455	1.102	106.00
8	1420	0.999	96.15

TABLA 5.17
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 40 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	1.087	104.50
2	30	1.108	106.50
3	45	1.101	105.95
4	60	1.095	105.27
5	120	1.079	103.74
6	180	1.066	102.54
7	455	0.948	91.16
8	1420	0.693	66.66

TABLA 5.18
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 45 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	1.065	102.44
2	30	1.070	102.88
3	45	1.065	102.24
4	60	1.059	101.90
5	120	1.105	100.97
6	180	1.001	96.27
7	455	0.869	83.56
8	1420	0.564	54.22

TABLA 5.19
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 50 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	1.044	100.43
2	30	1.043	100.27
3	45	1.032	99.27
4	60	0.993	95.48
5	120	0.977	93.91
6	180	0.922	88.64
7	455	0.822	79.04
8	1420	0.399	38.42

TABLA 5.20
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 55 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	1.041	100.16
2	30	1.002	96.34
3	45	0.978	94.06
4	60	0.937	90.06
5	120	0.912	87.67
6	180	0.852	81.91
7	455	0.669	64.41
8	1420	0.268	24.83

TABLA 5.21
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 60 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	1.012	97.30
2	30	0.896	86.19
3	45	0.871	83.75
4	60	0.809	77.84
5	120	0.696	66.95
6	180	0.646	62.16
7	455	0.249	23.90
8	1420	0.000	0.00

TABLA 5.22
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 65 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	0.889	85.45
2	30	0.819	78.74
3	45	0.770	74.08
4	60	0.653	62.76
5	120	0.463	44.51
6	180	0.359	34.54
7	455	0.056	0.54
8	1420	0.000	0.00

TABLA 5.23
ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA
DE *Penicillium funiculosum* LIBRE

- pH: 4.8
- Actividad β -glucosidasa de la disolución enzimática: 1.04 UI/ml
- Actividad específica: 1.17 UI/mg de proteína
- Temperatura: 70 °C

MUESTRA	t(minutos)	A (UI/ml)	Act. Residual (%)
0	0	1.040	100.00
1	15	0.812	78.05
2	30	0.587	56.47
3	45	0.536	51.58
4	60	0.245	23.60
5	120	0.000	0.00
6	180	0.000	0.00
7	455	0.000	0.00
8	1420	0.000	0.00

TABLA 5.24

ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

- pH: 4.8
- Actividad inicial del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/g
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Temperatura: 30 °C

MUESTRA	t(minutos)	A _I (UI/g)	Act. Residual (%)
0	0	17.510	100.00
1	15	17.729	101.25
2	30	17.758	101.42
3	60	17.725	101.23
4	120	17.981	102.69
5	500	17.582	100.41
6	720	17.802	101.67
7	1500	17.685	101.00

TABLA 5.25

ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

- pH: 4.8
- Actividad inicial del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/g
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Temperatura: 40 °C

MUESTRA	t(minutos)	A _I (UI/g)	Act. Residual (%)
0	0	17.510	100.00
1	15	18.018	102.90
2	30	17.878	102.10
3	60	18.051	103.09
4	120	17.482	99.84
5	500	18.240	104.17
6	720	17.545	100.20
7	1500	17.837	101.87

TABLA 5.26

ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

- pH: 4.8
- Actividad inicial del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/g
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Temperatura: 50 °C

MUESTRA	t(minutos)	A _I (UI/g)	Act. Residual (%)
0	0	17.510	100.00
1	15	17.510	100.00
2	30	17.545	100.22
3	60	17.212	98.30
4	120	17.247	98.50
5	500	17.179	98.11
6	720	17.102	97.67
7	1500	17.099	97.65

TABLA 5.27

ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

- pH: 4.8
- Actividad inicial del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/g
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Temperatura: 60 °C

MUESTRA	t(minutos)	A _I (UI/g)	Act. Residual (%)
0	0	17.510	100.00
1	15	16.727	95.53
2	30	16.183	92.42
3	60	15.274	87.23
4	120	14.479	82.69
5	500	13.082	74.71
6	720	12.882	73.57
7	1500	12.607	72.00

TABLA 5.28

ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

- pH: 4.8
- Actividad inicial del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/g
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Temperatura: 70 °C

MUESTRA	t(minutos)	A _I (UI/g)	Act. Residual (%)
0	0	17.510	100.00
1	15	17.729	86.75
2	30	17.758	78.82
3	60	17.725	70.23
4	120	17.981	62.69
5	500	17.582	53.41
6	720	17.802	52.67
7	1500	17.685	50.65

TABLA 5.29

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 30 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t (minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.607	0.806	0.040
2	60	9.242	1.521	0.076
3	120	8.196	3.604	0.180
4	180	7.247	5.437	0.273
5	300	5.539	8.917	0.446
6	480	3.711	12.601	0.629
7	600	2.761	14.420	0.724
8	720	1.966	16.079	0.804
9	1000	0.906	18.211	0.909

TABLA 5.30

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 40 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.565	0.884	0.044
2	60	8.815	2.326	0.1185
3	120	7.641	4.703	0.236
4	180	6.294	7.419	0.371
5	300	4.501	10.956	0.549
6	480	2.615	14.787	0.739
7	600	1.665	16.602	0.834
8	720	1.151	17.701	0.885
9	1000	0.436	19.122	0.956

TABLA 5.31

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 50 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.212	1.597	0.079
2	60	8.198	3.619	0.180
3	120	6.472	7.003	0.353
4	180	4.759	10.467	0.524
5	300	2.433	15.143	0.757
6	480	0.632	18.702	0.937
7	600	0.274	19.461	0.973
8	720	0.114	19.783	0.989
9	1000	0.000	19.951	1.000

TABLA 5.32

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.065	1.836	0.0935
2	60	7.542	4.965	0.246
3	120	5.521	8.921	0.448
4	180	3.769	12.502	0.623
5	300	1.447	17.106	0.855
6	480	0.243	19.522	0.976
7	600	0.079	19.906	0.992
8	720	0.022	19.997	0.998
9	1000	0.000	20.051	1.000

TABLA 5.33

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 70 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.076	1.851	0.092
2	60	8.085	3.842	0.192
3	120	6.932	6.156	0.307
4	180	6.474	7.052	0.353
5	300	6.143	7.714	0.386
6	480	6.098	7.901	0.390
7	600	6.061	7.920	0.394
8	720	6.051	7.942	0.395
9	1000	6.051	7.951	0.395

TABLA 5.34

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 2 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.15 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	2.000	0.000	0.000
1	30	1.436	1.122	0.282
2	60	0.850	2.353	0.575
3	120	0.237	3.528	0.882
4	180	0.076	3.876	0.962
5	300	0.007	3.984	0.997
6	480	0.000	4.009	1.000
7	600	0.000	3.999	1.000
8	720	0.000	4.008	1.000
9	1000	0.000	4.007	1.000

TABLA 5.35

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 5 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.15 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	5.000	0.000	0.000
1	30	4.136	1.780	0.173
2	60	3.050	3.918	0.390
3	120	1.567	6.878	0.687
4	180	0.656	8.753	0.869
5	300	0.160	9.800	0.980
6	480	0.008	10.002	0.999
7	600	0.002	10.000	0.999
8	720	0.000	10.004	1.000
9	1000	0.000	10.000	1.000

TABLA 5.36

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 15 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.15 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	15.000	0.000	0.000
1	30	14.190	1.611	0.054
2	60	12.970	4.098	0.135
3	120	10.740	8.524	0.284
4	180	8.714	12.575	0.419
5	300	5.981	18.017	0.601
6	480	2.801	24.396	0.813
7	600	1.544	26.910	0.897
8	720	0.802	28.412	0.947
9	1000	0.164	29.708	0.989

TABLA 5.37

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 25 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.15 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	25.000	0.000	0.000
1	30	24.490	1.001	0.020
2	60	23.475	3.000	0.060
3	120	22.045	5.968	0.118
4	180	20.710	8.610	0.172
5	300	18.380	13.255	0.265
6	480	15.015	19.913	0.399
7	600	13.445	23.110	0.462
8	720	12.420	25.118	0.503
9	1000	7.156	35.605	0.714

TABLA 5.38

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 5 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	5.000	0.000
1	30	9.265	6.400	0.074
2	60	8.142	8.740	0.186
3	120	6.110	12.780	0.389
4	180	4.480	16.040	0.552
5	300	2.170	20.666	0.783
6	480	0.512	23.810	0.944
7	600	0.174	24.720	0.986
8	720	0.070	24.840	0.993
9	1000	0.000	25.000	1.000

TABLA 5.39

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 10 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t (minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	10.000	0.000
1	30	9.465	11.085	0.054
2	60	8.342	13.325	0.166
3	120	6.512	16.982	0.349
4	180	5.030	19.949	0.497
5	300	2.870	24.268	0.713
6	480	0.914	28.185	0.909
7	600	0.377	29.250	0.962
8	720	0.143	29.736	0.986
9	1000	0.024	29.976	0.998

TABLA 5.40

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 20 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.13 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	20.000	0.000
1	30	9.565	20.887	0.044
2	60	8.742	22.540	0.126
3	120	7.212	25.585	0.279
4	180	6.230	27.540	0.377
5	300	3.870	32.267	0.613
6	480	1.763	36.460	0.823
7	600	1.077	37.862	0.892
8	720	0.546	38.928	0.946
9	1000	0.200	39.608	0.980

TABLA 5.41

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD INICIAL DE β -GLUCOSIDASA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 0.32 UI/ml

MUESTRA	t (minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.867	0.266	0.013
2	60	9.348	1.304	0.065
3	120	8.987	2.030	0.101
4	180	7.998	4.006	0.200
5	300	6.751	6.498	0.325
6	480	5.631	8.740	0.437
7	600	4.879	10.240	0.512
8	720	4.173	11.653	0.583
9	1000	3.568	12.862	0.643

TABLA 5.42

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD INICIAL DE β -GLUCOSIDASA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 2.07 UI/ml

MUESTRA	t (minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.265	1.486	0.074
2	60	7.742	4.520	0.226
3	120	5.210	9.580	0.479
4	180	3.582	12.846	0.642
5	300	1.072	17.840	0.892
6	480	0.084	19.820	0.992
7	600	0.016	19.960	0.998
8	720	0.000	19.993	1.000
9	1000	0.000	20.002	1.000

TABLA 5.43

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD INICIAL DE β -GLUCOSIDASA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 4.00 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	8.265	3.478	0.174
2	60	5.842	8.320	0.416
3	120	2.210	15.582	0.779
4	180	0.421	19.161	0.958
5	300	0.006	19.880	0.994
6	480	0.000	19.995	1.000
7	600	0.000	19.998	1.000
8	720	0.000	20.002	1.000
9	1000	0.000	20.003	1.000

TABLA 5.44

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DEL pH

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 3.5
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.15 UI/g

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.765	0.476	0.024
2	60	9.142	1.720	0.086
3	120	8.510	2.980	0.149
4	180	7.589	4.824	0.241
5	300	6.577	6.840	0.342
6	480	5.423	9.166	0.458
7	600	4.577	10.836	0.542
8	720	3.872	12.257	0.613
9	1000	2.860	14.820	0.741

TABLA 5.45
HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
LIBRE: INFLUENCIA DEL pH

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 6.3
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Actividad inicial de la disolución enzimática: 1.15 UI/g

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.765	0.480	0.024
2	60	8.542	2.920	0.146
3	120	7.210	5.580	0.279
4	180	5.589	8.824	0.441
5	300	3.377	13.240	0.662
6	480	2.023	15.956	0.798
7	600	1.277	17.446	0.872
8	720	0.872	18.257	0.913
9	1000	0.366	19.265	0.963

TABLA 5.46

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACION

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 0 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-sopрте: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-sopрте: 17.5 UI/g

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.607	0.786	0.039
2	60	8.165	3.670	0.184
3	120	6.514	6.970	0.349
4	180	5.486	9.046	0.451
5	300	3.416	13.168	0.658
6	480	1.560	16.820	0.844
7	600	0.873	18.260	0.913
8	720	0.460	19.083	0.954
9	1000	0.125	19.752	0.988

TABLA 5.47

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACION

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/g

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.207	1.578	0.079
2	60	8.165	3.687	0.184
3	120	6.514	6.980	0.349
4	180	4.987	10.025	0.501
5	300	2.416	15.160	0.758
6	480	0.960	18.076	0.904
7	600	0.473	19.060	0.953
8	720	0.160	19.865	0.984
9	1000	0.025	19.958	0.998

TABLA 5.48

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACION

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 400 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.357	1.308	0.065
2	60	8.183	3.620	0.182
3	120	6.451	7.070	0.355
4	180	4.976	10.046	0.503
5	300	2.100	15.868	0.788
6	480	0.958	18.080	0.904
7	600	0.373	19.060	0.963
8	720	0.180	19.683	0.984
9	1000	0.004	20.003	0.998

TABLA 5.49

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 30 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.607	0.788	0.039
2	60	9.442	1.117	0.056
3	120	9.196	1.600	0.080
4	180	8.274	3.455	0.173
5	300	6.539	6.920	0.346
6	480	5.711	9.786	0.489
7	600	4.761	10.480	0.524
8	720	3.960	12.085	0.604
9	1000	2.906	14.178	0.709

TABLA 5.50

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 40 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.787	0.418	0.021
2	60	9.242	1.517	0.076
3	120	8.465	3.000	0.154
4	180	7.514	4.985	0.249
5	300	5.686	8.620	0.431
6	480	3.416	13.166	0.658
7	600	2.221	15.560	0.778
8	720	1.660	16.685	0.834
9	1000	0.676	18.648	0.932

TABLA 5.51

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 50 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.511	0.988	0.049
2	60	8.465	3.077	0.154
3	120	7.514	4.980	0.249
4	180	5.286	9.415	0.471
5	300	2.916	14.160	0.708
6	480	1.161	17.686	0.884
7	600	0.576	18.840	0.942
8	720	0.276	19.445	0.972
9	1000	0.050	19.900	0.995

TABLA 5.52

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 70 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.116	1.758	0.088
2	60	8.165	3.677	0.184
3	120	6.514	6.980	0.349
4	180	4.986	10.025	0.501
5	300	2.916	14.160	0.708
6	480	1.261	17.486	0.874
7	600	0.564	18.880	0.944
8	720	0.260	19.485	0.974
9	1000	0.043	19.921	0.996

TABLA 5.53

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION
 INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 2 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	2.000	0.000	0.000
1	30	1.607	0.788	0.197
2	60	1.265	1.479	0.368
3	120	0.774	2.453	0.613
4	180	0.544	2.910	0.728
5	300	0.184	3.633	0.908
6	480	0.039	3.923	0.981
7	600	0.013	3.976	0.994
8	720	0.004	4.000	0.998
9	1000	0.000	4.002	1.000

TABLA 5.54
HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION
INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 7 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	7.000	0.000	0.000
1	30	6.265	1.468	0.105
2	60	5.774	2.451	0.175
3	120	3.844	6.341	0.451
4	180	2.984	8.022	0.573
5	300	1.346	11.313	0.808
6	480	0.345	13.314	0.951
7	600	0.143	13.706	0.979
8	720	0.064	13.870	0.991
9	1000	0.008	14.002	0.999

TABLA 5.55
 HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION
 INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 15 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	15.000	0.000	0.000
1	30	14.527	0.965	0.032
2	60	13.130	3.749	0.125
3	120	11.550	6.903	0.230
4	180	9.688	10.610	0.354
5	300	6.462	17.075	0.569
6	480	3.457	23.073	0.769
7	600	1.693	26.616	0.887
8	720	0.942	28.110	0.937
9	1000	0.168	29.672	0.989

TABLA 5.56
HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION
INICIAL DE CELOBIOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 25 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	25.000	0.000	0.000
1	30	24.330	1.352	0.027
2	60	23.520	2.959	0.059
3	120	22.620	4.813	0.096
4	180	19.883	10.250	0.205
5	300	16.088	17.803	0.356
6	480	12.650	24.700	0.494
7	600	9.982	30.006	0.601
8	720	7.689	34.610	0.692
9	1000	3.782	42.452	0.849

TABLA 5.57

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION
 INICIAL DE GLUCOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 5 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	5.000	0.000
1	30	9.222	6.552	0.078
2	60	8.165	8.681	0.184
3	120	6.614	11.766	0.338
4	180	5.186	14.616	0.481
5	300	2.986	19.008	0.701
6	480	1.176	22.643	0.882
7	600	0.554	23.902	0.945
8	720	0.280	24.442	0.972
9	1000	0.036	24.920	0.996

TABLA 5.58
HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION
INICIAL DE GLUCOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 10 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	10.000	0.000
1	30	9.221	11.552	0.078
2	60	8.765	12.481	0.124
3	120	6.314	17.376	0.369
4	180	5.486	19.026	0.451
5	300	3.386	23.218	0.661
6	480	1.243	27.523	0.876
7	600	0.670	28.662	0.933
8	720	0.345	29.322	0.966
9	1000	0.043	29.920	0.996

TABLA 5.59

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION
 INICIAL DE GLUCOSA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 20 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t (minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	20.000	0.000
1	30	9.412	21.187	0.059
2	60	8.765	22.481	0.124
3	120	7.411	25.176	0.259
4	180	5.876	28.246	0.412
5	300	3.987	32.008	0.601
6	480	1.865	36.283	0.814
7	600	1.070	37.862	0.893
8	720	0.515	38.972	0.949
9	1000	0.103	39.720	0.987

TABLA 5.60

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD INICIAL
 DE β -GLUCOSIDASA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.12 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	8.671	2.665	0.133
2	60	6.745	6.521	0.326
3	120	4.245	11.520	0.576
4	180	2.187	15.615	0.781
5	300	0.567	18.867	0.943
6	480	0.046	19.999	0.995
7	600	0.011	19.998	0.999
8	720	0.002	20.004	1.000
9	1000	0.000	20.001	1.000

TABLA 5.61

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD INICIAL
 DE β -GLUCOSIDASA

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 4.8
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-soporte: 0.24 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	6.986	6.021	0.301
2	60	3.523	12.961	0.648
3	120	0.546	18.920	0.945
4	180	0.087	19.815	0.991
5	300	0.002	19.997	1.000
6	480	0.000	19.999	1.000
7	600	0.000	19.998	1.000
8	720	0.000	20.001	1.000
9	1000	0.000	20.006	1.000

TABLA 5.62

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DEL pH

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 3.5
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-sustrato: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.814	0.375	0.019
2	60	9.234	2.540	0.077
3	120	8.765	2.485	0.124
4	180	7.543	4.920	0.246
5	300	6.086	7.825	0.391
6	480	4.198	11.605	0.580
7	600	3.357	13.275	0.664
8	720	2.680	14.638	0.732
9	1000	1.345	17.321	0.866

TABLA 5.63

HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*
 INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO: INFLUENCIA DEL pH

CONDICIONES DE OPERACION:

- Temperatura: 60 °C
- Volumen total: 100 ml
- pH: 6.3
- Concentración inicial de celobiosa: 10 mM
- Concentración inicial de glucosa: 0 mM
- Velocidad de agitación: 200 r.p.m.
- Concentración del complejo enzima-sustrato: 0.06 g/ml
- Actividad del complejo enzima-soporte: 17.5 UI/ml

MUESTRA	t(minutos)	C _{celob.} (mM)	C _{gluco} (mM)	CONVERSION
0	0	10.000	0.000	0.000
1	30	9.434	1.145	0.057
2	60	9.198	1.600	0.080
3	120	8.342	3.315	0.166
4	180	6.487	7.021	0.351
5	300	4.598	10.804	0.540
6	480	2.765	14.487	0.724
7	600	1.487	17.020	0.851
8	720	1.056	17.878	0.894
9	1000	0.431	19.141	0.957

6. DISCUSION DE RESULTADOS

6.1. EXPERIMENTOS PREVIOS

6.1.1. SELECCION DEL SOPORTE Y DE LA TECNICA DE INMOVILIZACION

Tal y como se indica en el apartado 2.2.3. de la Introducción, la adición de β -glucosidasa al complejo celulasas producido por el hongo *Trichoderma reesei*, permite aumentar el rendimiento en la conversión de celulosa en azúcares reductores. Si la β -glucosidasa adicionada se encuentra en forma inmovilizada, es posible utilizar la misma enzima en diferentes sacarificaciones y, además, si el método de inmovilización es el adecuado, la estabilidad térmica de la enzima y su vida media suelen aumentar de forma importante tras la inmovilización.

Sin embargo, no existe un método de inmovilización ni un soporte que puedan considerarse válidos para todas las enzimas y usos. Para seleccio-

nar tanto el método como el soporte para la inmovilización es necesario conocer los grupos funcionales de la enzima aptos para la unión. Asimismo, es importante conocer los grupos funcionales de su centro activo, con el fin de evitar su participación en el proceso de inmovilización, ya que esto disminuiría la actividad de la enzima inmovilizada.

Por lo que se refiere a la β -glucosidasa, poco se conoce sobre su secuencia de aminoácidos y su distribución espacial, así como sobre los grupos funcionales que constituyen su centro activo, si bien parece ser que existe al menos un grupo carboxilo en el mismo en el caso de la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei*, una de las más investigadas (Macarrón, 1988). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen importantes variaciones en la secuencia de aminoácidos, así como, en los que constituyen el centro activo, según el origen de la β -glucosidasa.

Teniendo en cuenta todo esto, se estudiaron diferentes soportes y métodos de inmovilización con el fin de elegir las condiciones de inmovilización y el soporte más adecuados, utilizando β -glucosidasa de almendras.

Se ensayaron un total de diez soportes tanto de naturaleza orgánica, polímeros naturales (almidón) y artificiales (nylon), como de naturaleza inorgánica (sílice precipitada, gel de sílice, sepiolita, alúmina y diferentes zeolitas).

Por su sencillez, se eligió como primer método de inmovilización la adsorción física de la enzima sobre los diferentes soportes.

En los resultados obtenidos, que se resumen en la tabla 5.1. y se presentan en la figura 6.1, se observa que entre los diferentes soportes ensayados, la sílice precipitada, soporte de naturaleza inorgánica y porosa, con tamaños de partícula comprendidas entre 60 y 200 μm , proporciona la mayor retención activa ($\cong 50\%$) muy superior a la del resto de los soportes empleados.

Asimismo, es posible descartar dos de los soportes utilizados, almidón y zeolita 4A, ya que con ambos la retención activa observada es prácticamente nula.

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- TEMPERATURA: 25 °C
- pH: 4.8
- ACTIVIDAD INICIAL: 1.125 UI/ml
- C_s : 40 g/l

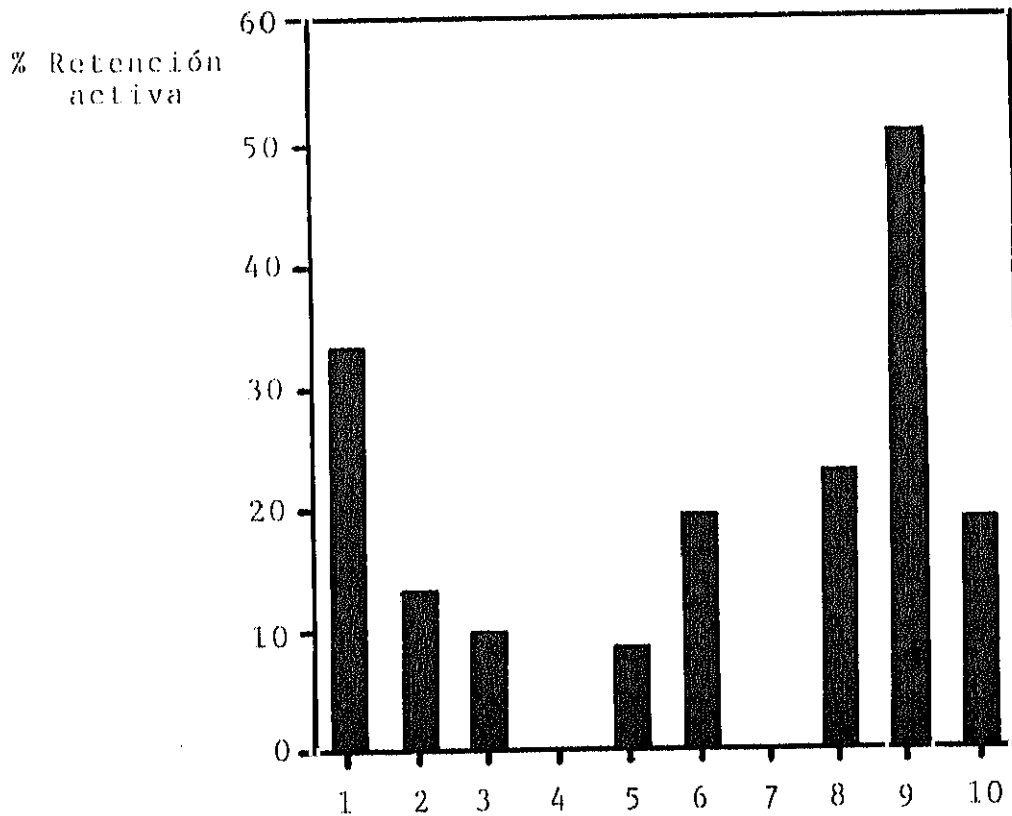


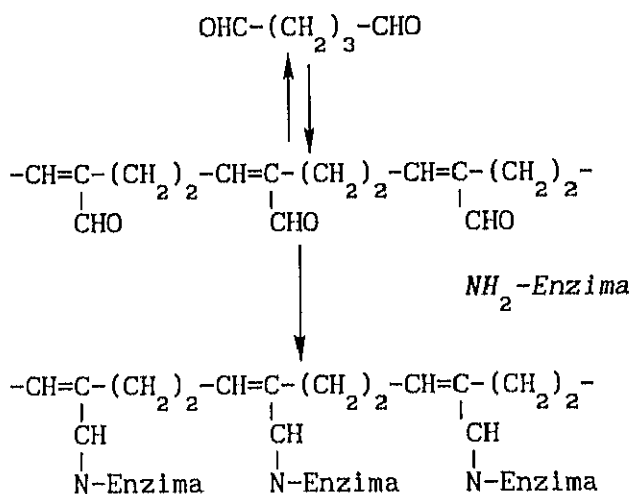
Figura 6.1. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS POR ADSORCION Retención activa sobre los diferentes soportes

- | | |
|------------------|-----------------------|
| 1. Sepiolita | 6. Zeolita 13X |
| 2. Gel de sílice | 7. Zeolita 4A |
| 3. Alúmina | 8. Zeolita Y |
| 4. Almidón | 9. Sílice precipitada |
| 5. Zeolita 5A | 10. Nylon en polvo |

Por lo que se refiere al resto de los soportes, es importante destacar también el 33 % de retención activa alcanzada al utilizar como sepiolita. Las diferentes zeolitas utilizadas proporcionan mayores retenciones activas, aunque siempre pequeñas, al aumentar la relación Si/Al de las mismas. Así, con la zeolita Y (Si/Al entre 1.5 y 3) la retención activa fue del 23.1 %, con la 13 X (Si/Al entre 1 y 1.5) fue del 19.5 % y con la zeolita 5A (Si/Al = 1) fue del 8.4 %. Esta influencia puede explicarse por el mayor carácter hidrófilo de las zeolitas cuanto menor es su relación Si/Al, por lo que los de baja relación Si/Al tienden a adsorber preferentemente agua en lugar de moléculas de enzima.

Con el fin de aumentar la retención activa y utilizando los mismos soportes empleados en la inmovilización por adsorción, se estudió la utilización de un agente de entrecruzamiento capaz de unirse al soporte y de unir entre sí las moléculas de enzima.

El agente de entrecruzamiento elegido fue el glutaraldehído, agente bifuncional capaz de formar enlaces irreversibles con la enzima dando lugar a bases de Schiff muy estables. La reacción entre el glutaraldehído y la enzima implica, probablemente (Richards, 1968) la adición conjugada de los grupos amino de la enzima al grupo carbonilo de los oligómeros α, β -insaturados presentes en las soluciones acuosas comerciales de glutaraldehído, según el siguiente esquema de reacción:



Los resultados obtenidos empleando este método de inmovilización, que se resumen en la tabla 5.2 y se representan en la figura 6.2, muestran que para la mayor parte de los soportes ensayados, el empleo de glutaraldehído como agente de anclaje aumenta el porcentaje de actividad enzimática retenida sobre el soporte. Excepciones a este comportamiento son el caso de la zeolita 13X, cuya retención activa disminuye tras su tratamiento con glutaraldehído, así como la alúmina, la sepiolita y la sílice precipitada para las que la retención activa permanece prácticamente constante, por lo que la utilización glutaraldehído no supone, para estos soportes, ninguna ventaja respecto de la adsorción.

Es importante destacar el aumento observado en la gel de sílice, que multiplica por tres la actividad retenida, pero sobre todo el aumento más importante se observa al utilizar nylon como soporte, pasando de un 20% obtenido por adsorción hasta un 47%, obtenido utilizando glutaraldehído. Este aumento puede explicarse por la presencia de grupos amino terminales en la cadena polimérica del soporte. Estos grupos, como ya se ha explicado anteriormente, pueden reaccionar con el glutaraldehído, formando bases de Schiff que a su vez pueden unirse a la enzima por el grupo aldehído del glutaraldehído que queda libre.

Por último se ensayó como método de inmovilización la formación de un enlace químico entre la enzima y el soporte previamente activado. Dado que esta técnica requiere una activación previa específica para cada tipo de soporte con el fin de generar en su superficie grupos capaces de reaccionar con los residuos aminoácidos existentes en la enzima, y que dicha activación supone un conjunto complejo de reacciones, se ensayaron únicamente los dos soportes que presentaban una mayor retención activa tras la inmovilización con glutaraldehído: sílice precipitada y nylon en polvo.

En el caso de la sílice precipitada, el método de inmovilización seleccionado fue la formación de una unión metálica enzima-soporte por quelación, empleando $TiCl_4$ como agente activante del soporte (Kennedy, 1972). Los iones titanio de una disolución de cloruro de titanio en ácido clorhídrico, se coordinan octaédricamente con los grupos hidroxilo libres en la superficie de la sílice precipitada que actúan como ligandos, de la forma:

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- TEMPERATURA: 25 °C
- pH: 4.8
- ACTIVIDAD INICIAL: 1.125 UI/ml
- C_s : 40 g/l
- C_{GLU} : 0.5 % v/v en agua

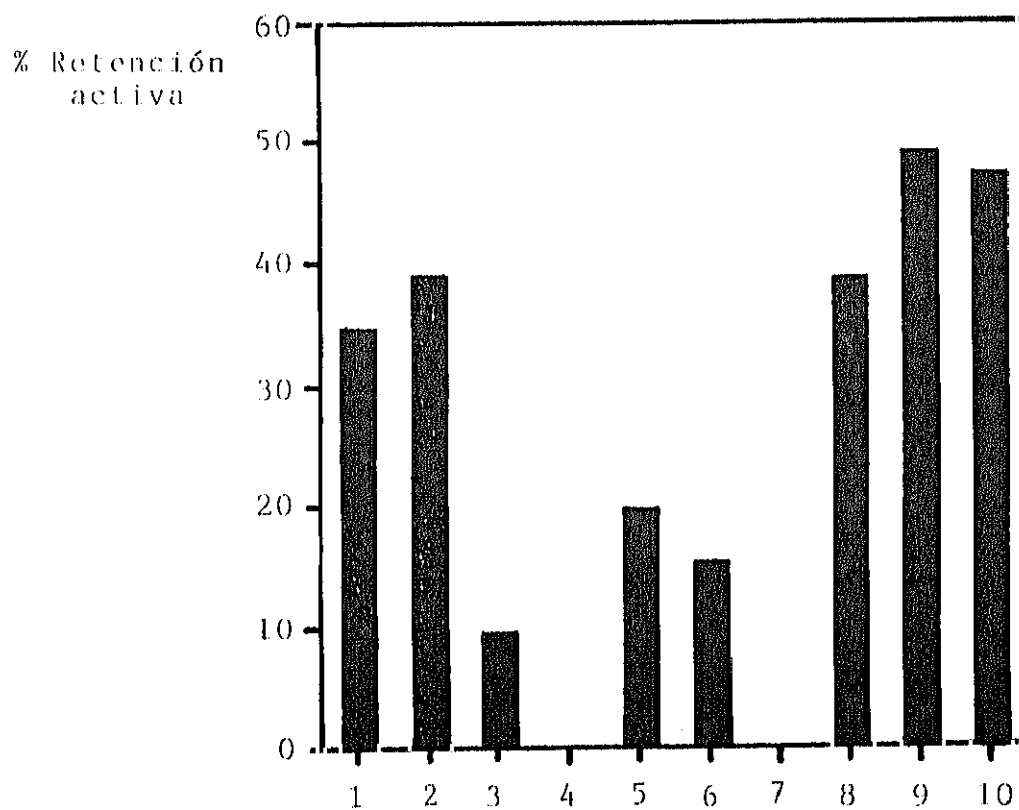
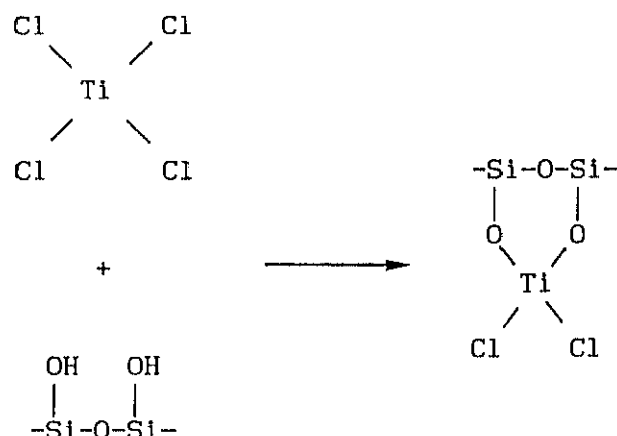


Figura 6.2. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS EMPLEANDO GLUTARALDEHIDO COMO AGENTE DE ANCLAJE: Retención activa sobre los diferentes soportes

- | | |
|------------------|-----------------------|
| 1. Sepiolita | 6. Zeolita 13X |
| 2. Gel de sílice | 7. Zeolita 4A |
| 3. Alúmina | 8. Zeolita Y |
| 4. Almidón | 9. Sílice precipitada |
| 5. Zeolita 5A | 10. Nylon en polvo |



Al mismo tiempo, las enzimas pueden actuar como ligandos por poseer grupos carboxilo libres del C terminal de los aminoácidos, grupos hidroxifenólicos de los residuos tirosilo, grupos sulfhidrilo de los residuos cisteína, etc, por lo que los dos cloruros no reaccionados son sustituidos por cualquiera de estos grupos produciéndose la unión entre la enzima y el soporte.

Mediante este método se consiguió aumentar un 10% la retención activa sobre la sílice precipitada, llegando hasta un 55% (figura 6.3).

En el caso del nylon en polvo se utilizó como método de activación la o-alkilación del soporte con tetrafluoroborato de trietiloxonio para obtener un derivado imidoester que por posterior tratamiento con una amina conduce a amidinas capaces de reaccionar con glutaraldehído para transformar el nylon en una forma activa de alta reactividad frente al grupo NH_2 de las enzimas. El conjunto de reacciones de activación del nylon se pueden resumir según el esquema que se presenta en la figura 6.4.

Este método para activar el nylon presenta frente a otros, también utilizados con frecuencia como la hidrólisis ácida (Sundaram, 1970), la ventaja de no producir alteraciones físicas en la superficie del nylon.

Empleando este método de inmovilización se obtuvieron soportes con una retención activa del 61%, superior a la alcanzada con la sílice por cualquiera de los métodos utilizados, así como, con los anteriormente ensayados para el nylon (figura 6.5).

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR ADSORCION Y CON GLUTARALDEHIDO:

- TEMPERATURA: 25 °C
- pH: 4.8
- ACTIVIDAD INICIAL: 1.125 UI/ml
- C_s : 40 g/l
- C_{GLU} : 0.5 % v/v en agua

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA LA SILICE PRECIPITADA:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:
 - T_{SECAO} : 45 °C
 - t_{SECAO} : 24 horas
 - C_{TiCl_4} : 15 % v/v en HCl
- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:
 - T_I : 4 °C
 - t_I : 2 horas

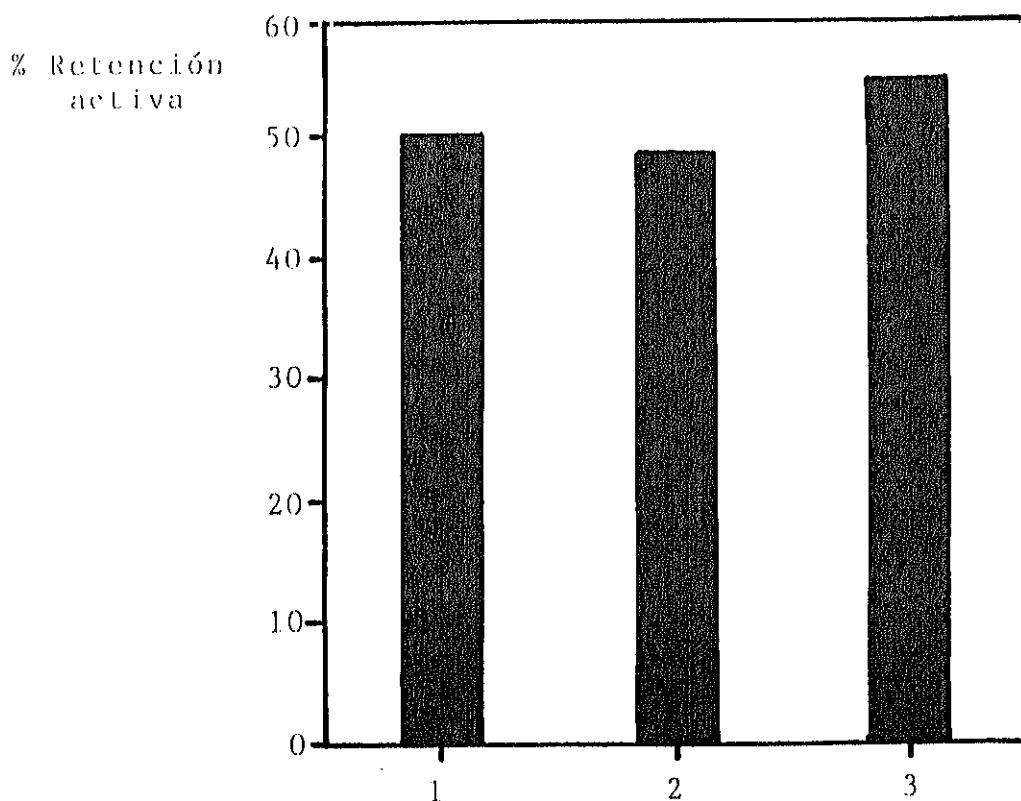


Figura 6.3. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS SOBRE SILICE PRECIPITADA; Retención activa para los diferentes métodos empleados

1. Inmovilización por adsorción
2. Inmovilización empleando glutaraldehido
3. Inmovilización por unión metálica (quelación)

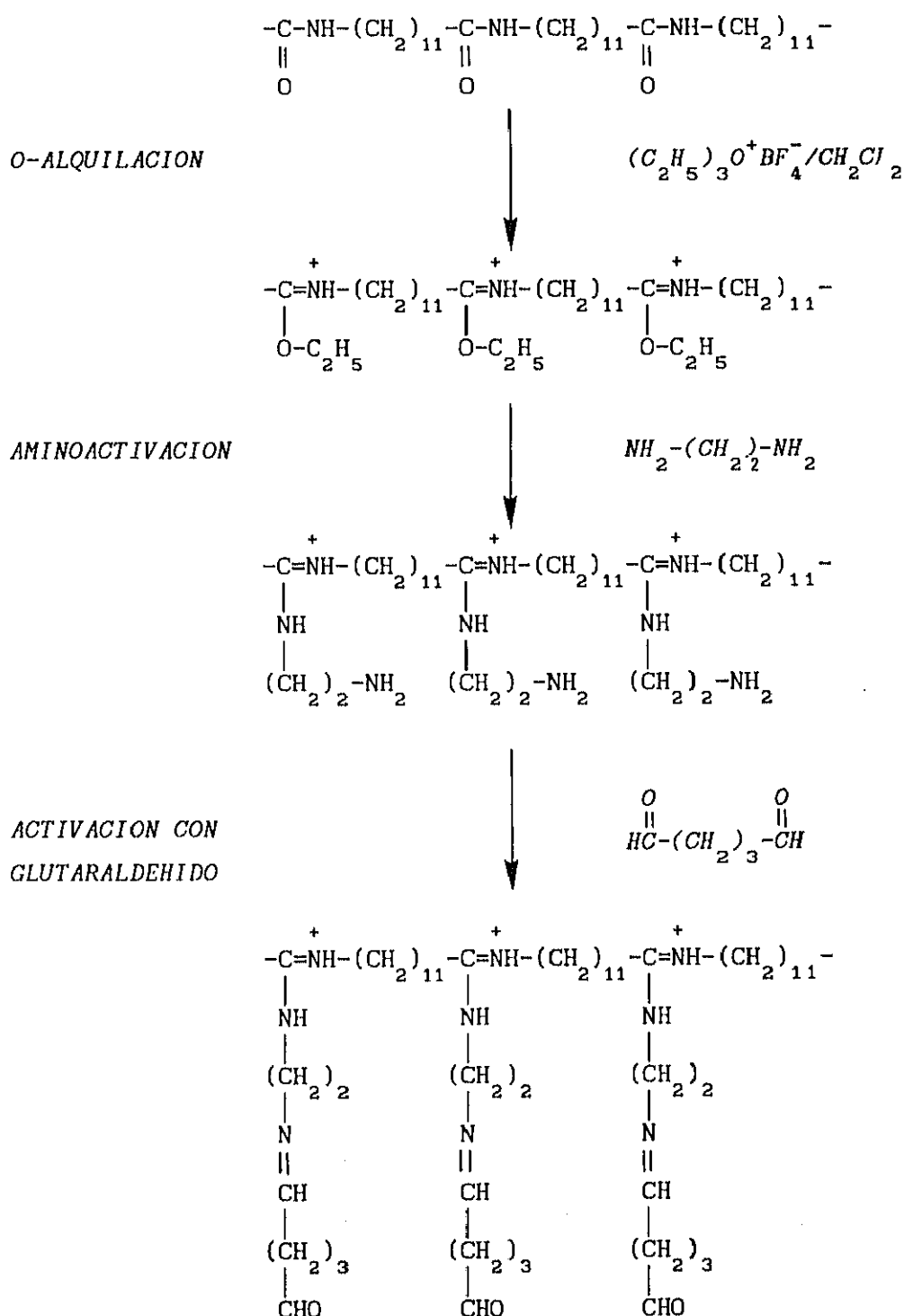


Figura 6.4. Esquema de reacciones del proceso de activación del nylon para su unión covalente a la enzima.

A partir de los resultados obtenidos es posible seleccionar como soportes más adecuados para la inmovilización de β -glucosidasa, por su retención activa, la sílice precipitada y el nylon en polvo, sin embargo,

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR ADSORCION Y CON GLUTARALDEHIDO:

- TEMPERATURA: 25 °C
- pH: 4.8
- ACTIVIDAD INICIAL: 1.125 UI/ml
- C_S : 40 g/l
- C_{GLU} : 0.5 % v/v en agua

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR UNION COVALENTE AL NYLON:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:
- C_{TT} : 12.5 % v/v
- t_{TT} : 15 min.
- C_{EDA} : 100 %
- T: ambiente en todos los pasos
- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:
- T_I : 25 °C
- pH: 4.8
- A_0 : 0.626 UI/ml
- C_S : 40 g/l
- t_I : 15 horas
- t_{EDA} : 120 min.
- C_{GLU} : 5 % v/v
- t_{GLU} : 15 min.

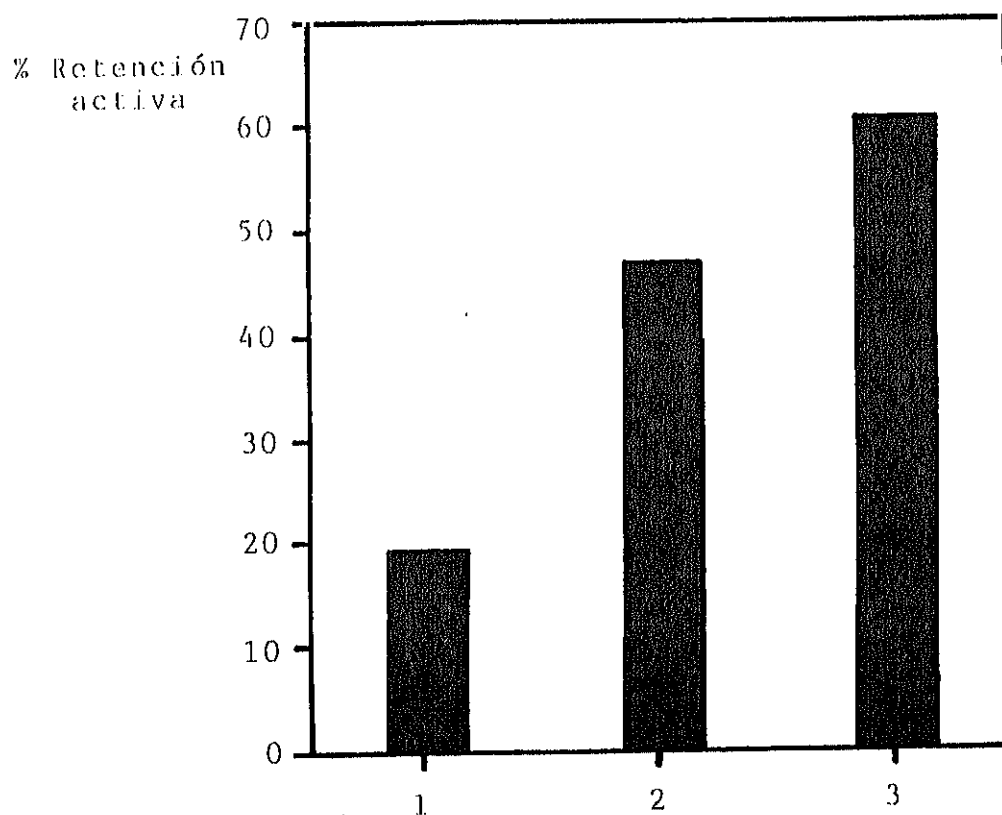


Figura 6.5. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS SOBRE NYLON EN POLVO Retención activa para los diferentes métodos empleados

1. Inmovilización por adsorción
2. Inmovilización empleando glutaraldehido
3. Inmovilización por unión covalente

las pequeñas diferencias observadas en la retención activa sobre ambos soportes para los diferentes métodos ensayados (excepción hecha de la adsorción sobre nylon), unido a la importancia que para su aplicación industrial tiene la estabilidad térmica de la enzima a largo plazo, hicieron recomendable para la selección final de un único soporte y método de inmovilización el estudio de la estabilidad térmica a 50°C de la β -glucosidasa inmovilizada sobre ambos soportes por los distintos métodos, comparándola a su vez con la de la enzima libre a la misma temperatura. Los resultados, que se resumen en las tablas 5.4 a 5.6, están representados en las figuras 6.6 a 6.8.

En la figura 6.6, se representa la desactivación a 50°C tanto de la enzima libre como de la inmovilizada por adsorción sobre los dos soportes seleccionados. En dicha figura se observa que el proceso de inmovilización por adsorción aumenta la estabilidad a largo plazo de la enzima respecto de la forma libre. Hay que destacar que la enzima libre pierde poca actividad durante las cinco primeras horas para a partir de este tiempo producirse una brusca caída de la misma que prácticamente ha desaparecido a las treinta horas. Sin embargo, la enzima inmovilizada presenta para ambos soportes una importante pérdida inicial de actividad hasta alcanzar, aproximadamente a las veinte horas, un valor prácticamente constante de alrededor del 15% de su actividad inicial para la enzima inmovilizada sobre sílice precipitada y un 20% para la inmovilizada sobre nylon en polvo.

Es importante señalar que la pérdida inicial de actividad observada en las enzimas inmovilizadas por adsorción puede atribuirse más a una desorción de la enzima inmovilizada que a una desnaturalización propiamente dicha, ya que las enzimas inmovilizadas por adsorción se unen al soporte mediante fuerzas débiles del tipo Van der Waals y pueden fácilmente desorberse pasando de nuevo al medio, generalmente de forma inactiva, hasta alcanzar el equilibrio correspondiente a la temperatura de trabajo. A partir de este momento la pérdida de actividad es prácticamente despreciable.

En la figura 6.7 se representan los resultados obtenidos al estudiar la desactivación de las enzimas inmovilizadas sobre sílice precipitada y sobre nylon en polvo empleando glutaraldehído como agente de anclaje. Si se comparan los resultados obtenidos con los de la figura 6.6, se observa que la inmovilización empleando glutaraldehído conduce a enzimas inmovilizadas de mayor estabilidad que las obtenidas por adsorción. Este aumento

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR ADSORCION TANTO SOBRE SILICE PRECIPITADA
COMO SOBRE NYLON EN POLVO:

- TEMPERATURA: 25 °C
- pH: 4.8
- ACTIVIDAD INICIAL DE LA DISOLUCION ENZIMATICA: 1.125 UI/ml
- C_s : 40 g/l

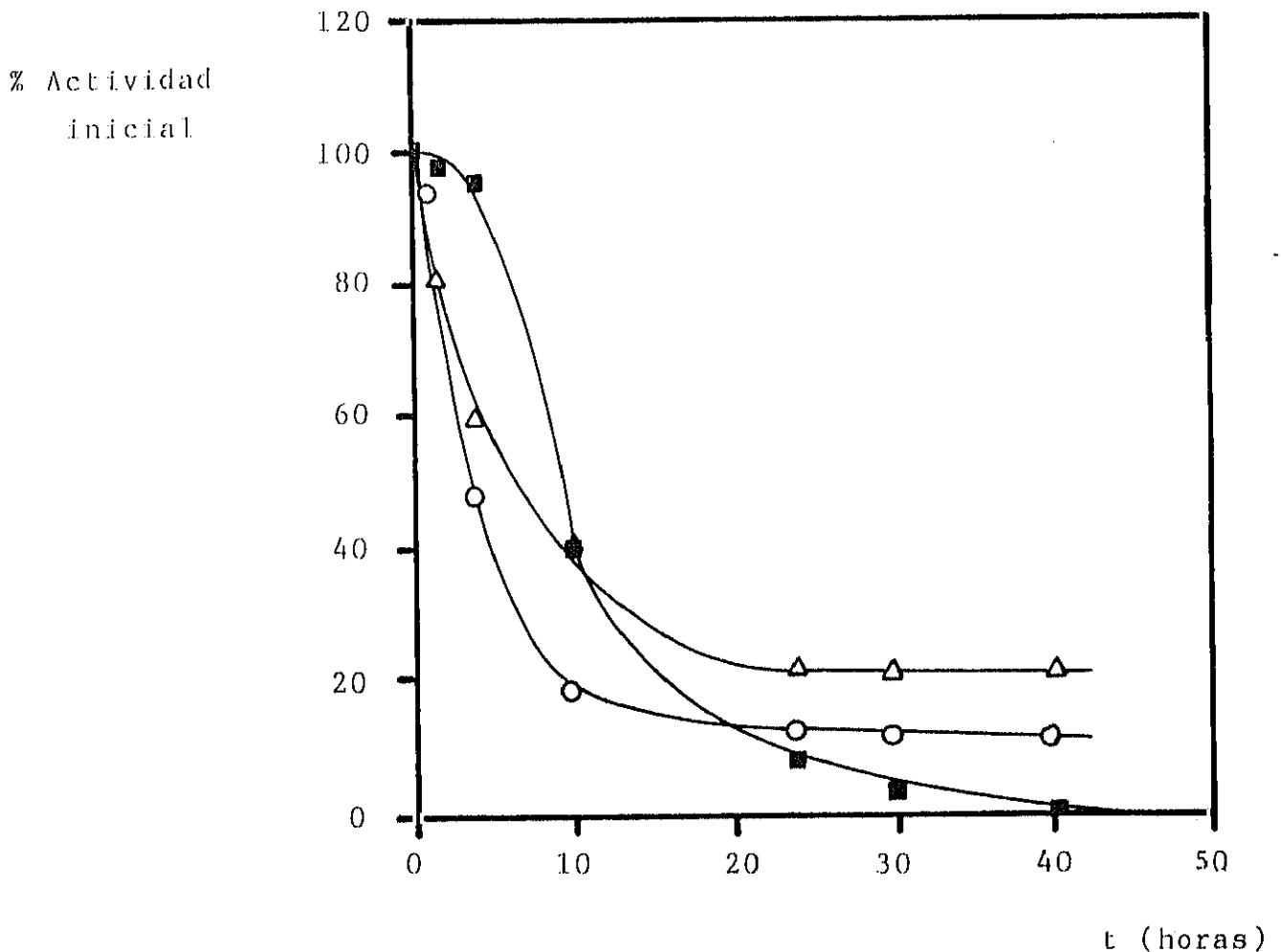


Figura 6.6. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS POR ADSORCION SOBRE DIFERENTES SOPORTES: Estabilidad térmica a 50 °C: ■ Enzima libre; ○ Enzima inmovilizada sobre sílice precipitada; △ Enzima inmovilizada sobre nylon en polvo

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR ENTRECruzAMIENTO CON GLUTARALDEHIDO
TANTO SOBRE SILICE PRECIPITADA COMO SOBRE NYLON EN POLVO:

- TEMPERATURA: 25 °C
- pH: 4.8
- ACTIVIDAD INICIAL: 1.125 UI/ml
- C_s : 40 g/l
- C_{GLU} : 0.5 % v/v en agua

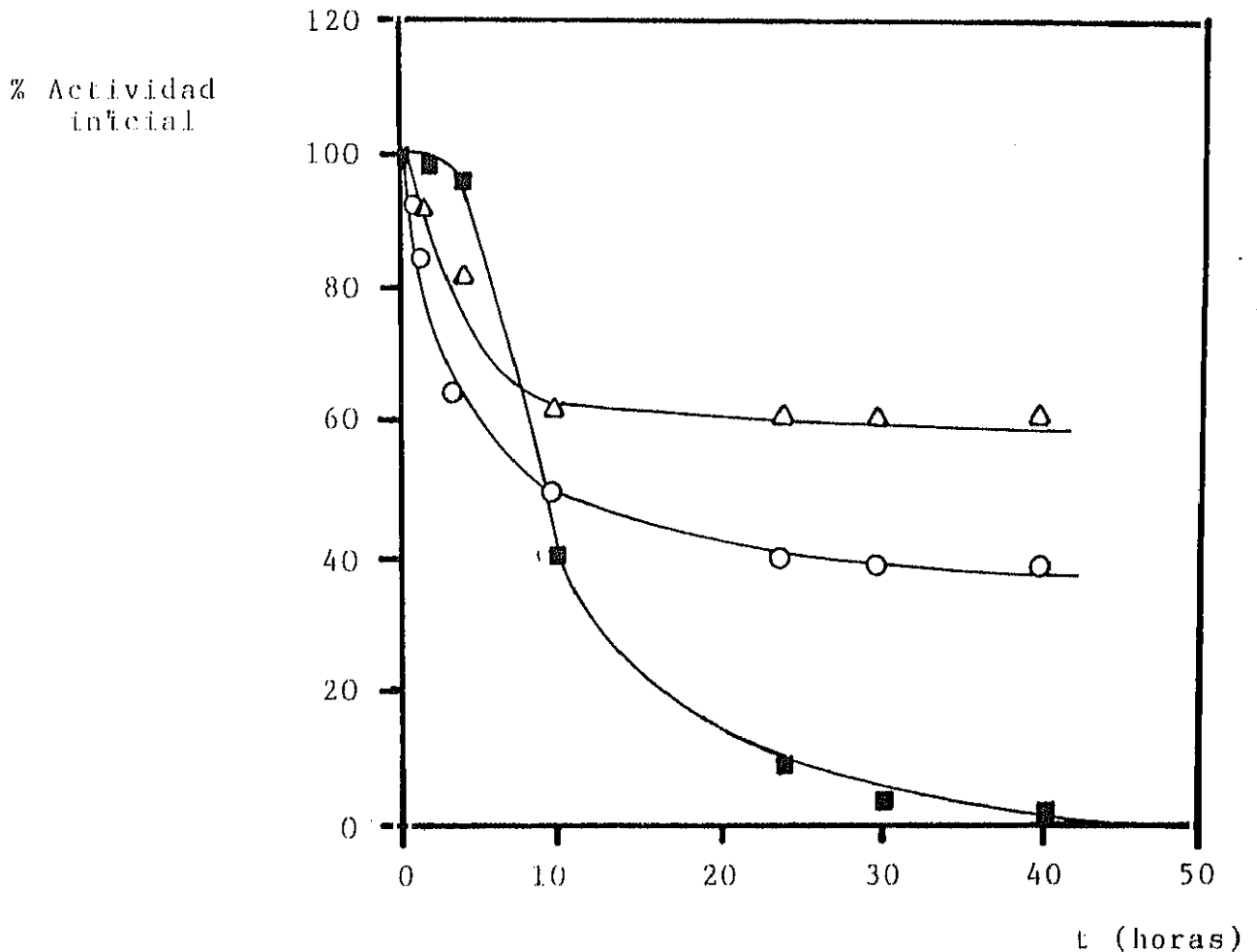


Figura 6.7. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS CON GLUTARALDEHIDO SOBRE DIFERENTES SOPORTES: Estabilidad térmica a 50 °C: ■ Enzima libre; ○ Enzima inmovilizada sobre sílice precipitada; △ Enzima inmovilizada sobre nylon en polvo

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA LA SILICE PRECIPITADA:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- T_{SECADO} : 45 °C
- t_{SECADO} : 24 horas
- C_{TICl_4} : 15 % v/v

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 4 °C
- t_I : 2 horas

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR UNION COVALENTE AL NYLON:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 %
- t_{TT} : 15 min.
- C_{EDA} : 100 %
- T : ambiente en todos los pasos
- t_{EDA} : 120 min.
- C_{GLU} : 5 %
- t_{GLU} : 15 min.

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C
- C_S : 40 g/l
- pH: 4.8
- A_0 : 0.626 UI/ml
- t_I : 15 horas

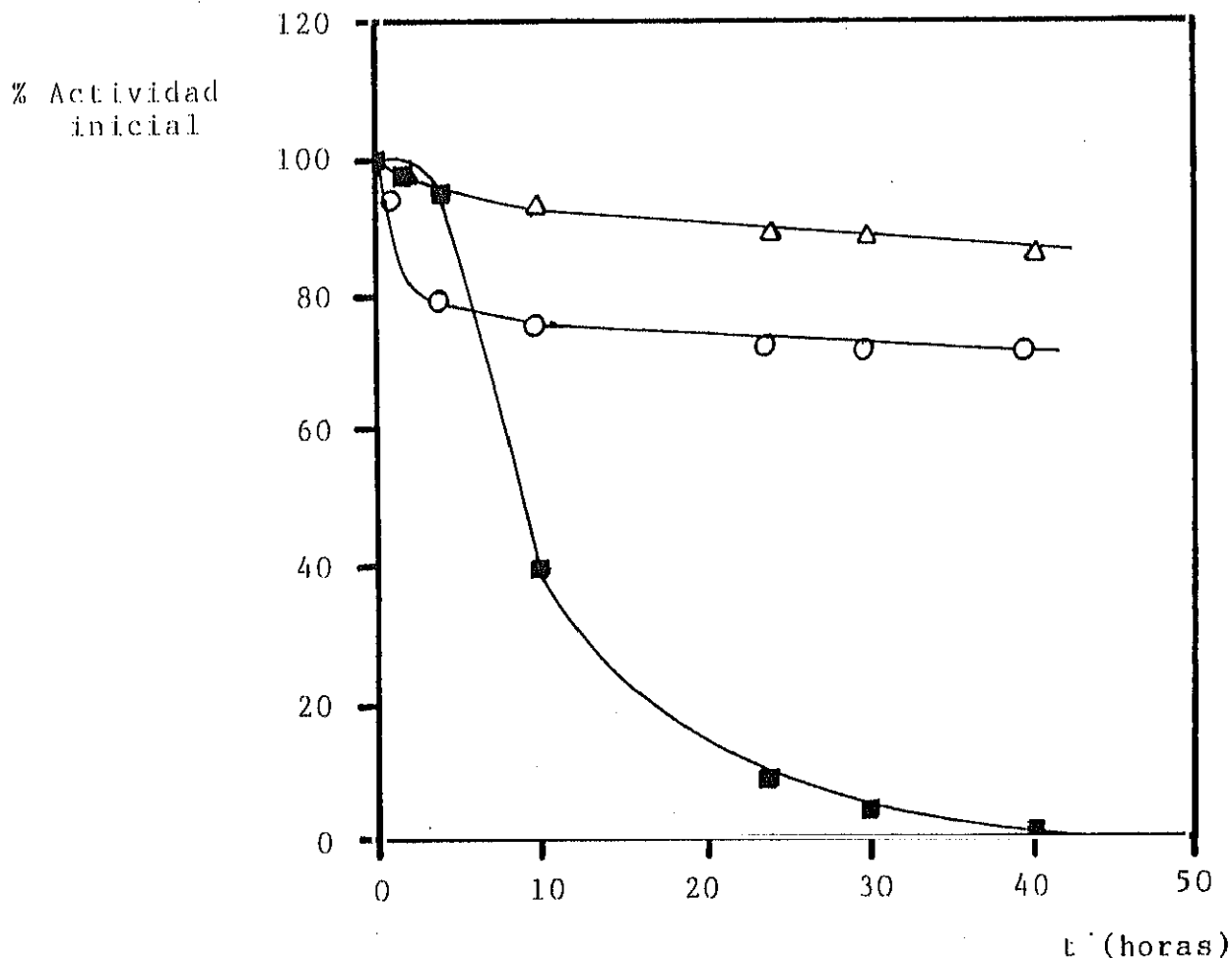


Figura 6.8. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRAS POR UNION QUIMICA SOBRE DIFERENTES SOPORTES: Estabilidad térmica a 50 °C: ■ Enzima libre; ○ Enzima inmovilizada sobre sílice precipitada; △ Enzima inmovilizada sobre nylon en polvo

de estabilidad se debe a que el glutaraldehído forma un enlace tanto con el soporte como con la enzima por lo que la fuerza de unión enzima-soporte aumenta. Al igual que en el caso de adsorción, se observa una caída inicial de la actividad aunque en este caso la disminución es mucho menor, por ser más fuerte el enlace formado. En ambos casos también se alcanza un valor asintótico de la actividad del 40% para la sílice precipitada y del 60% para el nylon en polvo.

Por último, en la figura 6.8 se representa la pérdida de actividad a 50°C tanto de la enzima libre como de las inmovilizadas por formación de una unión metálica sobre la sílice precipitada y de un enlace covalente sobre el nylon en polvo. Es importante destacar el gran aumento observado tanto en la estabilidad de las enzimas inmovilizadas por este método respecto a los dos métodos anteriores. La enzima inmovilizada sobre sílice precipitada pierde únicamente un 25% de su actividad durante las diez primeras horas para, a partir de ese tiempo mantenerse prácticamente constante, mientras que la enzima inmovilizada sobre nylon presenta una pérdida de actividad aún menor inferior al 10%.

Hay que destacar también que en todos los casos, la enzima inmovilizada sobre nylon en polvo presenta una mayor actividad a lo largo del tiempo a la temperatura ensayada. Esto se debe, probablemente a la baja capacidad de adsorción física que posee el nylon, y que ya quedó puesta de manifiesto por la baja retención activa alcanzada al inmovilizar la enzima sobre este soporte por adsorción. Esta baja capacidad de adsorción hace que prácticamente toda la enzima unida al nylon lo esté mediante el enlace covalente, no existiendo así pérdidas de enzima por desorción. Sin embargo, la elevada capacidad de adsorción de la sílice hace que, en todos los casos, una parte de la enzima presente en el medio, se una al soporte por adsorción, provocando la pérdida inicial de actividad observada.

En la figura 6.9 se resumen, de forma comparativa los tantos por ciento de actividad que conservan, tras 40 horas de incubación a 50°C, las enzimas inmovilizadas por los tres métodos utilizados sobre los dos soportes ensayados, pudiendo observarse que el nylon activado por o-alquilación no sólo es el soporte con mayor retención activa ($\approx 60\%$) sino que además, la enzima sobre él inmovilizada conserva, al cabo de 40 horas, el 86.4 % de su actividad inicial. Es de destacar que en las mismas condiciones de incubación, la actividad de la enzima libre es prácticamente nula.

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR ADSORCION Y CON GLUTARALDEHIDO:

- TEMPERATURA: 25 °C
- pH: 4.8
- ACTIVIDAD INICIAL: 1.125 UI/ml
- C_S : 40 g/l
- C_{GLU} : 0.5 % v/v en agua

CONDICIONES DE INMOVILIZACION PARA LA SILICE PRECIPITADA:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:
- T_{SECADO} : 45 °C
- t_{SECADO} : 24 horas
- C_{TiCl_4} : 15 % v/v
- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:
- T_I : 4 °C
- t_I : 2 horas

CONDICIONES DE INMOVILIZACION POR UNION COVALENTE AL NYLON:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:
- C_{TT} : 12.5 %
- t_{TT} : 15 min.
- C_{EDA} : 100 %
- T : ambiente en todos los pasos
- t_{EDA} : 120 min.
- C_{GLU} : 5 %
- t_{GLU} : 15 min.
- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:
- T_I : 25 °C
- pH: 4.8
- A_0 : 0.626 UI/ml
- C_S : 40 g/l
- t_I : 15 horas

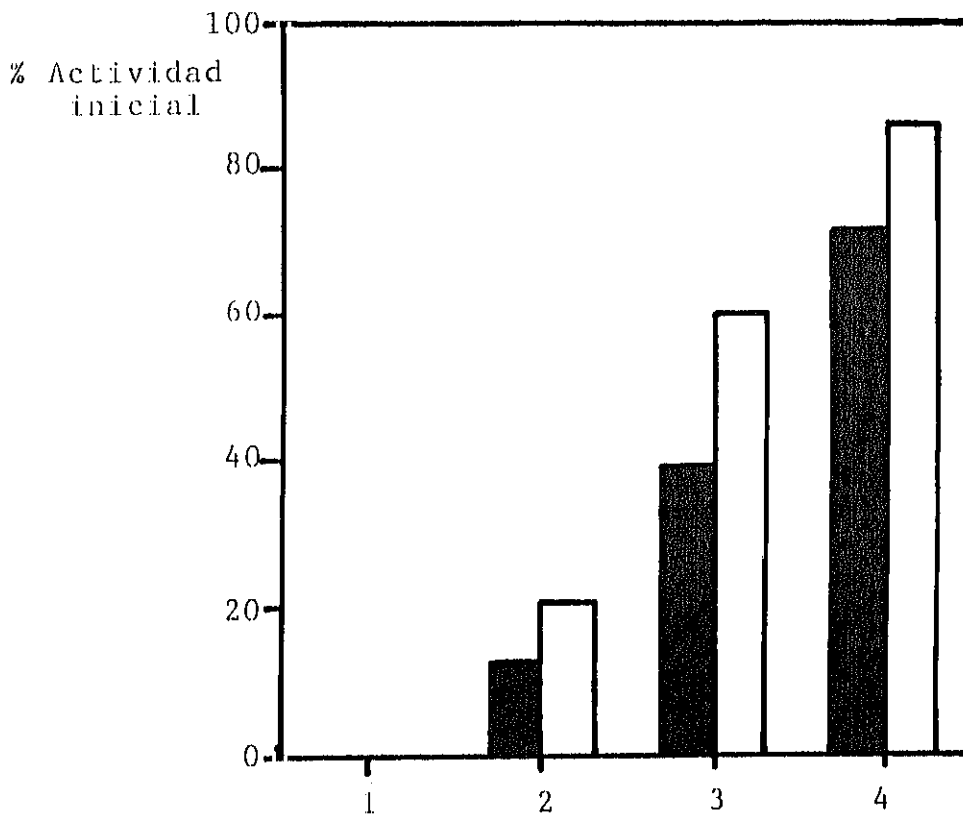


Figura 6.9. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA SOBRE NYLON EN POLVO Y SILICE PRECIPITADA: Estabilidad térmica a 50 °C. Comparación entre los diferentes métodos de inmovilización:

1. β -glucosidasa libre
2. β -glucosidasa inmovilizada por adsorción
3. β -glucosidasa inmovilizada con glutaraldehído
4. β -glucosidasa inmovilizada por unión al soporte

■ Sílice precipitada

□ Nylon en polvo

El nylon presenta además otra importante ventaja, su bajo coste, si se compara con el de otros soportes frecuentemente utilizados en inmovilización y que proporcionan retenciones activas del mismo orden, como la Sepharosa 4B.

A la vista de estos resultados se seleccionó como método de inmovilización la formación de un enlace covalente empleando como soporte nylon en polvo, previamente activado mediante o-alkilación, aminoactivación y activación con glutaraldehído.

6.1.2. INFLUENCIA DEL ORIGEN DE LA β -GLUCOSIDASA EMPLEADA EN LA INMOVILIZACION

Una vez seleccionados método y soporte de inmovilización y dado que β -glucosidasas producidas por diferentes organismos pueden presentar importantes modificaciones tanto en la secuencia base de aminoácidos, como en los grupos funcionales del centro activo, y que esto puede alterar el tipo de unión entre enzima y soporte, se estudió la influencia que tenía el origen de la β -glucosidasa sobre la inmovilización. Para ello se realizaron experimentos comparativos en los que se estudió la estabilidad térmica a 50°C de β -glucosidasa de almendras y celulasas de los hongos *Trichoderma reesei*, *Aspergirus niger*, *Neurospora crassa* y *Penicillium funiculosum*, inmovilizadas sobre nylon en polvo según el método seleccionado previamente. En primer lugar, hay que señalar que solamente en el caso de la β -glucosidasa de almendras se empleó la enzima pura inmovilizando en los restantes casos todo el complejo celulasas aunque midiendo únicamente su actividad β -glucosidasa.

En la figura 6.10, en la que se representan los resultados experimentales de la tabla 5.7, se puede observar que de todas las enzimas ensayadas es el complejo celulasas de *Penicillium funiculosum* el que presenta una mayor estabilidad térmica tras su inmovilización sobre nylon. La β -glucosidasa de *N. crassa* y de almendras presentan también alta estabilidad térmica, sin embargo tienen respecto a la de *Penicillium* algunas desventajas: las celulasas de *N. crassa* no son comerciales, por lo que es preciso realizar la fermentación para obtener las enzimas, la β -glucosidasa de almendras está altamente purificada, lo que eleva su precio de forma importante para una misma actividad respecto de la de *P. funiculosum*.

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{TT} : 15 min.- C_{EDA} : 100 %- t_{EDA} : 120 min.- C_{GLU} : 5 % v/v en agua- t_{GLU} : 15 min.

- T: ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C

- pH: 4.8

- A_0 : 1.125 UI/ml- C_S : 40 g/l- t_I : 15 horas

ACTIVIDAD INICIAL DEL SOPORTE: 14.7 UI/g

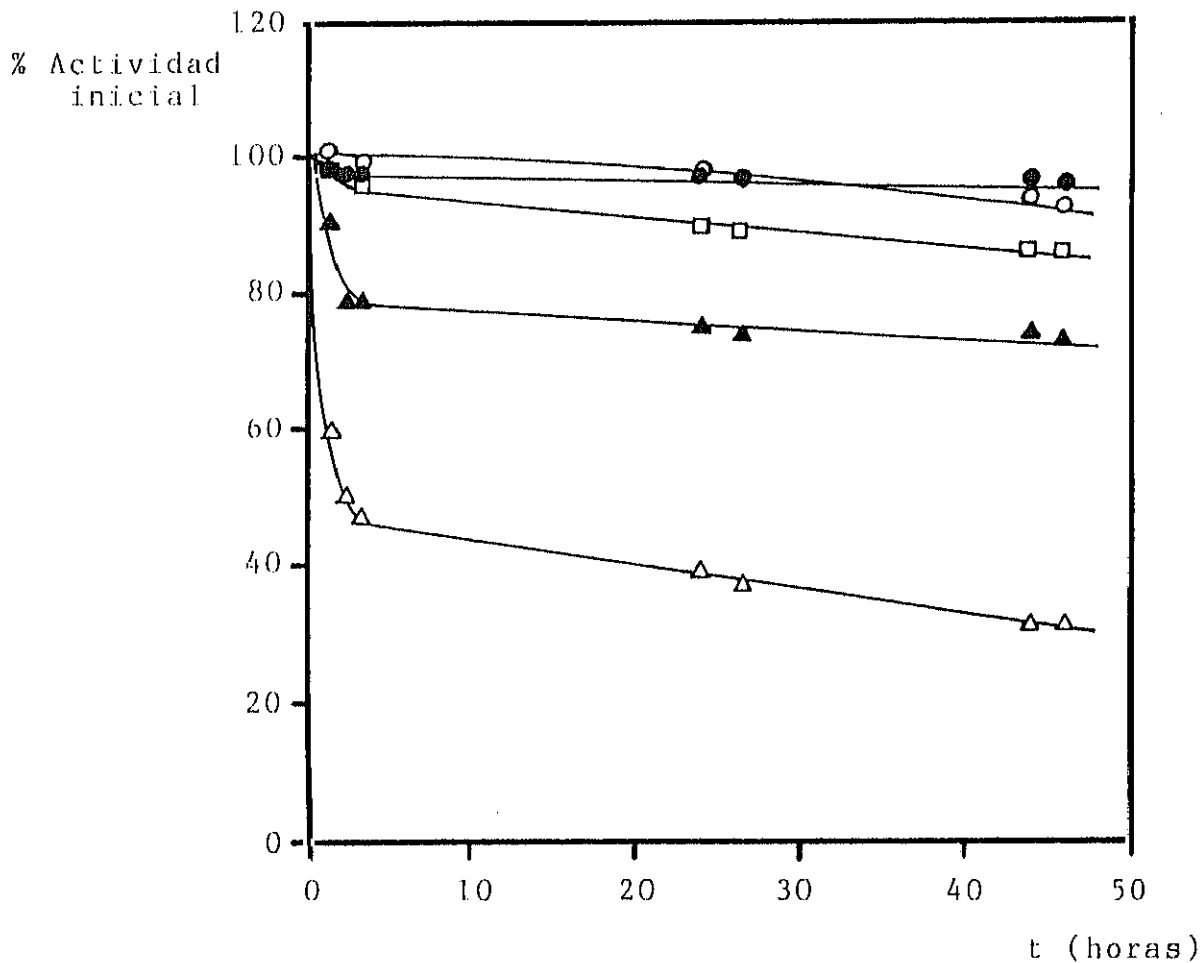


Figura 6.10. COMPARACION ENTRE LAS DIFERENTES FUENTES DE β -GLUCOSIDASA. Estabilidad térmica a 50 °C de las enzimas inmovilizadas sobre nylon en polvo; □ Almendras; △ *T. reesei* (complejo celulasas); ○ *N. crassa* (complejo celulasas); ▲ *A. niger* (complejo celulasas); ● *P. funiculosum* (complejo celulasas)

A partir de estos resultados se seleccionó, para el resto de la investigación, el complejo celulasas de *P. funiculosum* para inmovilizar su actividad β -glucosidasa.

6.2. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO

Una vez seleccionados el soporte y el método de inmovilización así como la fuente de β -glucosidasa que proporcionan los mejores resultados en la inmovilización, se procedió al estudio de la influencia de las distintas variables sobre los diferentes pasos del proceso de inmovilización, tanto sobre la activación del soporte como sobre la inmovilización propiamente dicha. Para ello se partió del método empleado por Morris (1975) para inmovilizar hexoquinasa y glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa sobre tubo de nylon para su utilización en análisis clínicos de glucosa, modificándose todas las variables que se consideró podían influir en el proceso y midiendo la retención activa en cada caso.

6.2.1. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES DE INMOVILIZACION

6.2.1.1. Repetitividad de resultados:

En primer lugar y con el fin de comprobar si los experimentos realizados eran repetitivos se repitió cuatro veces el mismo proceso de inmovilización realizado por Morris (1975) para el complejo celulasas producido por *P. funiculosum*.

Los resultados obtenidos, que se resumen en la tabla 5.8, se representan en la figura 6.11, pudiéndose observar que los experimentos son altamente repetitivos, con errores inferiores al 1% en todos los casos.

6.2.1.2. Activación del soporte:

La activación del soporte se llevó a cabo, como ya se ha indicado en el apartado 6.1.1. de esta memoria, mediante la *o*-alquilación del soporte con tetrafluoroborato de trietiloxonio diluido en diclorometano y posterior activación con una amina (etilendiamina) y glutaraldehído. El empleo de tetrafluoroborato de trietiloxonio como agente de alquilación frente a otros empleados con anterioridad como el sulfato de dimetilo (Hornby, 1974) presenta las siguientes ventajas: es posible llevar a cabo la reac-

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{TT} : 15 min.- C_{EDA} : 100 %- t_{EDA} : 120 min.- C_{GLU} : 5 % v/v en agua- t_{GLU} : 15 min.

- T: ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_1 : 25 °C

- pH: 4.8

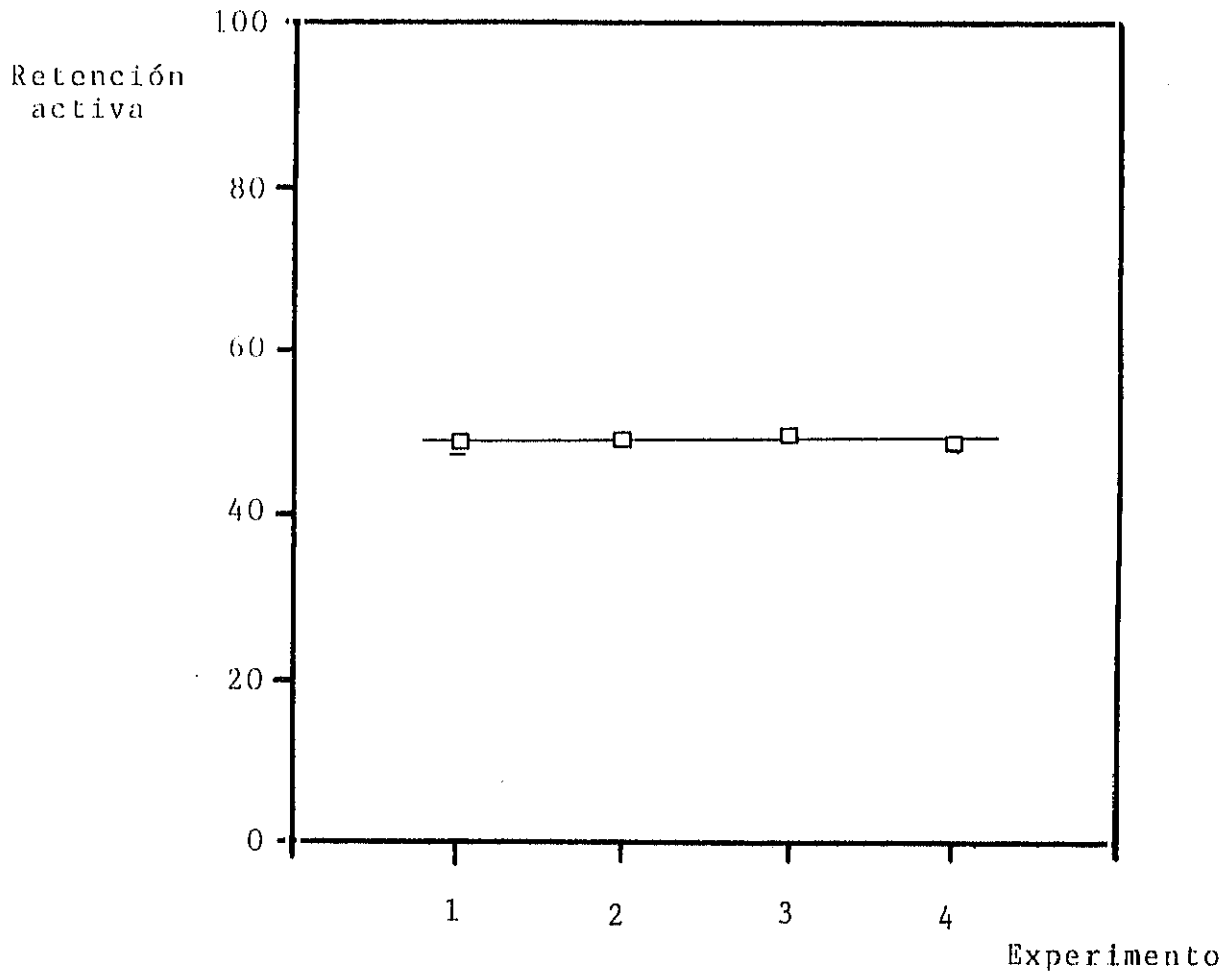
- A_0 : 0.626 UI/ml- C_s : 40 g/l- t_1 : 15 horas

Figura 6.11. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Repetitividad de resultados

ción de alquilación a temperatura ambiente mientras el dimetilsulfato requiere temperaturas del orden de 100°C; la extensión de la reacción puede ser controlada con lo que se obtienen datos más reproducibles; aunque el tetrafluoroborato de trietiloxonio es un veneno por ingestión, su utilización es más segura que la del sulfato de dimetilo pues no desprende vapores venenosos ni produce quemaduras.

De los tres pasos mencionados, en el primero de ellos no se llevó a cabo un estudio detallado de las variables ya que este había sido realizado anteriormente por Morris (1975) y Sundaram (1982) llegando a la conclusión de que las máximas retenciones activas se alcanzaban al utilizar tetrafluoroborato de trietiloxonio diluido al 12.5% en diclorometano, operando a temperatura ambiente, con agitación continua, un tiempo de reacción superior a diez minutos y una relación volumen de disolución/peso de soporte de 5ml/g, condiciones que se seleccionaron para el resto de los experimentos.

Sin embargo, experimentos posteriores realizados para estudiar las variables de los restantes pasos de activación demostraron que:

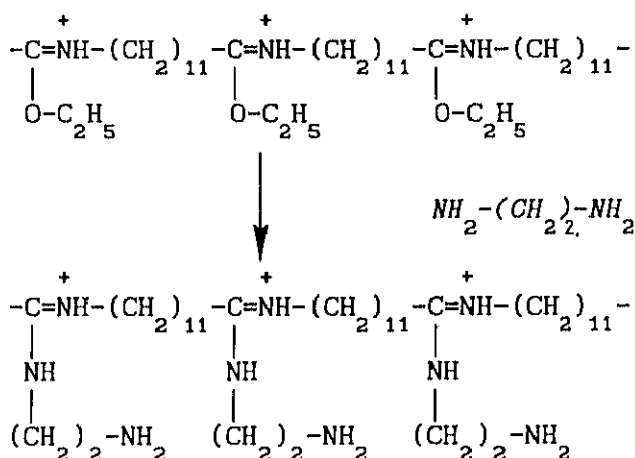
- Temperaturas superiores a 30 °C
- Agitación por encima de 400 r.p.m.
- Tiempos de activación superiores a veinte minutos

provocaban una alteración de las propiedades del nylon, debido a la compactación de sus partículas que se unían para formar un gel incapaz de reaccionar posteriormente con la enzima, aún sometido al resto de los procesos de activación.

Teniendo en cuenta estos efectos se seleccionaron como condiciones fijas para la o-alquilación, una temperatura menor de 30 °C y un tiempo de activación de 15 minutos.

1) AMINOACTIVACION:

Este paso consiste en el tratamiento del imidoester formado en la o-alquilación, con una amina para obtener una amidina, (2^a etapa de la figura 6.4), cuyo esquema es el siguiente:



Este tratamiento tiene dos objetivos fundamentales. Por un lado, el imidoéster es susceptible de ser hidrolizado, lo que conduce a la ruptura de la cadena de polímero, mientras que su reacción con la amina conduce a la formación de la amidina más estable. Por otro lado, aunque es posible llevar a cabo la unión directa de la enzima al soporte o-alkilado, se tendrían complejos enzima-sustrato de mucha menor retención activa que cuando se emplea una amina bifuncional.

En este paso se estudió la influencia de dos variables:

- Tiempo de aminoactivación, t_{EDA}
- Concentración de etilendiamina, C_{EDA}

a) Tiempo de aminoactivación:

Los resultados obtenidos al estudiar la influencia del tiempo de aminoactivación, que se resumen en la tabla 5.9, se representan en la figura 6.12 de la forma retención activa frente a tiempo de aminoactivación.

Se observa que, para tiempos cortos, la retención activa permanece prácticamente constante, existiendo un aumento de la misma a partir de, aproximadamente, 60 minutos. A partir de ese momento, la retención activa continúa aumentando hasta los 120 minutos, tiempo al que se produce un máximo para decaer a continuación de forma brusca. Este comportamiento se puede explicar suponiendo que la reacción precisa de un tiempo previo de activación, superado el cual, comienza la reacción de los grupos $\text{H}_5\text{C}_2-\text{O}-\text{C}=\text{NH}$ con la amina. Una vez han reaccionado todos los grupos presen-

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{TT} : 15 min.- C_{EDA} : 100 %- t_{EDA} : variable estudiada- C_{GLU} : 5 % v/v en agua- t_{GLU} : 15 min.

- T : ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C

- pH: 4.8

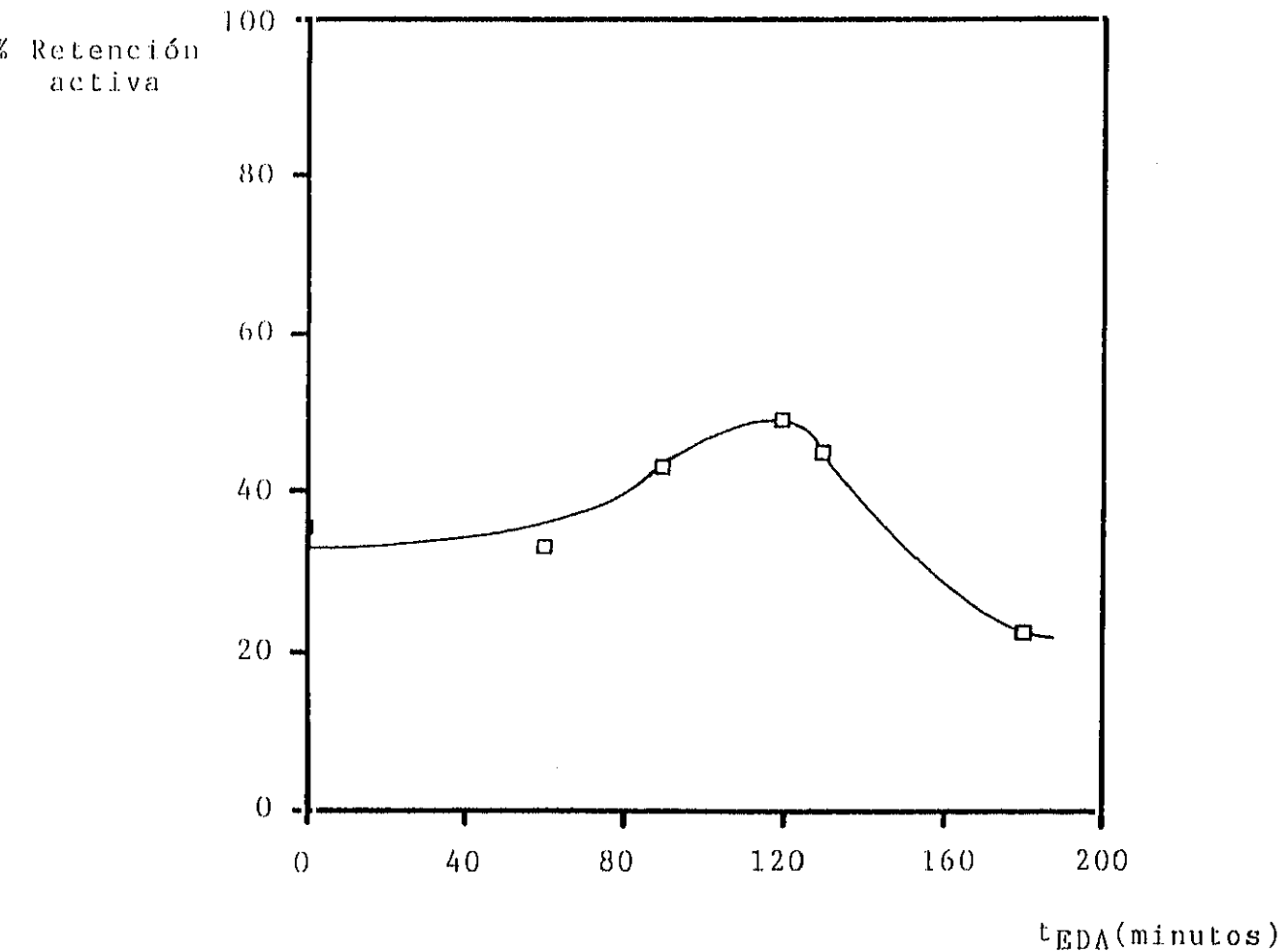
- A_0 : 0.626 UI/ml- C_s : 40 g/l- t_I : 15 horas

Figura 6.12. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Influencia del tiempo de aminoactivación

tes (máximo de actividad), la amina que continúa en el medio debe conducir a reacciones secundarias con el soporte que dificulten su posterior unión a la enzima, con la consiguiente disminución de la retención activa.

b) Concentración de la etilendiamina:

Los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la concentración de etilendiamina en el medio de reacción, y que se resumen en la tabla 5.10, se representan en la figura 6.13 de la forma retención activa frente a la concentración de etilendiamina.

Se observa que, al aumentar la concentración de etilendiamina en el medio, aumenta ligeramente la retención activa, si bien existe un ligero mínimo para una concentración de etilendiamina del 20%. El aumento observado se debe, probablemente, a que a concentraciones bajas, parte de los grupos $\text{H}_5\text{C}_2\text{-O-C=NH}$ no puede reaccionar por no existir suficientes grupos amina en el medio, disminuyendo, por tanto, la capacidad del soporte para unirse a la enzima.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó como tiempo de aminoactivación 120 minutos y como concentración de etilendiamina el 100%.

La temperatura no se consideró una variable importante ya que, en este tipo de reacciones de naturaleza orgánica, es preciso variaciones importantes de temperatura para modificar de forma apreciable la reacción.

II) ACTIVACION CON GLUTARALDEHIDO

En este paso, el soporte aminoactivado se trata con un agente de entrecruzamiento, glutaraldehido, con el fin de aumentar su reactividad respecto a la enzima (Sundaram, 1978). El esquema de reacción sería:

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{TT} : 15 min.- C_{EDA} : variable estudiada- t_{EDA} : 120 min.- C_{GLU} : 5 % v/v en agua- t_{GLU} : 15 min.

- T: ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C

- pH: 4.8

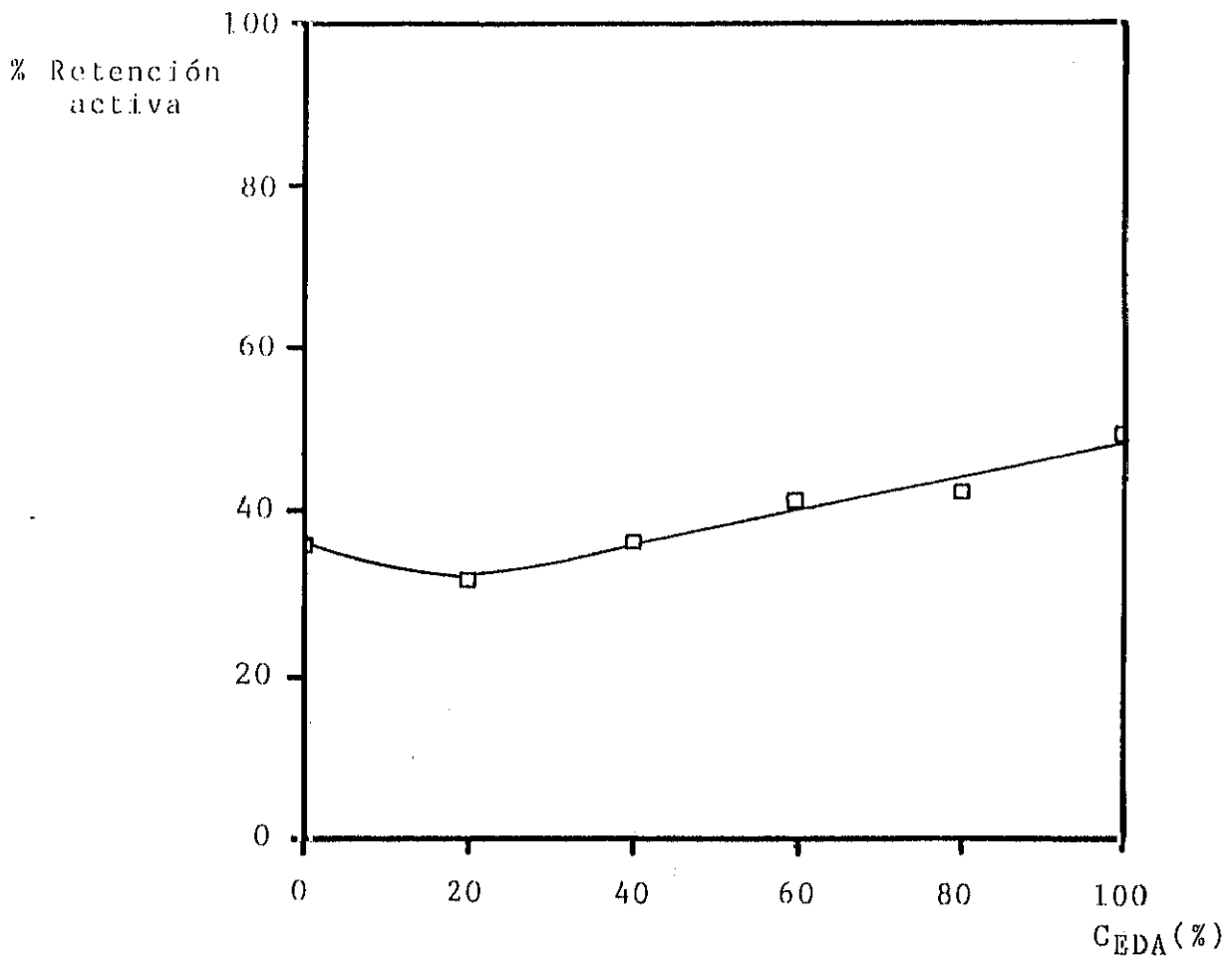
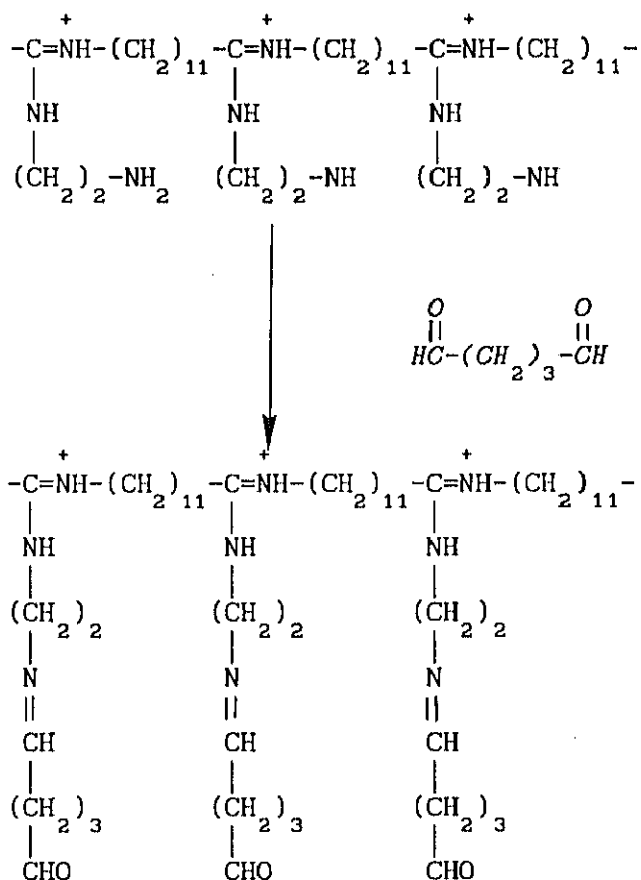
- A_0 : 0.626 UI/ml- C_S : 40 g/l- t_I : 15 horas

Figura 6.13. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Influencia de la concentración de etilendiamina



Las variables estudiadas en este paso fueron:

- Tiempo de activación, t_{GLU}
- Concentración de glutaraldehído, C_{GLU}

a) Tiempo de activación:

Se estudió la variación de la retención activa con el tiempo de activación (figura 6.14). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.11.

Se observa que para un tiempo de activación de 15 minutos, se obtiene un máximo de retención activa. A partir de este tiempo, la retención cae bruscamente debido, probablemente, a que se producen reacciones secundarias del glutaraldehído con el soporte, dando lugar a un soporte con menor capacidad para inmovilizar la enzima.

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2
- t_{TT} : 15 min.
- C_{EDA} : 100 %
- t_{EDA} : 120 min.
- C_{GLU} : 5 % v/v en agua
- t_{GLU} : variable estudiada
- T : ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C
- pH: 4.8
- A_0 : 0.626 UI/ml
- C_S : 40 g/l
- t_I : 15 horas

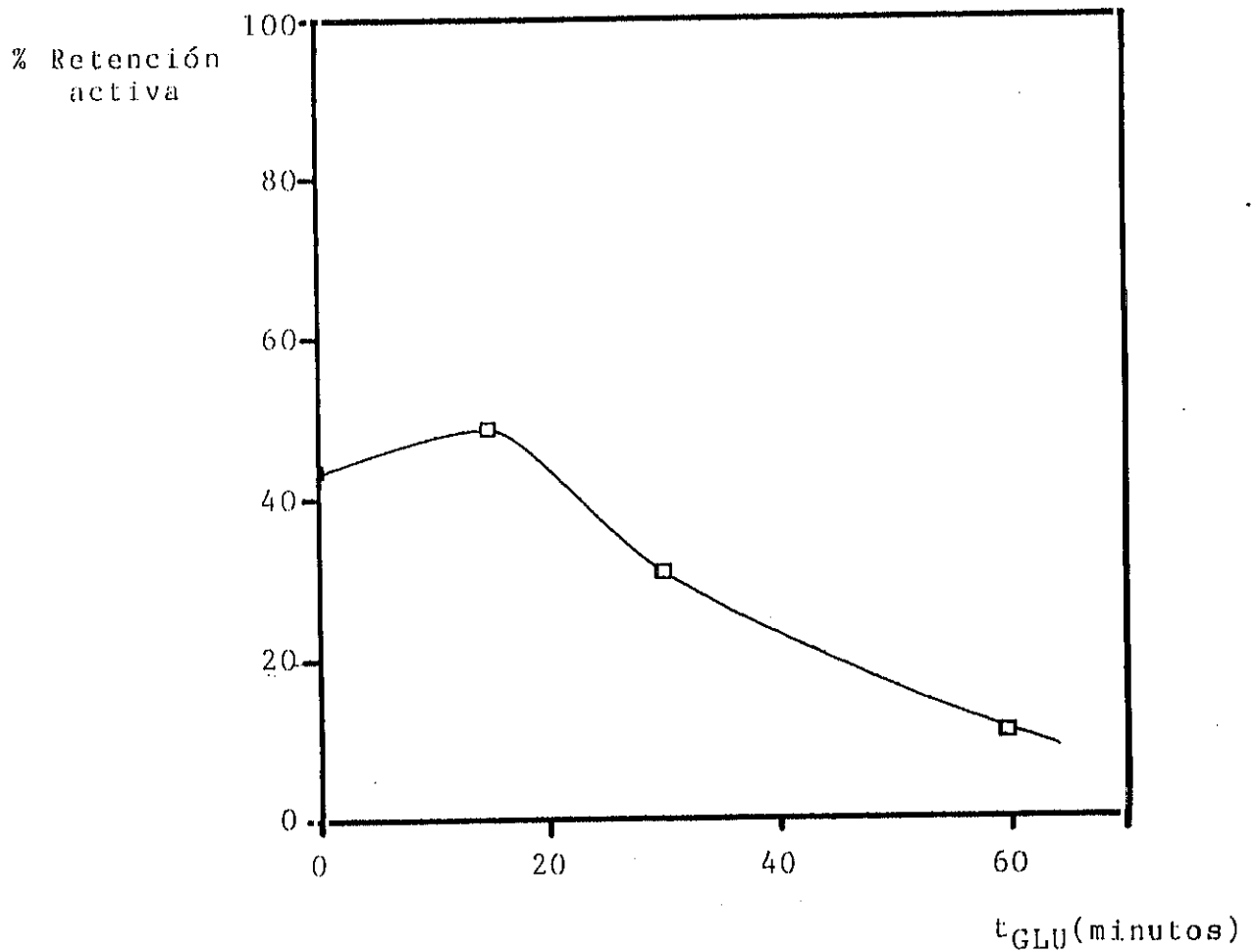


Figura 6.14. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Influencia del tiempo de activación con glutaraldehído.

b) Concentración de glutaraldehido:

Asimismo, se estudió la variación de la retención activa con la concentración de glutaraldehido en disolución acuosa. Los resultados obtenidos, que se resumen en la tabla 5.12, se representan en la figura 6.15.

Se puede observar la existencia de un máximo de retención activa para un valor de la concentración de glutaraldehido de aproximadamente 12.5%. Este máximo puede explicarse de igual forma a como se ha explicado el máximo observado al estudiar la influencia del tiempo de activación.

De ambos efectos se puede deducir, por tanto, que el empleo de glutaraldehido como agente de anclaje mejora ligeramente la retención activa de la enzima siempre que el tratamiento no sea excesivamente prolongado o la concentración del agente excesivamente alta, habiéndose seleccionado como mejores condiciones para la activación con glutaraldehido una concentración del 12.5% y un tiempo de contacto de 15 minutos.

Hay que destacar también, que tiempos de contacto menores no modifican de forma importante la retención, sin embargo tiempos mayores la reducen de forma apreciable.

A la vista de los resultados se seleccionaron las siguientes condiciones de activación del soporte que proporcionan una mayor retención activa:

- **O-alquilación:**

- Tiempo de activación, t_{TT} : 15 minutos

- Concentración de agente activante, C_{TT} : 12.5% v/v en Cl_2CH_2

- **Aminoactivación:**

- Tiempo de activación, t_{EDA} : 120 minutos

- concentración de agente aminante, C_{EDA} : 100%

- **Activación con glutaraldehido:**

- Tiempo de activación, t_{GLU} : 15 minutos

- Concentración de glutaraldehido, C_{GLU} : 12.5% v/v en agua

Fijadas estas, se procedió al estudio de las condiciones de unión de la enzima al soporte activado (etapa de inmovilización propiamente dicha).

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2
- t_{TT} : 15 min.
- C_{EDA} : 100 %
- t_{EDA} : 120 min.
- C_{GLU} : variable estudiada
- t_{GLU} : 15 min.
- T : ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C
- pH: 4.8
- A_0 : 0.626 UI/ml
- C_S : 40 g/l
- t_I : 15 horas

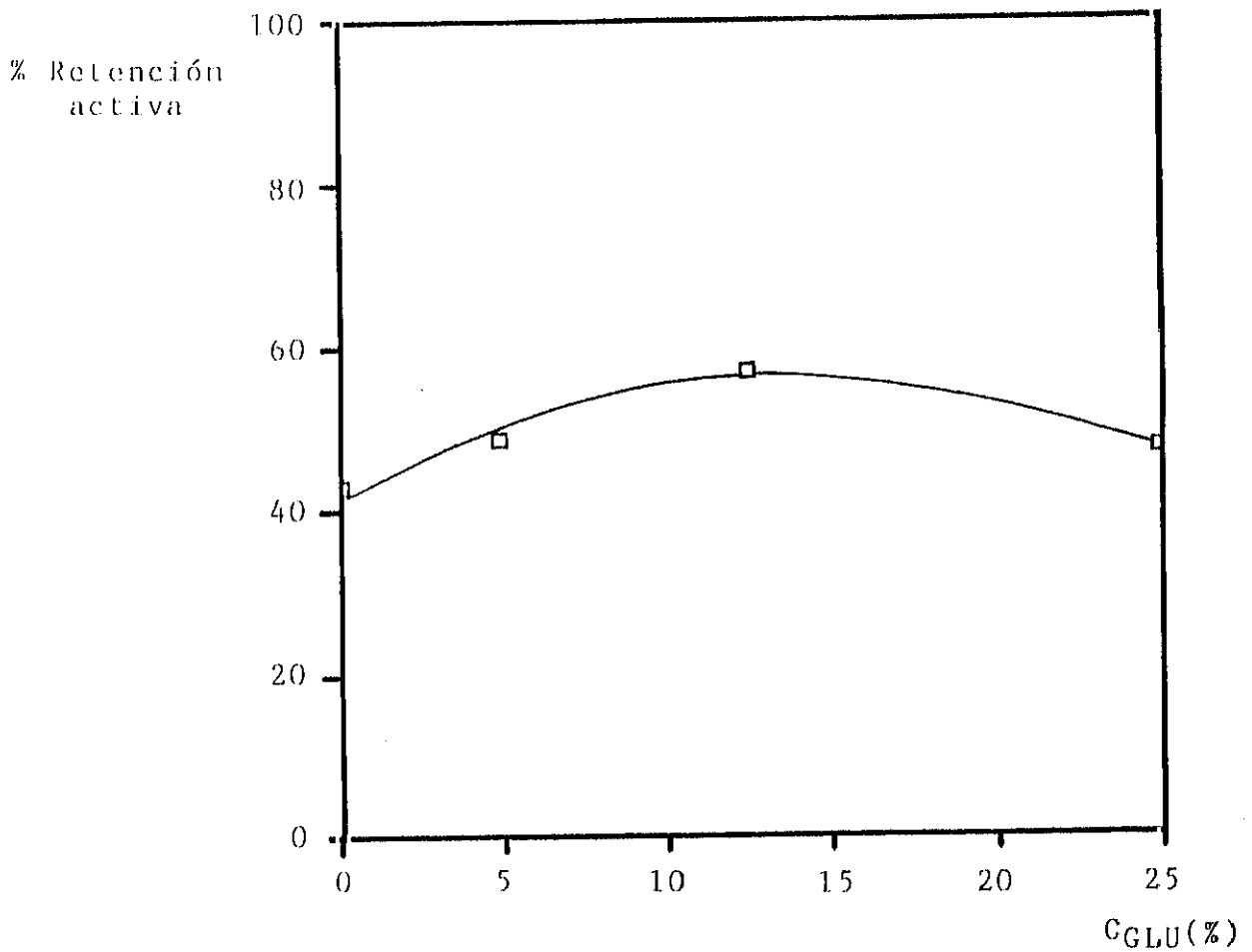
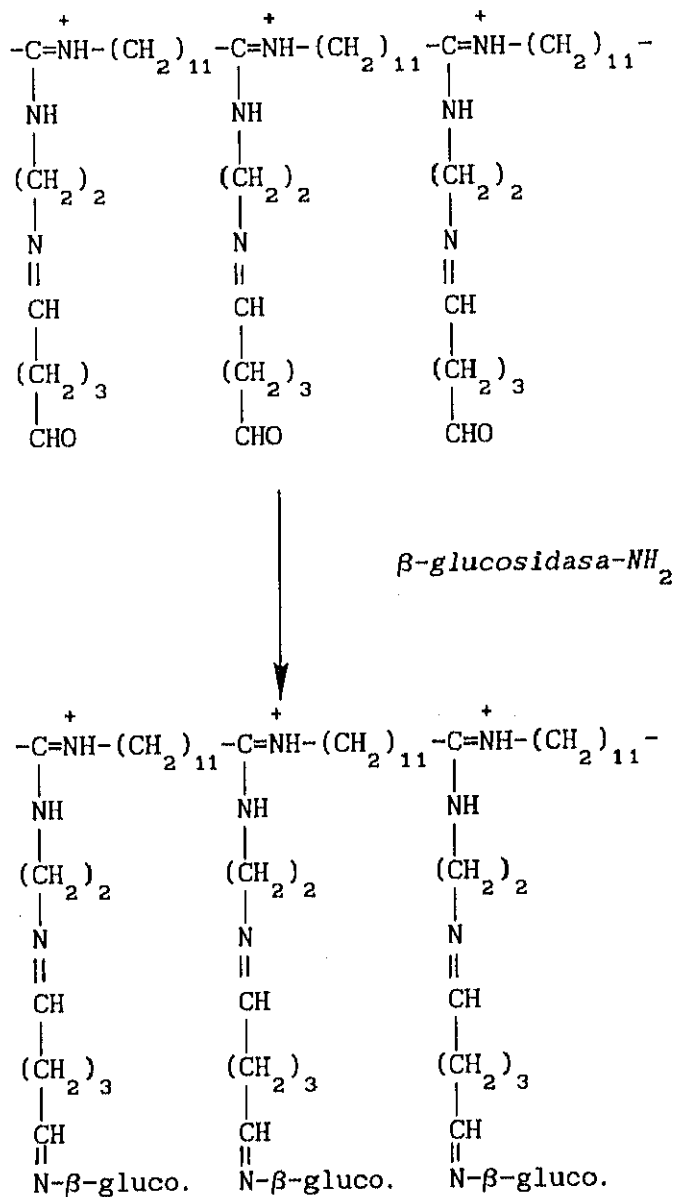


Figura 6.15. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Influencia de la concentración de glutaraldehído

6.2.1.3. Inmovilización propiamente dicha:

Al realizar la unión de la enzima al soporte activado es importante evitar que esta unión se lleve a cabo a través de alguno de los grupos funcionales que constituyen su centro activo ya que, en ese caso, su actividad se vería reducida pudiendo, incluso, desaparecer totalmente.

En el caso del nylon activado, la unión entre la enzima y el soporte se lleva a cabo a través de los grupos amino de la enzima y del grupo aldehído, $-COH$, introducido con el glutaraldehído, según el esquema:



Las variables estudiadas en esta etapa fueron:

- Temperatura de inmovilización, T_I
- Tiempo de inmovilización, t_I
- Actividad enzimática de la disolución inicial empleada en la inmovilización, A_0

a) Temperatura de inmovilización:

Debido al importante efecto que la temperatura tiene sobre la actividad enzimática, se consideró de interés estudiar el efecto que la temperatura de inmovilización producía sobre la retención activa. Para ello se llevaron a cabo cuatro experimentos variando la temperatura de inmovilización, cuyos resultados, que se resumen en la tabla 5.13, se representan en la figura 6.16.

En ella se observa que la retención activa aumenta a medida que lo hace la temperatura de inmovilización hasta alcanzar un valor máximo entre 25 y 35 °C, cayendo bruscamente para temperaturas superiores. Este comportamiento se puede explicar si se tiene en cuenta que a la temperatura más baja (4°C) la reacción de formación del enlace enzima-glutaraldehído es muy lenta, aumentando su velocidad a medida que aumenta la temperatura, pero al mismo tiempo, aparece un segundo efecto, la desnaturalización térmica de la enzima que va quedando en disolución, poco importante a bajas temperaturas, pero que aumenta mucho más rápidamente que la velocidad de formación del enlace covalente con la temperatura, de forma que a 45°C, la pérdida de actividad de la enzima tras permanecer 15 horas a esta temperatura, es suficientemente grande como para hacer caer bruscamente la retención activa.

A la vista de estos resultados se seleccionó la temperatura de 25 °C para llevar a cabo la inmovilización.

b) Tiempo de inmovilización:

En la figura 6.17 se representan los resultados obtenidos al estudiar la influencia del tiempo de inmovilización sobre la retención activa. Estos resultados se resumen en la tabla 5.14.

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{TT} : 15 min.- C_{EDA} : 100 %- t_{EDA} : 120 min.- C_{GLU} : 5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{GLU} : 15 min.

- T : ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : variable estudiada

- pH: 4.8

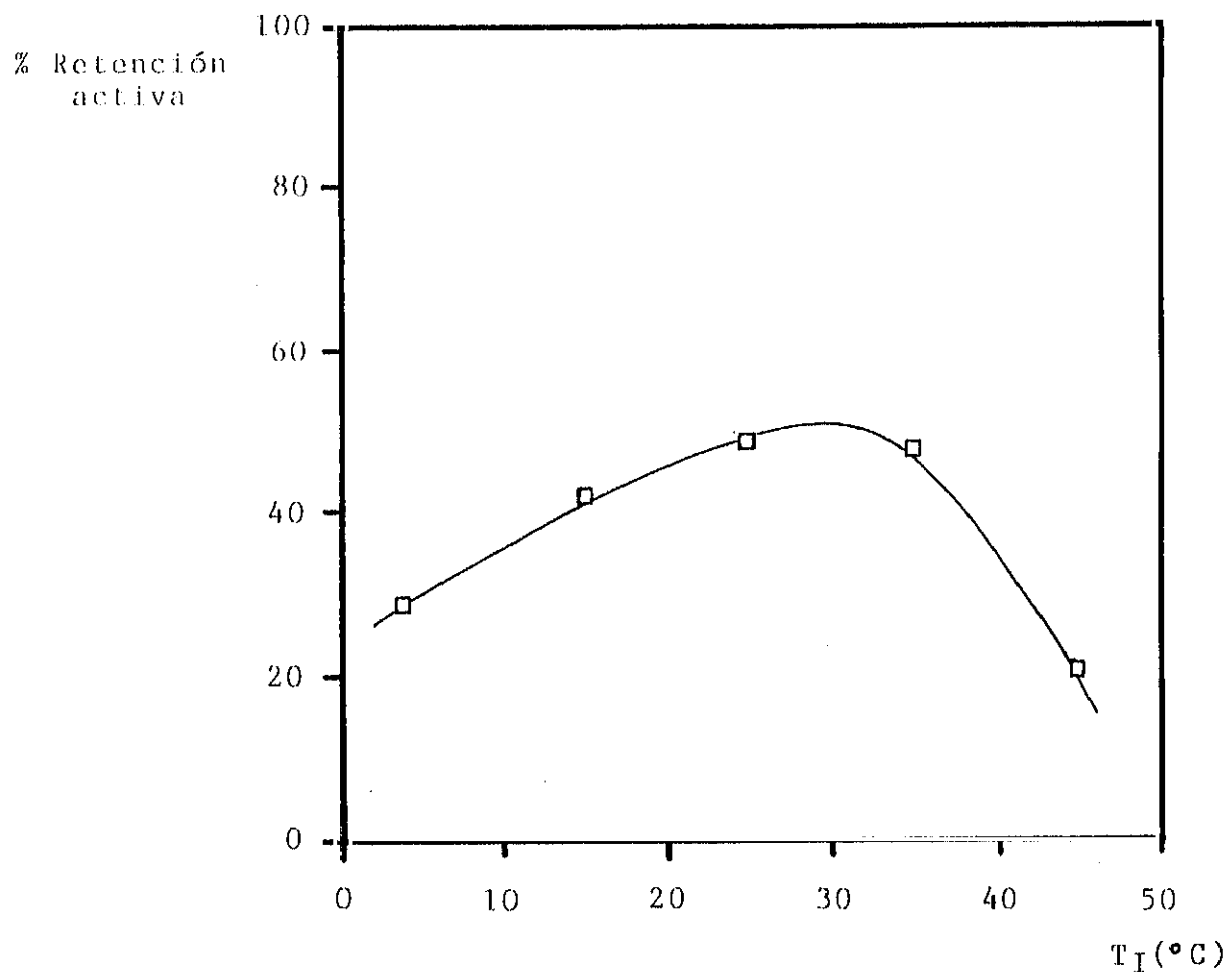
- A_0 : 0.626 UI/ml- C_S : 40 g/l- t_I : 15 horas

Figura 6.16. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Influencia de la temperatura de inmovilización

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{TT} : 15 min.- C_{EDA} : 100 %- t_{EDA} : 120 min.- C_{GLU} : 12.5 % v/v en agua- t_{GLU} : 15 min.- T : ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C

- pH: 4.8

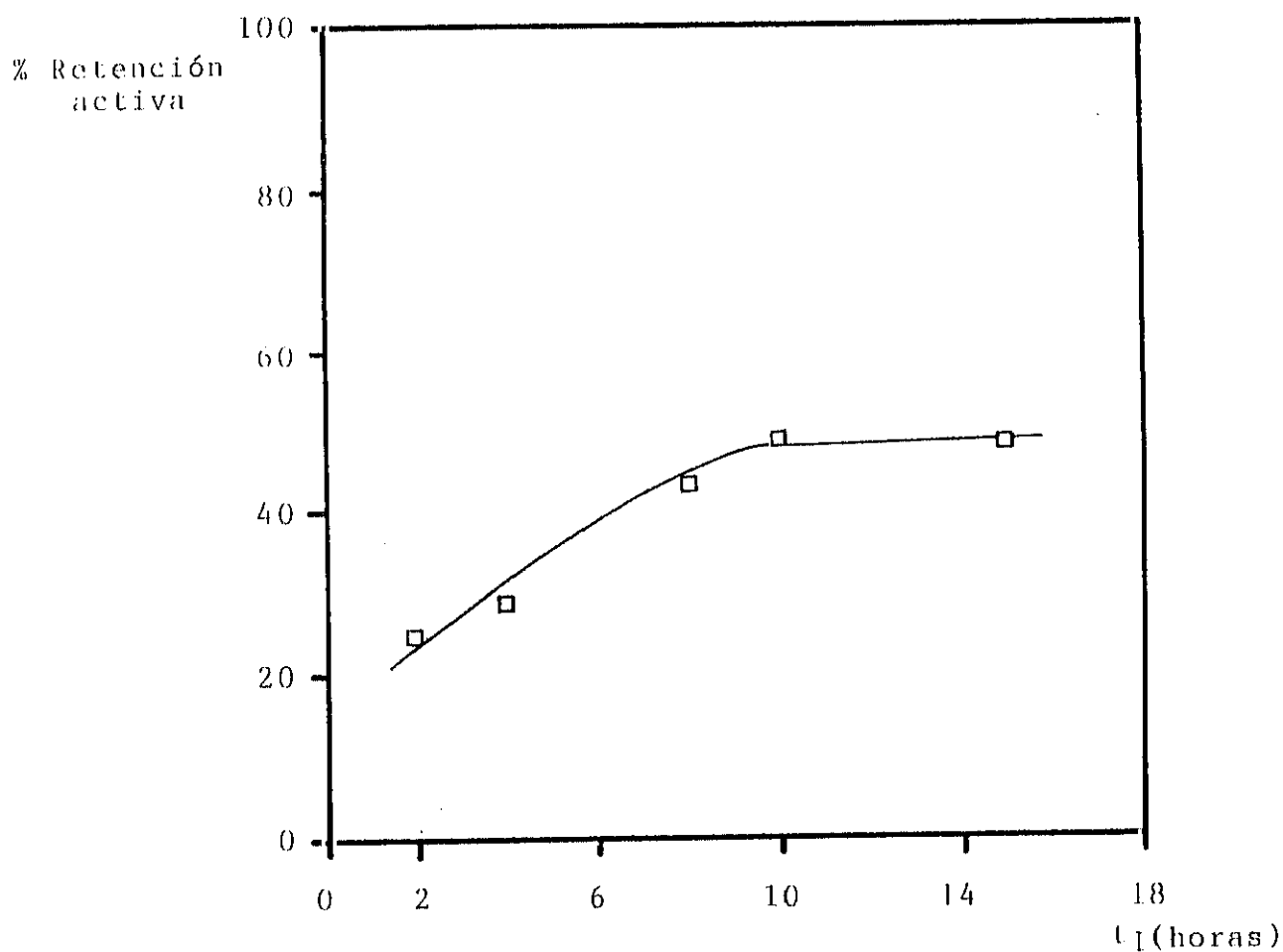
- A_0 : 1.125 UI/ml- C_S : 40 g/l- t_I : variable estudiada

Figura 6.17. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Influencia del tiempo de inmovilización

Se puede ver en la mencionada figura que la retención activa aumenta a medida que lo hace el tiempo de inmovilización hasta las 10 horas, obteniéndose a partir de este tiempo un valor constante de la retención activa. Este efecto puede deberse al agotamiento de cualquiera de los dos reaccionantes: soporte activado o enzima.

c) Actividad enzimática de la disolución inicial empleada en la inmovilización:

Con el fin de estudiar la influencia que la relación enzima/soporte tiene sobre la retención activa alcanzada, se llevaron a cabo experimentos variando la actividad enzimática de la disolución inicial empleada en la inmovilización. Los resultados obtenidos, que se resumen en la tabla 5.15, se representan en la figura 6.18 de la forma retención activa y la actividad enzimática inmovilizada frente a la actividad inicial de la disolución enzimática.

Se observa que la retención activa presenta un máximo, alcanzándose valores de retención activa próximos al 70% cuando se emplea una disolución inicial de actividad aproximada 1.1 UI/ml. Este máximo puede explicarse considerando que cuando se emplean concentraciones bajas de enzima, parte de los centros activos del soporte no reaccionan, por no existir suficiente enzima en el medio. Este hecho se ve reafirmado por la no existencia de actividad enzimática en las aguas de lavado, señal evidente de que toda la enzima presente en el medio se ha unido al soporte, si bien, parte de ella lo hace en forma inactiva.

Sin embargo, llega un momento en que la cantidad de enzima que puede unirse al soporte es igual al número de grupos activos capaces de formar un enlace que este posee. A partir de este momento, la cantidad de enzima que se une al soporte es siempre la misma, como se observa en la constancia de la actividad enzimática inmovilizada, disminuyendo lógicamente la retención activa según aumenta la cantidad de enzima en disolución.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al estudiar el tiempo de inmovilización, el efecto entonces observado puede explicarse en función de los resultados obtenidos en los últimos experimentos. Así, el valor asintótico alcanzado entonces (utilizando $A = 0.626$ UI/ml) no se debería a la saturación del soporte, sino a no existir en el medio suficiente canti-

CONDICIONES DE INMOVILIZACION:

- ACTIVACION DEL SOPORTE:

- C_{TT} : 12.5 % v/v en Cl_2CH_2 - t_{TT} : 15 min.- C_{EDA} : 100 %- t_{EDA} : 120 min.- C_{GLU} : 5 % v/v en agua- t_{GLU} : 15 min.

- T : ambiente en todos los pasos

- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA:

- T_I : 25 °C

- pH: 4.8

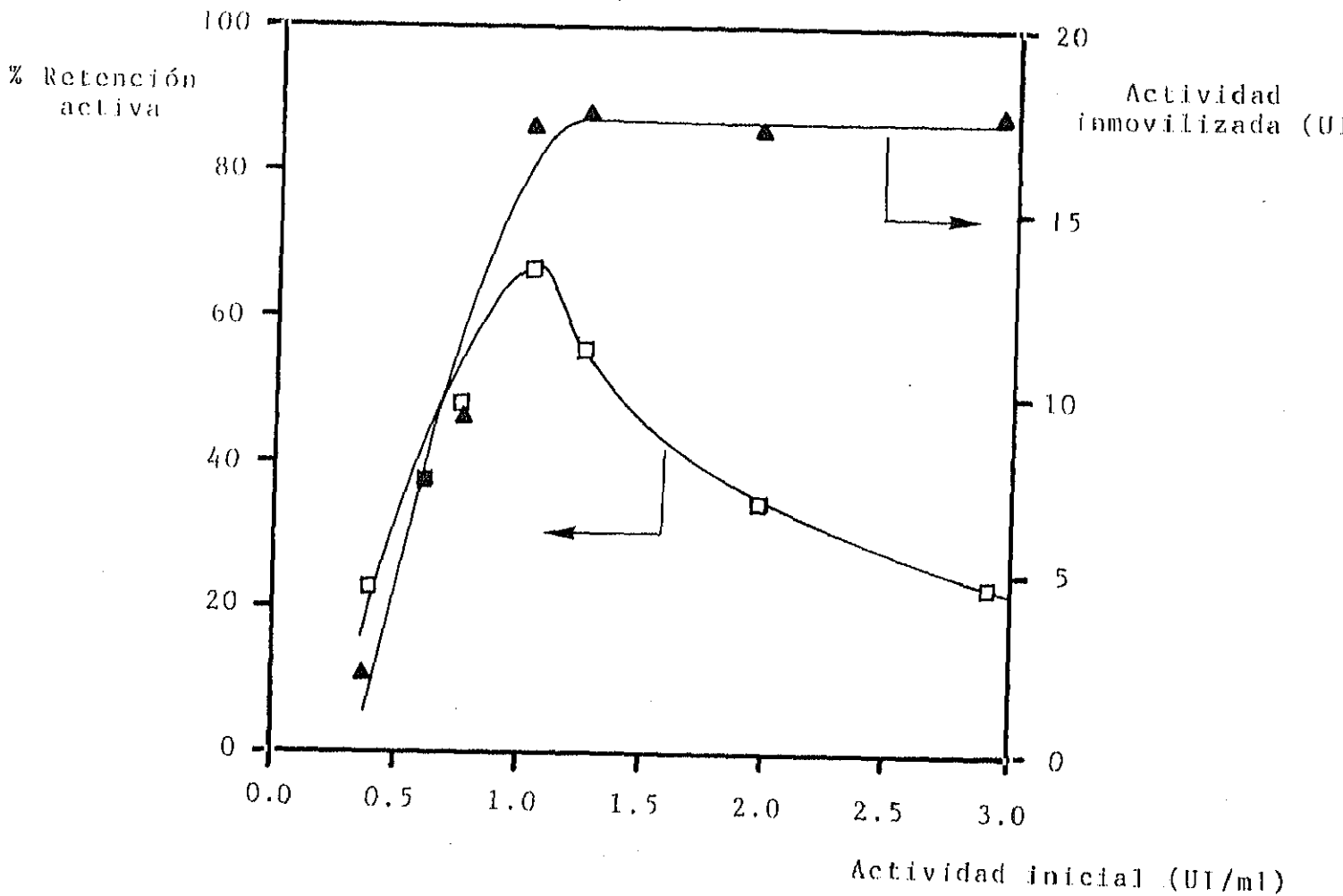
- A_0 : variable estudiada- C_S : 40 g/l- t_I : 15 horas

Figura 6.18. INMOVILIZACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* SOBRE NYLON EN POLVO: Influencia de la actividad inicial de la disolución

dad de enzima para unirse al mismo. La saturación se alcanzaría cuando la actividad enzimática inicial del medio fuera superior a 1.1 UI/ml.

A partir de estos resultados se seleccionó una actividad inicial de la disolución enzimática de aproximadamente 1.1 UI/ml y un tiempo de inmovilización de al menos 15 horas para asegurar la total saturación del soporte.

Por todo ello, del estudio tanto de las etapas de activación del soporte como de la inmovilización propiamente dicha del complejo celulasas se han seleccionado los siguientes valores para la inmovilización del complejo celulasas de *Penicillium funiculosum* sobre nylon en polvo, que se mantendrán constantes en el resto de la investigación. Finalmente, y una vez concluido el estudio de todas las variables que influyen en la activación del soporte seleccionado (nylon en polvo) y en la inmovilización del complejo celulasas de *Penicillium funiculosum* sobre dicho soporte, se fijaron como variables para la inmovilización utilizada en los restantes experimentos de desactivación e hidrólisis, las siguientes condiciones:

- ACTIVACION DEL SOPORTE

- O-alkilación:

- Temperatura, T_{TT} : ambiente (siempre $<30^{\circ}\text{C}$)
- Relación volumen agente activante/soporte: 5 ml/g
- Concentración de agente activante, C_{TT} : 12.5 % en v/v Cl_2CH_2
- Tiempo de activación, t_{TT} : 15 minutos

- Aminoactivación:

- Temperatura, T_{EDA} : ambiente
- Relación volumen agente activante/soporte: 10 ml/g
- Concentración de agente activante, C_{EDA} : 100 %
- Tiempo de activación, t_{EDA} : 120 minutos

- Activación con glutaraldehído:

- Temperatura, T_{GLU} : ambiente
- Relación volumen agente activante/soporte: 10 ml/g
- Concentración de agente activante, C_{GLU} : 12.5 % v/v en agua
- Tiempo de activación, t_{GLU} : 15 minutos

- INMOVILIZACION PROPIAMENTE DICHA:

- Temperatura, T_I : 25 °C
- Relación volumen disolución/soporte: 25 ml/g
- Actividad disolución inicial, A_0 : 1.1 UI/ml
- Tiempo de activación, t_I : 15 horas

6.3. ESTABILIDAD TERMICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum*

6.3.1. DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA LIBRE

En las figuras 6.19 a 6.23 se representan, los resultados de las tablas 5.16 a 5.23 correspondientes a la variación de la actividad β -glucosidasa del complejo celulasas de *P. funiculosum* con el tiempo a temperaturas comprendidas entre 30 y 70°C.

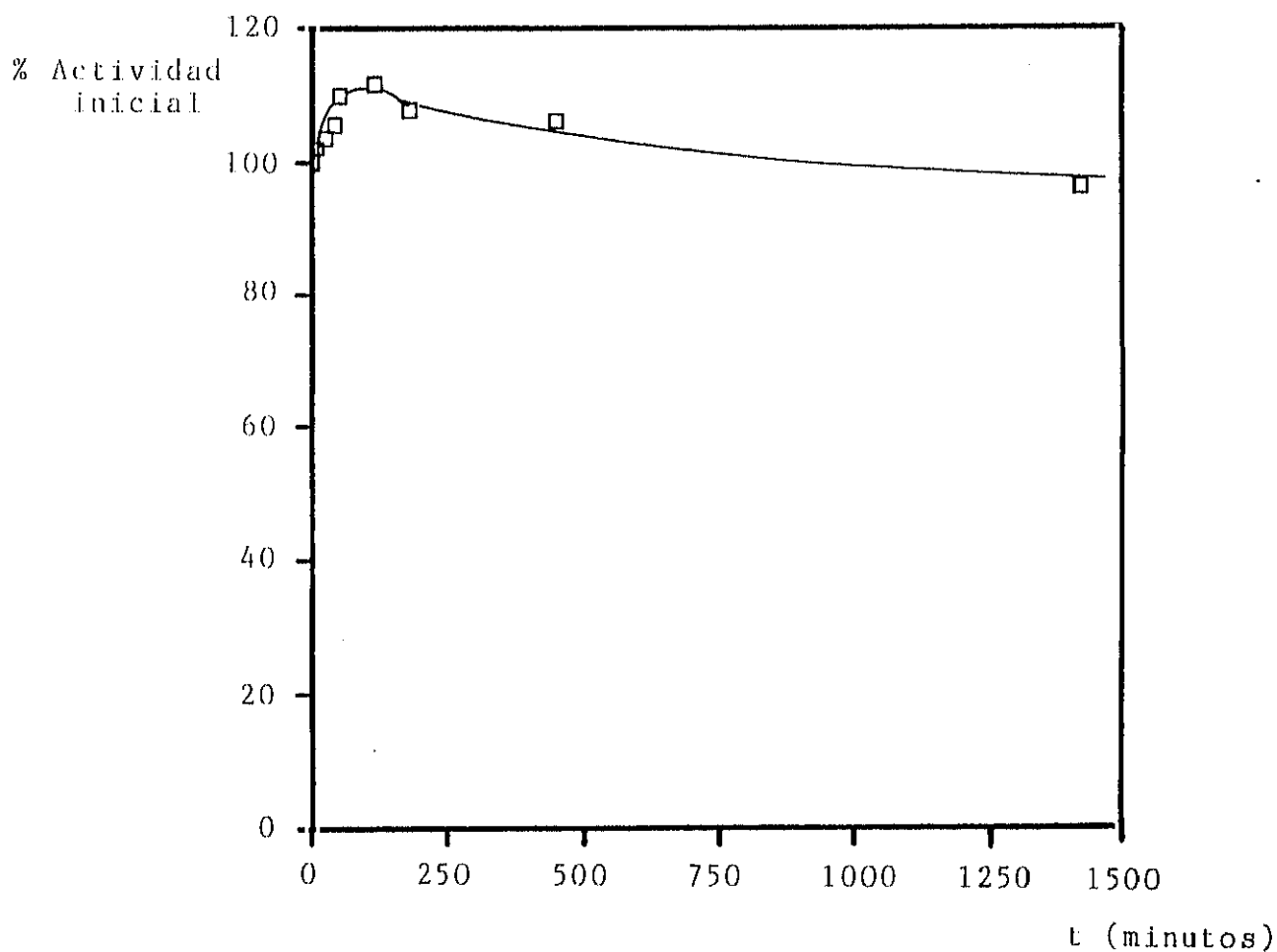
En todas ellas se observa que la desactivación térmica de la enzima libre aumenta, lógicamente, al hacerlo la temperatura. Sin embargo, para temperaturas inferiores a 55 °C (figuras 6.19 a 6.22) la actividad β -glucosidasa experimenta un ligero aumento inicial, tanto más acusado cuanto más baja es la temperatura. Asimismo, dicho máximo se produce a tiempos mayores al disminuir esta variable.

Este aumento inicial de la actividad podría explicarse suponiendo que la temperatura ejerce sobre la enzima dos efectos opuestos, por un lado, un aumento de la actividad debido, probablemente a una alteración estructural que conduzca a una estructura enzimática de mayor actividad que la original pero menos estable, y por otro lado, a la desnaturalización de la enzima por destrucción posterior de sus estructuras secundaria, terciaria y si la posee cuaternaria.

El hecho de que a medida que aumenta la temperatura, el máximo observado sea menor y aparezca a tiempos más cortos, así como el importante aumento en la velocidad de desactivación observado al aumentar la temperatura, hace suponer que la desactivación se ve más afectada por la temperatura que la activación, de forma que, a temperaturas por encima de 50°C el efecto de activación no puede ser observado (figura 6.23), no apareciendo ningún máximo en la actividad.

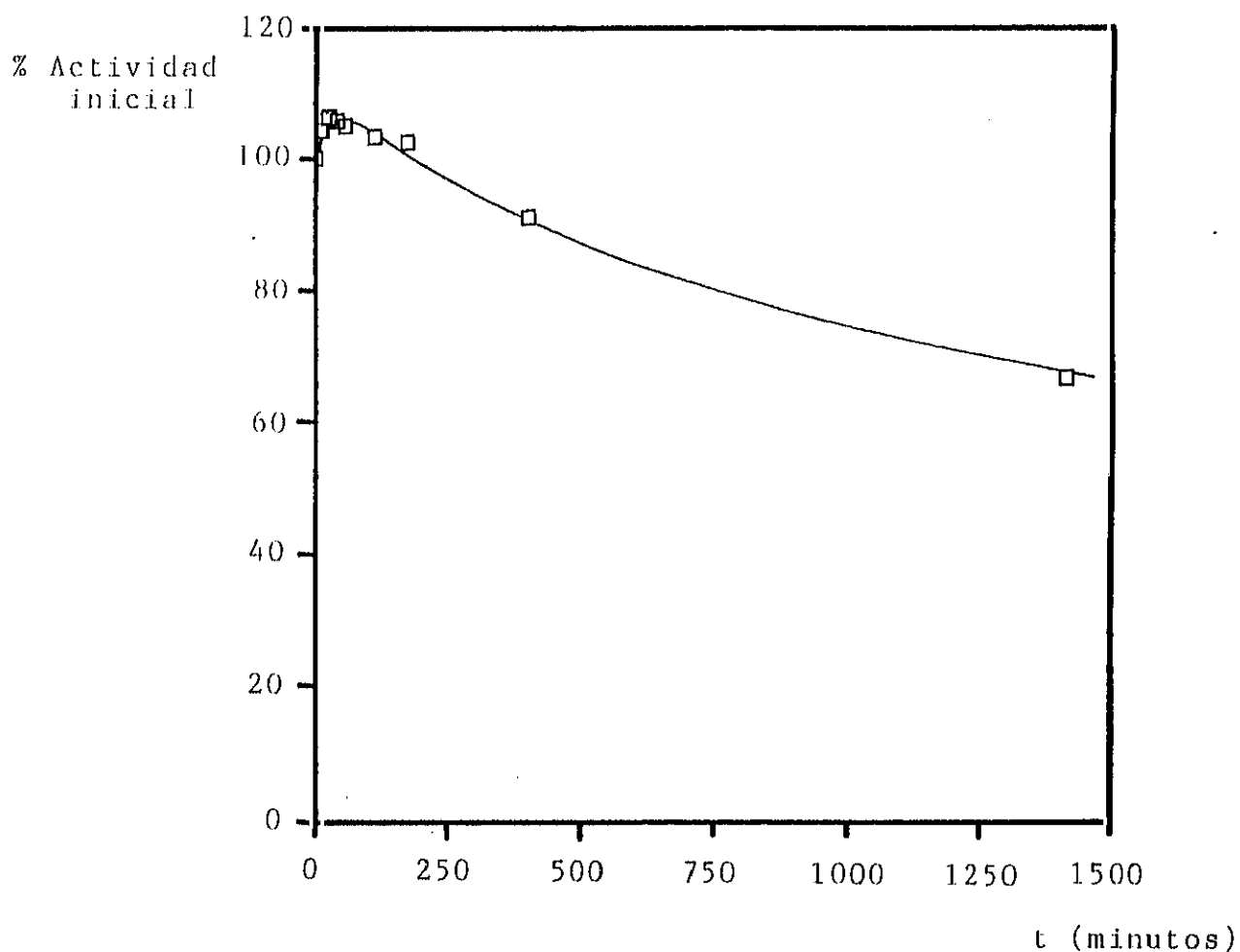
CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 30 °C
- A_0 : 1.04 UI/ml
- ACTIVIDAD ESPECIFICA, $a(t)$: 1.17 UI/mg de proteina

Figura 6.19. DESACTIVACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE

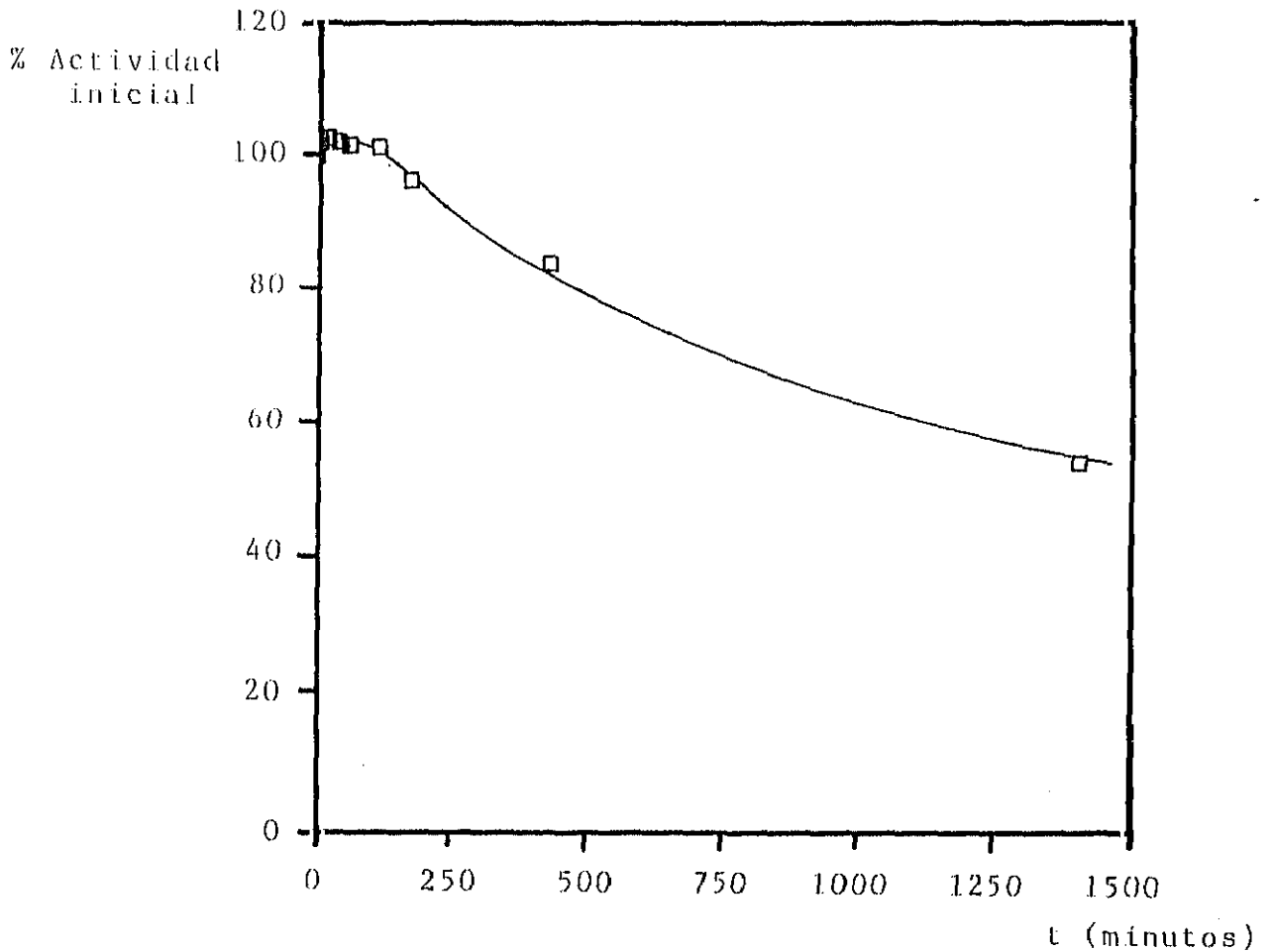
CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 40 °C
- A_0 : 1.04 UI/ml
- ACTIVIDAD ESPECIFICA, $a(t)$: 1.17 UI/mg de proteina

Figura 6.20. DESACTIVACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE

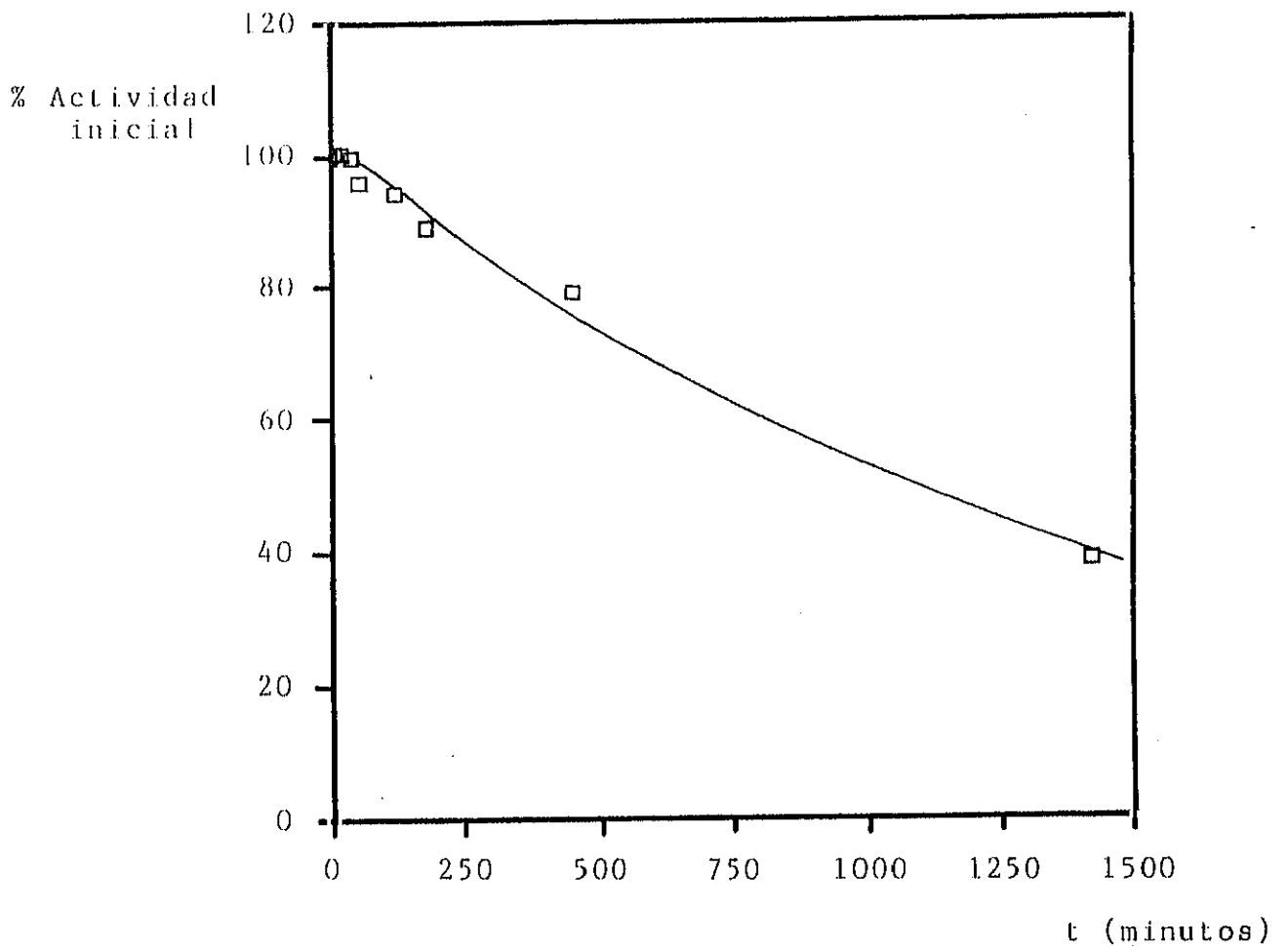
CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 45 °C
- A_0 : 1.04 UI/ml
- ACTIVIDAD ESPECIFICA, $a(t)$: 1.17 UI/mg de proteina

Figura 6.21. DESACTIVACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE

CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 50 °C
- A_0 : 1.04 UI/ml
- ACTIVIDAD ESPECIFICA, $a(t)$: 1.17 UI/mg de proteina

Figura 6.22. DESACTIVACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE

CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 55 ° 60 °, 65 ° y 70 °C
- A_0 : 1.04 UI/ml
- ACTIVIDAD ESPECIFICA, $a(t)$: 1.17 UI/mg de proteina

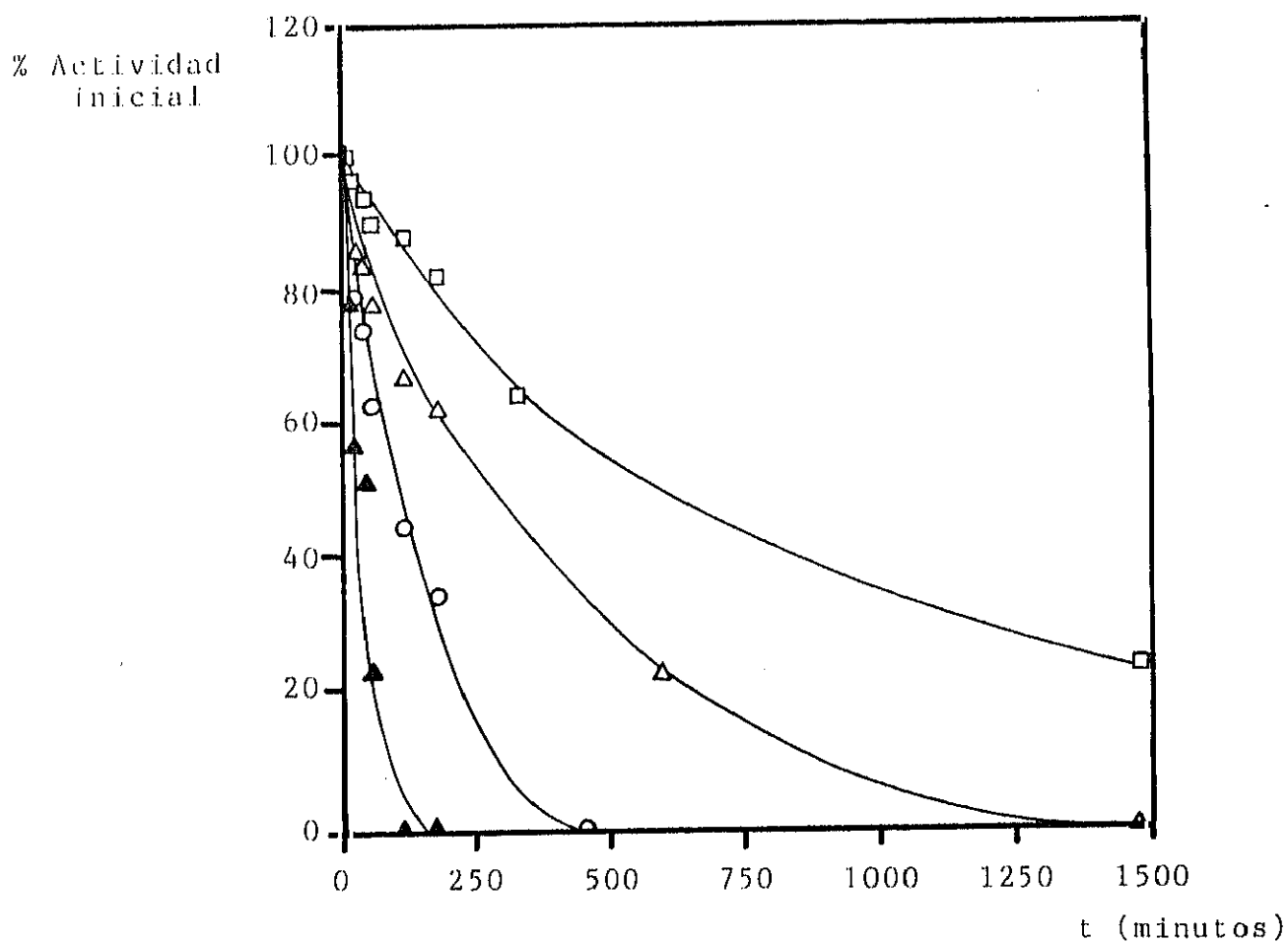
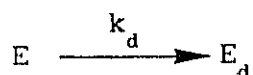


Figura 6.23. DESACTIVACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE:
□ 55 °C; △ 60 °C; ○ 65 °C; ▲ 70 °C

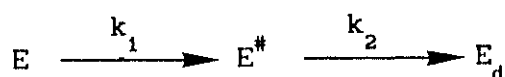
Es importante destacar también que a temperaturas superiores a 60°C la enzima pierde totalmente su actividad a tiempos relativamente cortos, de forma que a 60°C la enzima ha perdido toda su actividad al cabo de 24 horas, mientras que a 65°C sólo han de pasar 7 horas y a 70°C basta con 3 horas para que la enzima se encuentre totalmente desactivada (figura 6.23). Sin embargo, a temperaturas inferiores a 60°C, no se observa desaparición total, apreciándose además que a tiempos largos la actividad tiende a un valor asintótico, tanto mayor cuanto menor es la temperatura de trabajo.

6.3.1.1. Modelo cinético para la desactivación de la enzima libre

Como ya se ha indicado en el apartado 2.4 de la Introducción, la desactivación enzimática suele describirse mediante modelos sencillos de primer orden según el esquema de reacción:



Este tipo de mecanismo predice un decaimiento exponencial de la actividad con el tiempo. Sin embargo, para describir comportamientos más complejos, como el observado experimentalmente en la β -glucosidasa, es necesario recurrir a mecanismos con varias etapas de reacción, en las que se supone que la estructura inicial de la enzima, por acción del calor, se modifica dando una o varias estructuras intermedias en equilibrio, como paso previo a la desnaturalización. En este caso concreto, la enzima evoluciona a una estructura intermedia de actividad superior a la de la enzima original, lo que permite explicar el máximo observado en la actividad. El mecanismo de reacción tendría, en este caso, la siguiente forma:



donde E es la enzima original, $E^\#$ es el intermedio activado y E_d la enzima totalmente inactiva.

Este modelo (Gianfreda, 1984) requiere cuatro parámetros, la actividad específica de las especies E y $E^\#$ y las constantes cinéticas de los dos pasos de desactivación, k_1 y k_2 . Este modelo es semejante al denominado modelo de isoenzima (Fischer, 1980) que supone una desactivación en dos

pasos, pero a diferencia de este admite que las formas enzimáticas E y E[#] posean diferente actividad específica, mientras que el modelo de isoenzima sólo supone modificaciones estructurales pero sin alteración de la actividad específica de la enzima, con lo que E y E[#] poseerían igual actividad.

Este modelo se apoya en los trabajos realizados por Tauford (1968) que demostraron la existencia de varias formas intermedias mediante métodos espectrofotométricos y de fluorescencia. Sin embargo, en algunos casos el primer paso es muy rápido (segundos o incluso menos) lo que unido a que los cambios en la propiedad observada son muy pequeños, permite despreciarlo.

Suponiendo que los dos pasos de desactivación obedecen a una cinética de primer orden, la velocidad de formación de las especies E y E[#] vendrían determinadas por:

$$\frac{dE}{dt} = -k_1[E] \quad [6.1]$$

$$\frac{dE^\#}{dt} = k_1[E] - k_2[E^\#] \quad [6.2]$$

Estas dos ecuaciones diferenciales integradas junto con la condición límite:

$$t = 0; \quad E = E_0; \quad E^\# = 0$$

conducen a la expresión de las concentraciones de las especies E y E[#] en función del tiempo:

$$[E] = E_0 \exp(-k_1 t) \quad [6.3]$$

$$[E^\#] = \frac{E_0}{k_1 - k_2} \{ \exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t) \} \quad [6.4]$$

Definiendo las actividades específicas de las especies E y E[#] como a₁ y a₂, respectivamente, la actividad específica total de la mezcla variará con el tiempo según la ecuación:

$$a(t) = a_1 \frac{[E]}{E_0} + a_2 \frac{[E^\#]}{E_0} = \left\{ a_1 - \frac{a_2 k_1}{k_1 - k_2} \right\} \exp(-k_1 t) + \frac{a_2 k_1}{k_1 - k_2} \exp(-k_2 t) \quad [6.5]$$

Conocido el valor de $a_1 = 1.17$ UI/mg de proteína, actividad específica de la disolución enzimática original, que se mantuvo constante en todos los experimentos y ajustando los resultados obtenidos en los experimentos de desactivación a temperaturas entre 30 y 70°C con β -glucosidasa libre, mediante un método de regresión no lineal basado en el algoritmo de Marquardt (1963), se obtuvieron los valores de la actividad específica a_2 y de las constantes de reacción k_1 y k_2 que se presentan en la tabla 6.1.

En dicha tabla se puede observar que la actividad específica a_2 de la especie intermedia disminuye a medida que aumenta la temperatura pasando de ser mayor que la de la enzima original a temperaturas inferiores a 55°C a ser menor para temperaturas mayores a la mencionada. Esto es fácil de explicar considerando que al aumentar la temperatura de desactivación las estructuras intermedias $E^\#$ se encuentran cada vez más degradadas y son por tanto menos activas.

Asimismo, es posible ajustar los datos obtenidos para a_2 a una ecuación del tipo Arrhenius con energía de activación negativa, tal como se observa en la figura 6.24. Los valores de la energía de activación y la constante preexponencial se presentan en la tabla 6.2.

Por lo que se refiere a los valores de las constantes de velocidad de reacción, se observa que k_1 aumenta mucho más rápidamente con la temperatura que k_2 . Esto indica que la velocidad de formación del complejo intermedio sería prácticamente instantánea a temperaturas altas por lo que sólo se observa el efecto de la segunda reacción. Como cabía esperar, la variación de estas dos constantes con la temperatura puede ajustarse a una ecuación del tipo Arrhenius (figura 6.24) con los valores de la energía de activación y del factor preexponencial que se presentan en la tabla 6.2.

En la figura 6.25 se presentan los valores de la actividad específica obtenidos mediante el modelo descrito anteriormente frente a los obtenidos experimentalmente para las diferentes temperaturas estudiadas. Se observa que en todos los casos el error es inferior al 10%.

CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 30 °, 40 °, 45 °, 50 °, 55 °, 60 °, 65 ° y 70 °C
- A_0 : 1.04 UI/ml
- ACTIVIDAD ESPECIFICA, $a(t)$: 1.17 UI/mg de proteína

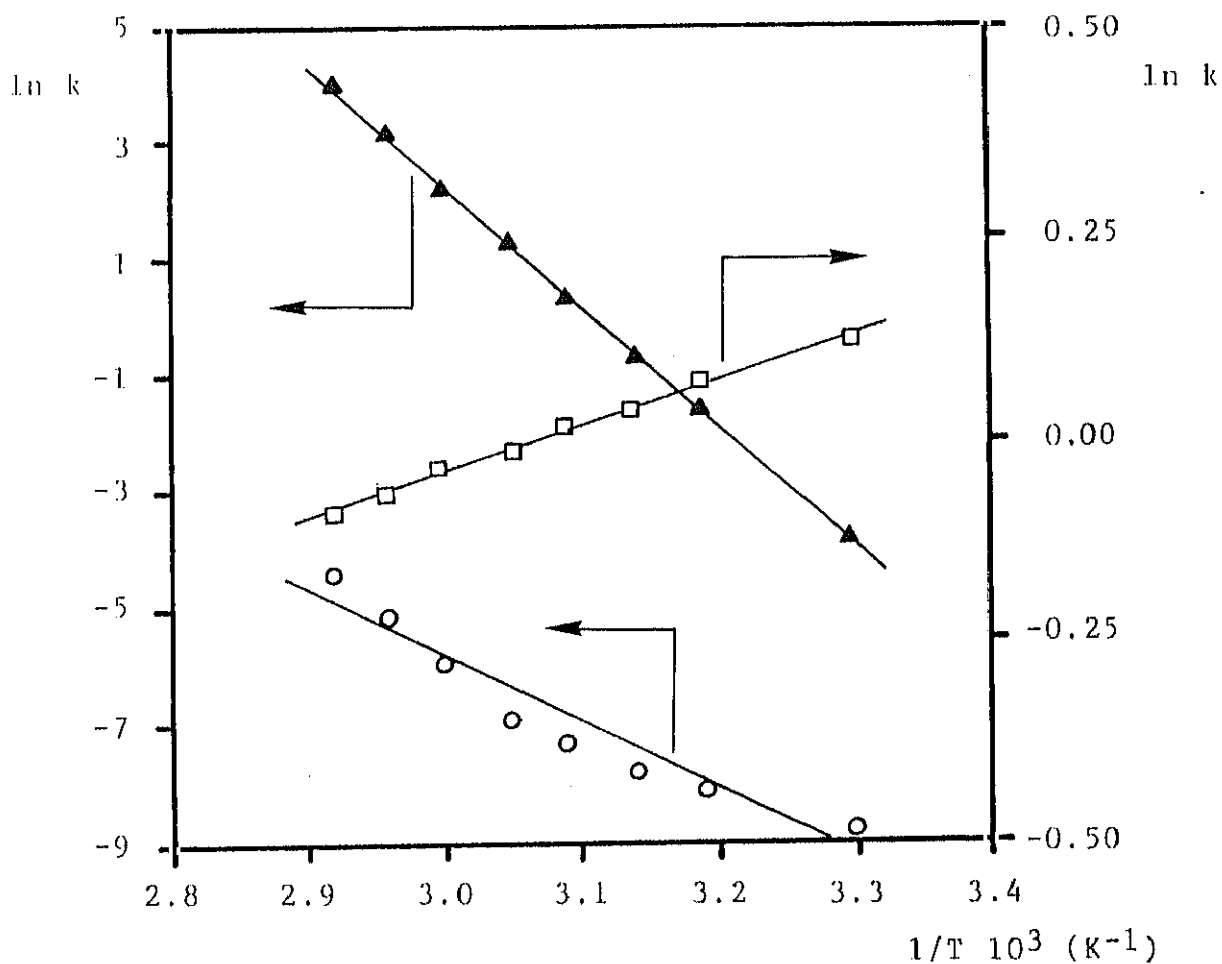


Figura 6.24. DESACTIVACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE:
Ajuste de las constantes de desactivación a la ecuación de Arrhenius: \square a_2 ; \blacktriangle k_1 ; \circ k_2

CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 30 °, 40 °, 45 °, 50 °, 55 ° 60 °, 65 ° y 70 °C
- A_0 : 1.04 UI/ml
- ACTIVIDAD ESPECIFICA, $a(t)$: 1.17 UI/mg de proteína

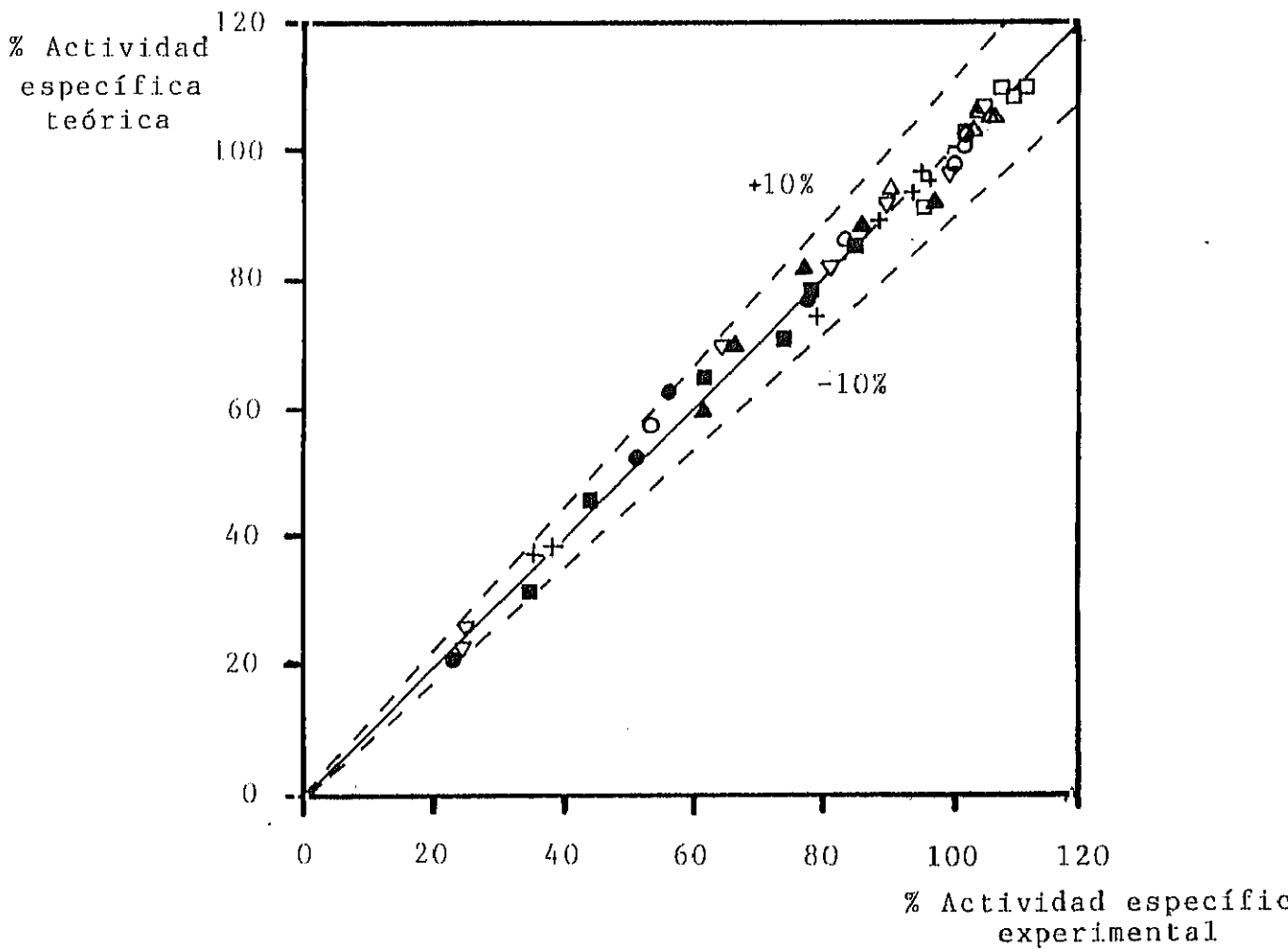


Figura 6.25. DESACTIVACION DE β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE

Comparación entre los resultados experimentales y los predichos con el modelo de desactivación:

- 30 °C; △ 40 °C; ○ 45 °C; + 50 °C; ▲ 55 °C
- 60 °C; ● 65 °C; ▽ 70 °C

TABLA 6.1
VALORES DE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS a_1 Y a_2 Y
DE LAS CONSTANTES DE REACCION k_1 Y k_2

Temperatura	a_1	a_2	k_1	k_2
30	1.17	1.31	0.021	$0.149 \cdot 10^{-3}$
40	1.17	1.25	0.200	$0.304 \cdot 10^{-3}$
45	1.17	1.20	0.507	$0.407 \cdot 10^{-3}$
50	1.17	1.18	1.386	$0.668 \cdot 10^{-3}$
55	1.17	1.15	3.600	$0.988 \cdot 10^{-3}$
60	1.17	1.12	9.340	$2.010 \cdot 10^{-3}$
65	1.17	1.08	23.280	$6.000 \cdot 10^{-3}$
70	1.17	1.07	56.500	$12.300 \cdot 10^{-3}$
°C	UI/mg pr	UI/mg pr.	min ⁻¹	min ⁻¹

TABLA 6.2
VALORES DE LA ENERGIA DE ACTIVACION Y DE LA CONSTANTE PREEXPONENCIAL
PARA a_2 Y PARA LAS CONSTANTES DE REACCION k_1 Y k_2

	E_a	k_0
a_2	-1080.23	0.2186
k_1	41001.75	$7.59 \cdot 10^{27}$
k_2	23200.87	$4.69 \cdot 10^{12}$
	cal/mol	min ⁻¹

6.3.2. DESACTIVACION TERMICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POVO

Como ya se ha comentado en el apartado 2.5.4. de la Introducción, la inmovilización de una enzima sobre un soporte determinado puede influir sobre su estabilidad térmica. Aunque el efecto observado depende de numerosos factores como el soporte empleado, el método de inmovilización utilizado, el origen de la enzima, etc, en general se aprecia un aumento de la estabilidad térmica tras la inmovilización.

Por esta razón se llevó a cabo un estudio, semejante al realizado para la enzima libre, sobre la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada sobre nylon en polvo utilizando las condiciones previamente seleccionadas. Los resultados obtenidos para las diferentes temperaturas ensayadas, comprendidas entre 30 y 70°C, se resumen en las tablas 5.24 a 5.28 y se representan en la figura 6.26.

En ella se observa que, a diferencia de los resultados obtenidos al estudiar la desnaturalización de la enzima libre, la actividad permanece prácticamente constante a lo largo del tiempo e igual a la inicial para las temperaturas más bajas de 30 y 40 °C. La no existencia del máximo de actividad y de la caída de la misma con el tiempo que se observaba para la enzima libre, indican que esta no ha modificado su estructura por efecto de la temperatura, debido, probablemente a que al estar unida al soporte por un enlace fuerte, como el enlace covalente, su movilidad se ve restringida lo que favorece un aumento de su estabilidad térmica por no existir deformación de sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria.

Sin embargo, para temperaturas superiores a 40°C se observa una pérdida de actividad con el tiempo, muy ligera para 50 °C y mayor a medida que aumenta la temperatura, de forma que al cabo de 25 horas, la enzima inmovilizada conserva el 97.6 % de su actividad a 50 °C, el 72% a 60 °C y el 50.6 % a 70 °C. Si se comparan estos resultados con los obtenidos para la enzima libre (figuras 6.22 y 6.23), en todos los casos la inmovilización representa un importante aumento de la estabilidad térmica (figura 6.27).

Hay que destacar también que en el caso de la enzima inmovilizada, la pérdida de actividad se produce, únicamente, durante las primeras horas de incubación. Este efecto no se observaba en el caso de la enzima libre en

CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 30°, 40°, 50°, 60° y 70 °C
- C_s : 40 g/l
- A_0 : 17.51 UI/g

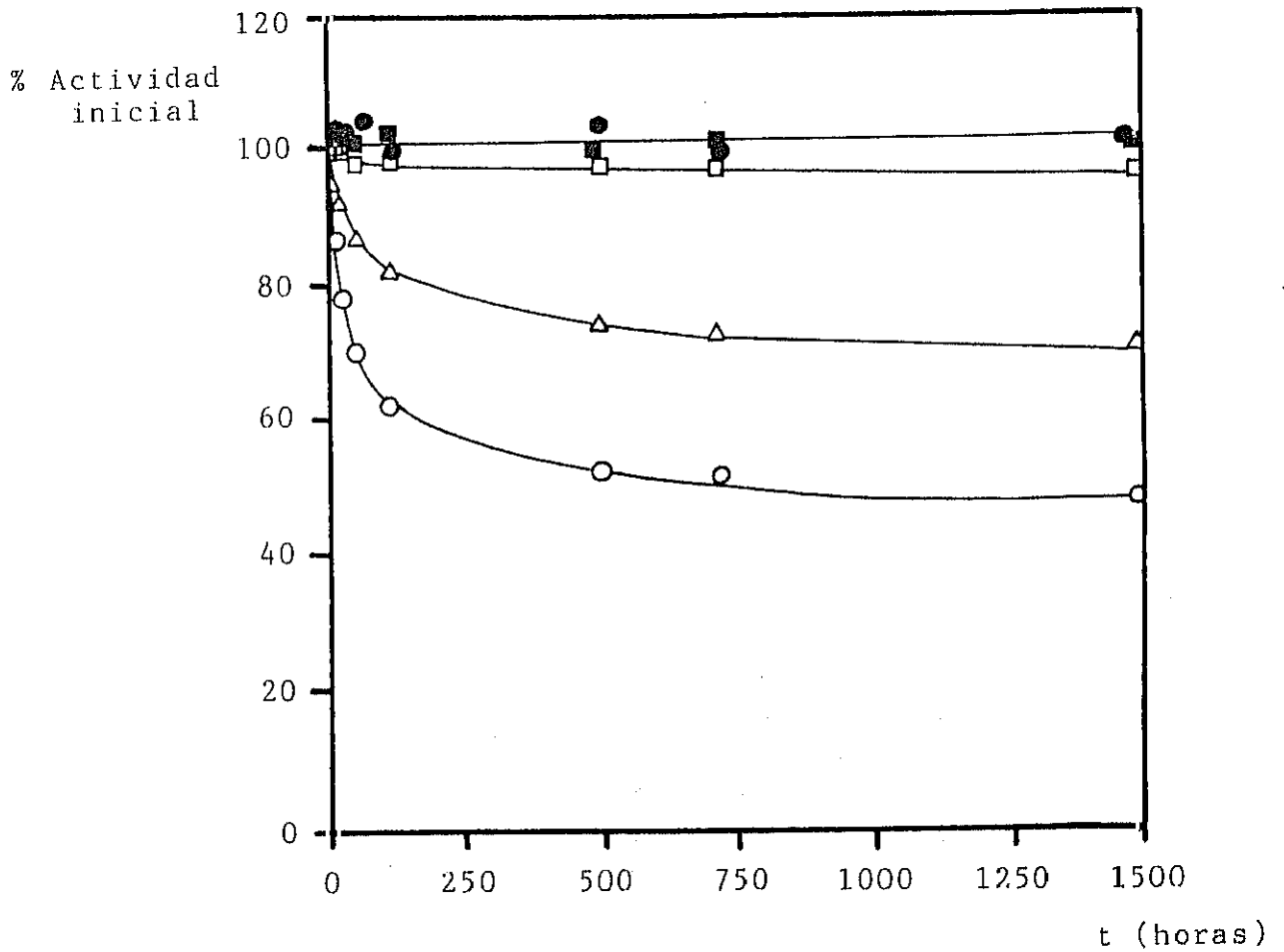


Figura 6.26. DESACTIVACION DE LA β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: ● 30 °C; ■ 40 °C; □ 50 °C; △ 60 °C; ○ 70 °C

CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 30°, 40°, 50°, 60° y 70 °C
- C_s : 40 g/l
- A_0 : 17.51 UI/g

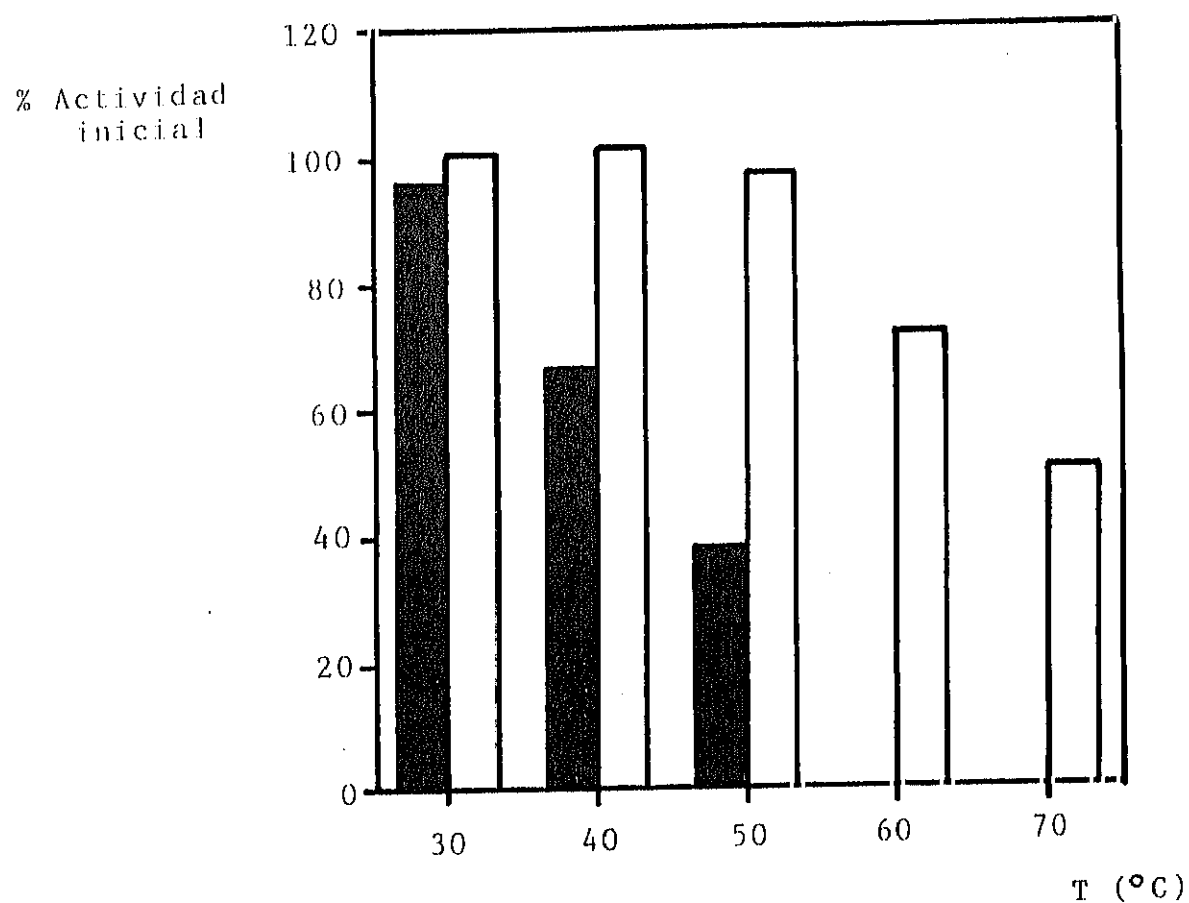


Figura 6.27. COMPARACION DE LA DESACTIVACION TRAS 40 HORAS DE INCUBACION:
■ β -glucosidasa libre □ β -glucosidasa inmovilizada

la que la pérdida de actividad era continua con el tiempo hasta llegar a la desnaturalización total. Por tanto, es difícil atribuir la pérdida de actividad en el caso de la enzima inmovilizada a modificaciones estructurales, poco probables por otra parte como ya se ha comentado, al estar unida la enzima a un soporte que dificulta su movilidad. Esta pérdida de actividad podría explicarse entonces suponiendo que es debida a pérdida de parte de la enzima inmovilizada que pasa al medio en el que debido a la temperatura a la que se encuentra y siguiendo ya una cinética semejante a la de la enzima libre, se desactiva rápidamente. La mayor pérdida de actividad observada para la enzima inmovilizada al aumentar la temperatura implicaría un debilitamiento del enlace enzima-soporte originado por la temperatura.

6.3.2.1. Modelo cinético para la desactivación de la enzima inmovilizada:

Aunque en general la desactivación de las enzimas inmovilizadas suele describirse mediante los mismos mecanismos que se utilizan para las enzimas libres, de los datos comentados en el apartado anterior se deduce que en el caso de la enzima estudiada en este trabajo, las suposiciones hechas para la enzima libre no pueden ser mantenidas para la enzima inmovilizada pues no parece que exista alteración en la estructura protéica sino pérdida de la enzima al medio. Sin embargo, la necesidad de disponer de una ecuación que permita conocer la variación de la actividad enzimática a lo largo del tiempo con el fin de introducirla en la ecuación de velocidad que describa el proceso de hidrólisis, nos llevó a plantear una ecuación empírica capaz de describir los resultados obtenidos experimentalmente. Así se planteó una ecuación de tipo hiperbólico de la forma:

$$a(t) = 1 - \frac{B t}{C + t} \quad [6.6]$$

Esta ecuación sólo se empleó para ajustar los datos de actividad obtenidos a 50, 60 y 70 °C ya que se consideró que a 30 y 40 °C se podía tomar un valor medio de la actividad sin cometer un error apreciable.

Ajustando los resultados experimentales a la ecuación empírica propuesta, se obtuvieron los valores de las constantes B y C a las diferentes temperaturas ensayadas que se detallan en la tabla 6.3.

TABLA 6.3
VALORES DE LAS CONSTANTES B Y C DE LA ECUACION 6.6
PARA LAS DIFERENTES TEMPERATURAS

Temperatura	B	C
50	0.0287	99.77
60	0.2948	83.02
70	0.5065	42.30

En la figura 6.28 se comparan los resultados experimentales con los predichos por la ecuación [6.6] observándose que en todos los casos el error es inferior al 5 %.

6.4. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum*

6.4.1. HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA LIBRE

La función de la β -glucosidasa dentro del complejo celulasas es, como ya se puso de manifiesto en el apartado 2.2.2. de la Introducción, hidrolizar las moléculas de celobiosa por ruptura del enlace β -1,4-glicosídico, originando dos moléculas de glucosa.

Esta reacción de hidrólisis de celobiosa, como cualquier otra reacción química, puede verse influida por las condiciones del medio (temperatura, pH), por la concentración de sustrato y producto y por las características propias de la enzima (concentración, desactivación térmica, inhibición, etc.). Con el fin de estudiar la influencia que todas estas variables tenían sobre la velocidad de hidrólisis de la celobiosa con β -glucosidasa de *P. funiculosum*, se llevaron a cabo experimentos en los que se estudió la influencia de las siguientes variables:

- Temperatura
- Concentración inicial de celobiosa
- Concentración inicial de glucosa
- Actividad inicial de la disolución enzimática
- pH

CONDICIONES DE OPERACION:

- pH: 4.8
- TEMPERATURA: 50 °, 60 ° y 70 °C
- C_S : 40 g/l
- A_0 : 17.51 UI/g

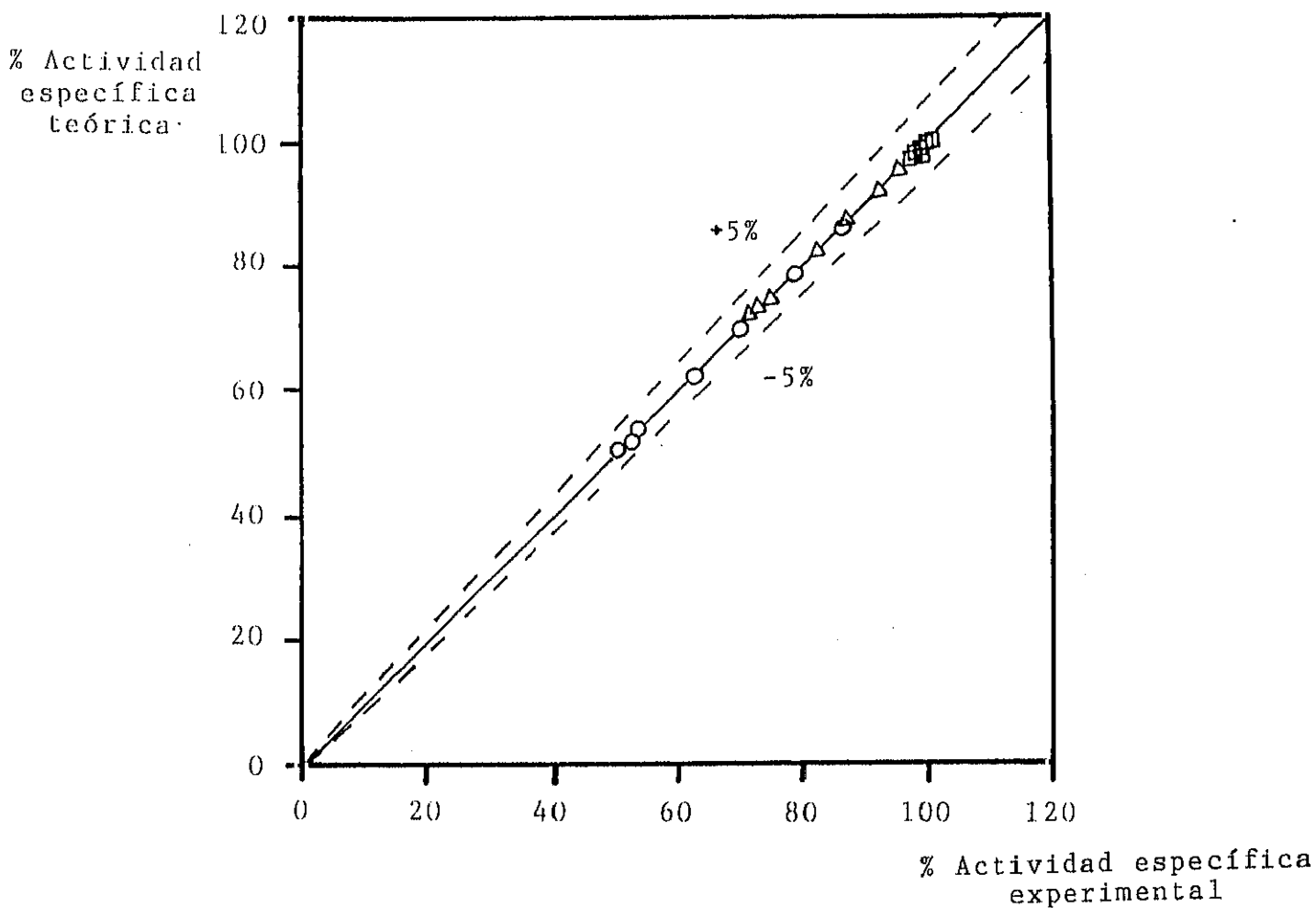


Figura 6.28. DESACTIVACION DE LA β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo de desactivación: \square 50 °C; Δ 60 °C; \circ 70 °C

1) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

En la figura 6.29 se representan las concentraciones de celobiosa frente al tiempo de hidrólisis correspondientes a los experimentos llevados a cabo a temperaturas entre 30 y 70 °C. Los resultados de dichos experimentos se resumen en las tablas 5.29 a 5.33.

En dicha figura se observa que a medida que aumenta la temperatura, y siempre que esta no supere los 60°C, aumenta la velocidad a la que desaparece el sustrato, o lo que es lo mismo, aumenta la velocidad de reacción. Sin embargo, cuando la reacción se realiza a 70 °C y a tiempos superiores a 3 horas, la conversión prácticamente se detiene manteniéndose constante la concentración de celobiosa en el medio a partir de ese momento.

Esta influencia se puede explicar teniendo en cuenta que durante el proceso de hidrólisis aparecen dos efectos contrapuestos dependientes de la temperatura:

- Un efecto de aumento de la velocidad de reacción al aumentar la temperatura, común a todas las reacciones químicas.
- Un efecto de disminución de la actividad de la enzima y por tanto de la velocidad de reacción por la desnaturalización térmica. Esta desactivación térmica cobra mayor importancia a partir de 60 °C, tal como se vio en el apartado 6.3.1. en el que se estudió la estabilidad térmica de la β -glucosidasa libre.

El hecho de que la desnaturalización térmica de la enzima se vea más favorecido por la temperatura que la hidrólisis de celobiosa, se debe a los diferentes valores de las energías de activación: entre 4 y 20 kcal/mol para reacciones enzimáticas y entre 40 y 130 kcal/mol para la desnaturalización térmica de proteínas.

A partir de estos resultados se seleccionó el valor de 60 °C como temperatura para llevar a cabo el estudio de las restantes variables de la hidrólisis.

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: variable estudiada
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : 1.16 UI/ml

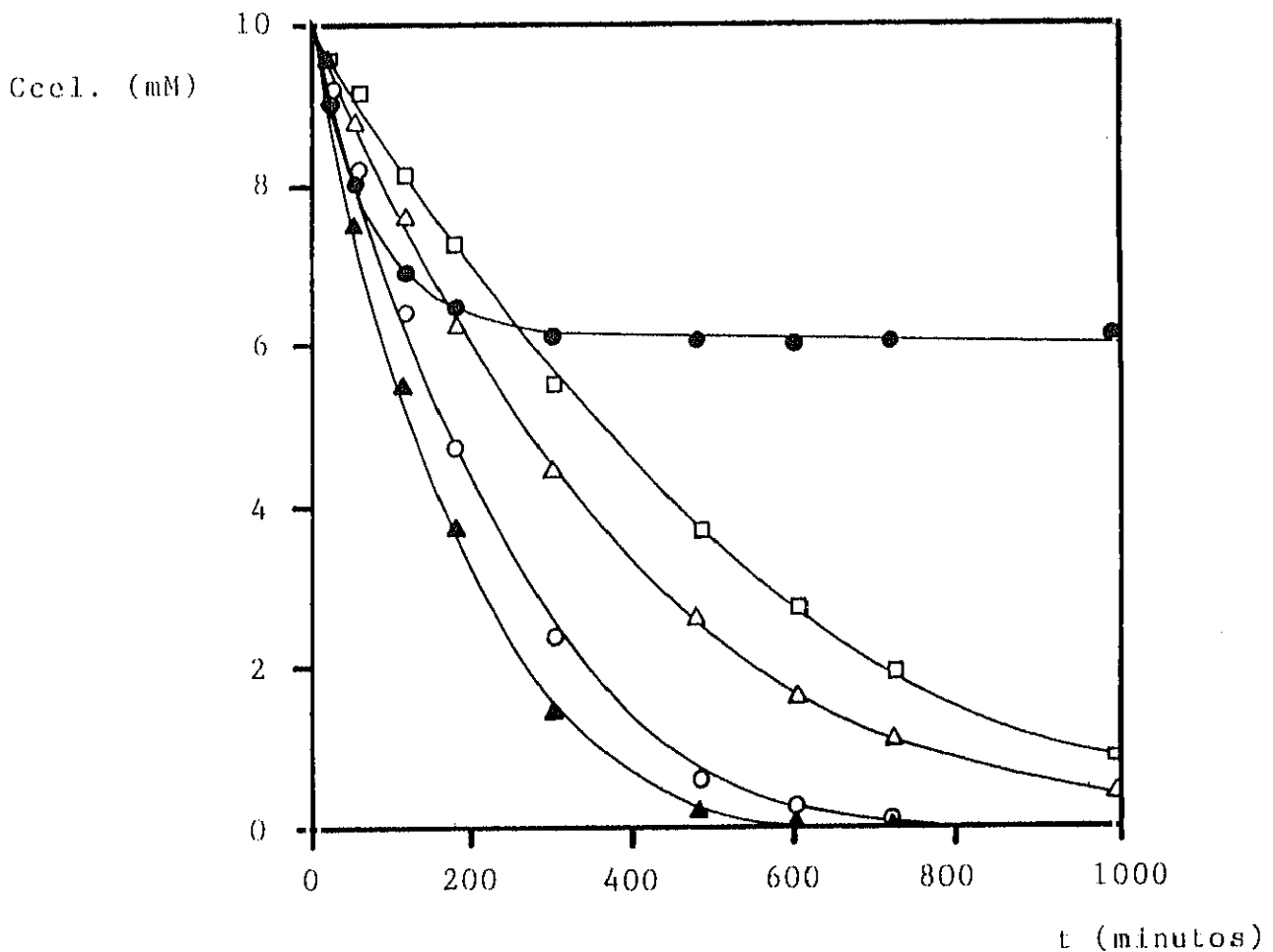


Figura 6.29. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Influencia de la temperatura: □ 30 °C; △ 40 °C; ○ 50 °C; ▲ 60 °C; ● 70 °C

II) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE CELOBIOSA

En la figura 6.30 se representan las variaciones de la concentración de celobiosa frente al tiempo correspondientes a experimentos en los que se varió la concentración inicial de celobiosa entre 2 y 25 mM. Los resultados obtenidos en estos experimentos se resumen en las tablas 5.32 y 5.34 a 5.37.

En dicha figura se observa que a medida que aumenta la concentración inicial de celobiosa, y para una misma concentración de celobiosa en el medio, por ejemplo 2 mM, la pendiente de la curva concentración de celobiosa frente al tiempo, que representa la velocidad de hidrólisis, no varía, al menos hasta concentración inicial 15 mM. Estos resultados indican que hasta dicho valor, parece ser que la concentración de sustrato existente en el medio no es suficiente para inhibir la enzima. Sin embargo, cuando se emplea inicialmente una concentración de celobiosa de 25 mM, si se compara la curva obtenida con las de 10 y 15 mM para una concentración de celobiosa en el medio de 10 mM, las pendientes de dicha curva en cada punto son menores que las de las otras dos curvas indicadas por lo que es muy posible que a estos valores de la concentración de sustrato, la enzima se vea inhibida por él.

En dicha figura se observa también que la pendiente de la curva correspondiente a concentración inicial de celobiosa 25 mM es claramente inferior a las pendientes de las curvas obtenidas para concentraciones iniciales inferiores, lo que pone de manifiesto que puede existir inhibición por sustrato para concentraciones iniciales del mismo superiores a 15 mM.

III) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA

Con el fin de conocer la posible inhibición de la enzima por el producto de la reacción (glucosa), se llevó a cabo la reacción enzimática en presencia de este compuesto a diferentes concentraciones iniciales. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 5.32 y 5.38 a 5.40 y se representan en la figura 6.31.

En esta figura se observa que, a medida que aumenta la concentración inicial de glucosa, la concentración de celobiosa disminuye más lentamente, es decir, disminuye la velocidad de reacción. Sin embargo, y dado que

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : variable estudiada
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : 1.16 UI/ml

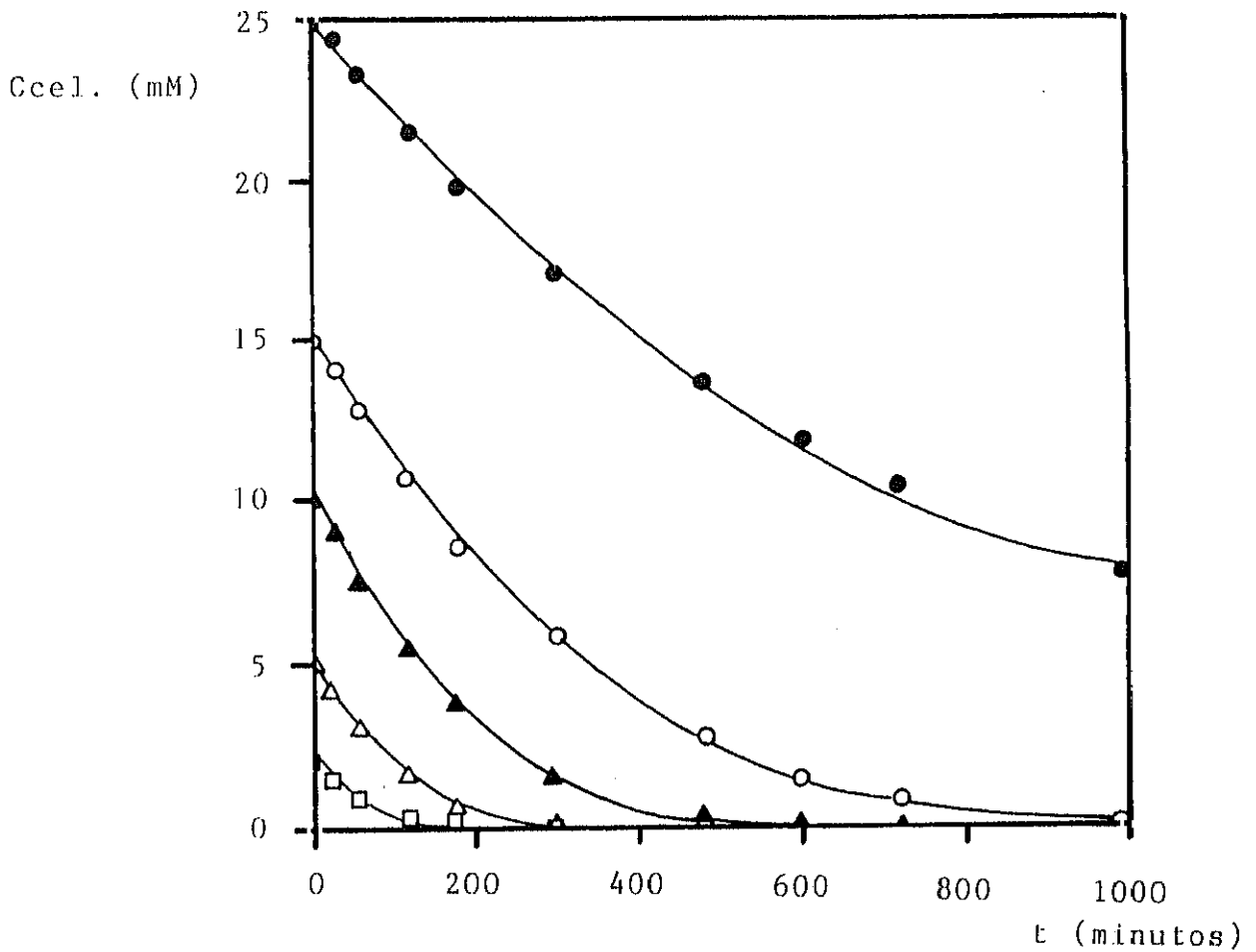


Figura 6.30. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Influencia de la concentración inicial de celobiossa:
 □ 2 mM; △ 5 mM; ▲ 10 mM; ○ 15 mM; ● 25 mM

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : variable estudiada
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : 1.16 UI/ml

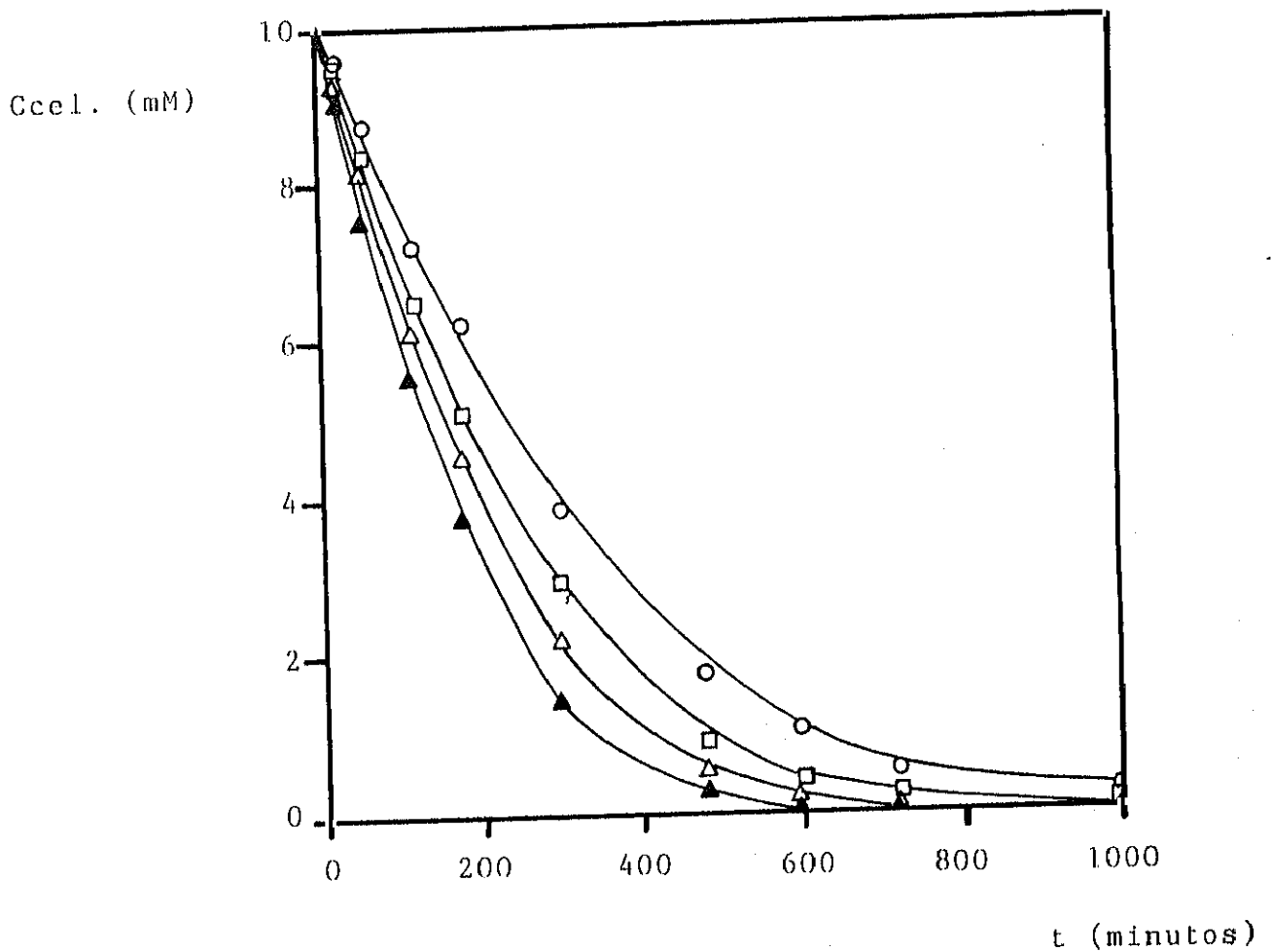


Figura 6.31. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Influencia de la concentración inicial de glucosa:
 ▲ 0 mM; △ 5 mM; □ 10 mM; ○ 20 mM

según la cinética enzimática habitual basada en la ecuación de Michaelis-Menten, la velocidad de reacción únicamente depende de la concentración de celobiosa en el medio, las cuatro curvas deberían superponerse.

El efecto observado puede explicarse, por tanto, suponiendo la existencia de inhibición por producto. Esta inhibición se hace más patente a medida que aumenta la concentración inicial de glucosa.

IV) INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Con objeto de estudiar la influencia de la actividad enzimática del medio sobre la velocidad de reacción, se llevaron a cabo cuatro experimentos cuyos resultados se resumen en las tablas 5.32 y 5.41 a 5.43. Los resultados obtenidos se representan en la figura 6.32 de la forma variación de la concentración de celobiosa frente al tiempo.

Se puede observar en dicha figura que, a medida que aumenta la actividad enzimática presente en el medio de reacción, aumenta la velocidad de reacción, es decir, la concentración de celobiosa en el medio disminuye más rápidamente. Sin embargo, es importante destacar que las curvas obtenidas para las diferentes actividades enzimáticas están cada vez más próximas. Así por ejemplo, para reducir la concentración de celobiosa en el medio a la mitad (5 mM) se requieran casi 600 minutos para una actividad de 0.32 UI/ml mientras que cuando la actividad se multiplica por cuatro, hasta 1.17 UI/ml, bastan 130 minutos, es decir, el tiempo se reduce un 78 %. Del mismo modo, al duplicar la actividad desde 1.17 hasta 2.06, el tiempo debería reducirse en un 39 %, sin embargo este sólo disminuye en un 31 %. Y para la mayor concentración ensayada, doble de la anterior, el tiempo sólo se reduce en un 22 %. Esta progresiva aproximación entre las curvas cinéticas obtenidas a medida que aumenta la actividad enzimática se debe a que al aumentar la cantidad de enzima presente en el medio, lo hace lógicamente el número de moléculas de sustrato que pueden unirse a sus centros activos aumentando la velocidad de la hidrólisis. Sin embargo, puede llegar un momento en que el número de centros activos de la enzima presentes en el medio de reacción sea mayor que el de moléculas de sustrato capaces de reaccionar. Llegado este punto, un aumento de actividad en el medio ya no modificaría la velocidad de reacción para una misma concentración inicial de celobiosa.

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : variable estudiada

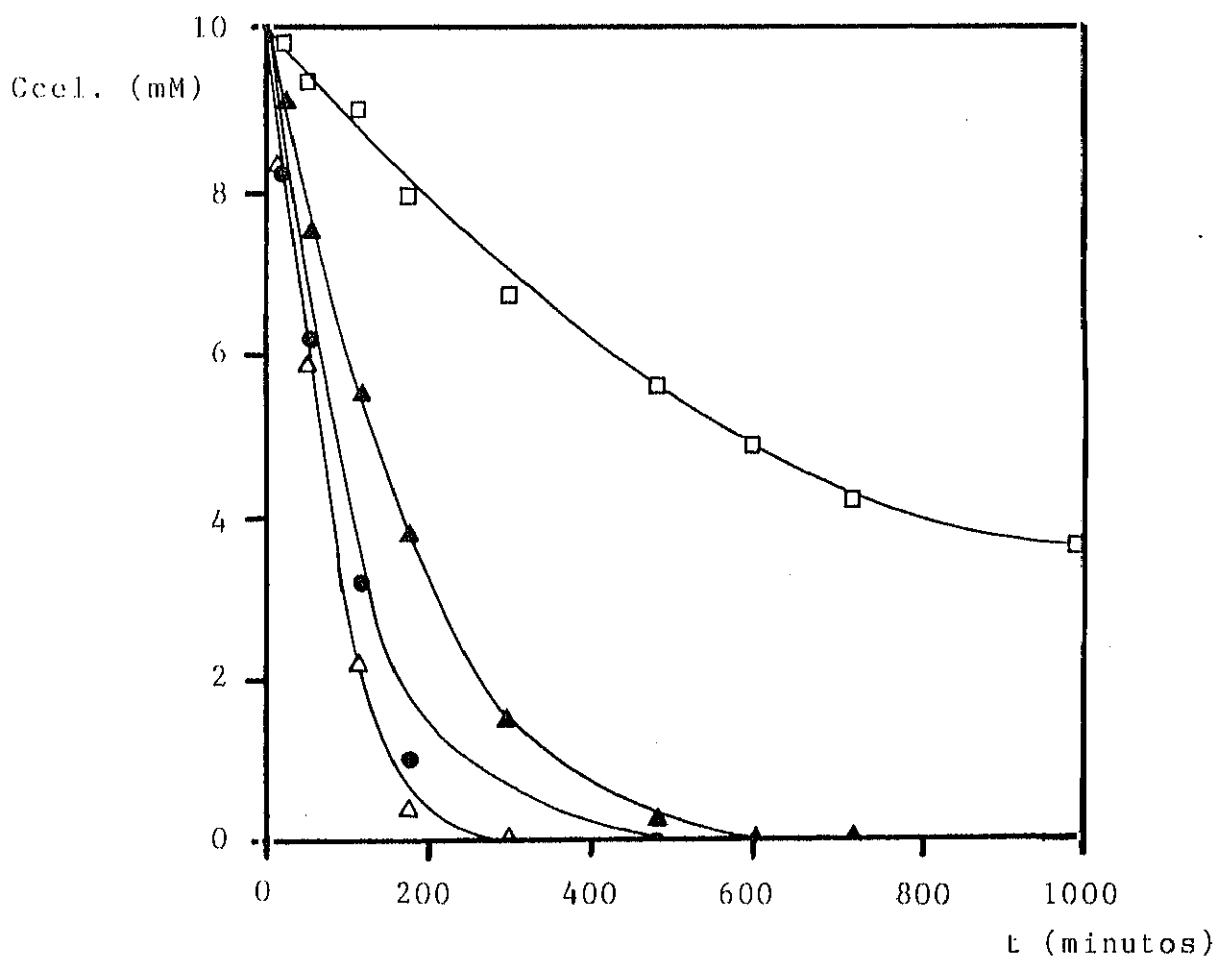


Figura 6.32. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Influencia de la actividad inicial de la disolución:
 \square 0.32 UI/ml; \blacktriangle 1.17 UI/ml; \bullet 2.06 UI/ml; \triangle 4.00 UI/ml

V) INFLUENCIA DEL pH

Por último y debido a la gran influencia que tiene el pH sobre la actividad enzimática, se estudió la variación de la velocidad de reacción con el pH del medio. Los resultados obtenidos, que se resumen en las tablas 5.32, 5.44 y 5.45, se presentan en la figura 6.33.

Se observa que de los tres valores de pH ensayados, la máxima velocidad de reacción se obtiene cuando el pH del medio es 4.8. Este pH se encontró muy próximo al óptimo también cuando se realizó la caracterización de la enzima estudiando su perfil de pH frente al ensayo estandar de actividad β -glucosidasa (apartado 9.3 del Apéndice).

También puede observarse que cuando se utilizan valores de pH por encima del óptimo (pH = 6.3), la velocidad de hidrólisis es superior a la que se obtiene a pH inferior al óptimo (pH = 3.5).

Como resumen, de los resultados obtenidos al estudiar la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa libre procedente de *P. funiculosum*, se puede deducir las siguientes conclusiones:

- La temperatura más ventajosa para llevar a cabo la hidrólisis parece ser 60 °C, temperatura a la que, si bien existe una importante desnaturalización enzimática, la velocidad a la que tiene lugar la reacción permite que esta transcurra casi totalmente antes de que la pérdida de actividad de la enzima sea demasiado elevada.
- Se ha puesto de manifiesto la inhibición por producto (glucosa), si bien no parece ser muy importante hasta que la concentración de glucosa en el medio no es superior a 10 mM. Asimismo, se ha detectado la posible inhibición por sustrato para concentraciones de celobiosa superiores a 15 mM.
- Un aumento de la actividad enzimática del medio implica un aumento de la velocidad de reacción, sin embargo dicha influencia disminuye para valores elevados de la actividad enzimática.
- El pH más adecuado para llevar a cabo la hidrólisis ha resultado ser 4.8. Asimismo se ha observado que una disminución del pH origina menores velocidades de hidrólisis que un aumento del mismo.

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: variable estudiada
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : 1,16 UI/ml

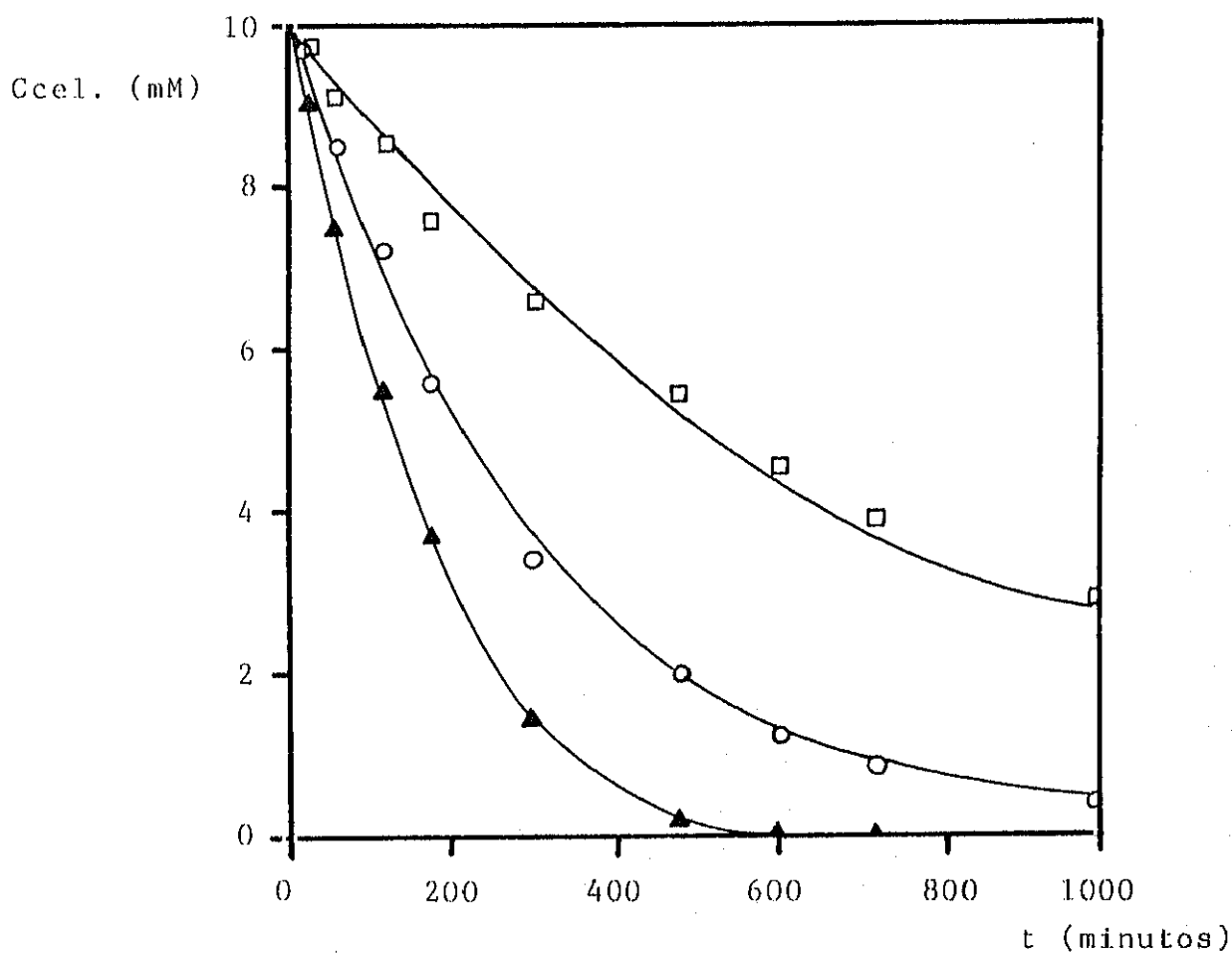


Figura 6.33. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Influencia del pH: \square 3.5; \blacktriangle 4.8; \circ 6.3

6.4.1.1. Modelo cinético para la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa:

Como ya se ha comentado en el apartado 2.3.2. de la Introducción, el esquema general de reacción más utilizado en la bibliografía para explicar la conversión de un sustrato (S) en un único producto (P) por la acción de una enzima (E) es el siguiente:



Este mecanismo fue propuesto por Michaelis y Menten en 1913 con el fin de explicar la ecuación empírica propuesta por Henri en 1902, obtenida a partir de sus estudios sobre cinética enzimática. La ecuación propuesta tenía la forma:

$$r = \frac{k_2 [E] [S]}{K_m + [S]} \quad [2.1]$$

En las tablas 6.4 y 6.5 se presentan los resultados obtenidos al ajustar, mediante un programa de cálculo basado en el Algoritmo de Marquardt para regresiones no lineales combinado con un método de Runge-Kuta de cuarto orden para la resolución de las ecuaciones diferenciales planteadas para la expresión de la velocidad, los resultados obtenidos en los experimentos realizados a diferentes concentraciones iniciales de celobiosa y glucosa, respectivamente, a la ecuación de Michaelis-Menten, ecuación [2.1]

A partir de los resultados obtenidos es posible sacar algunas conclusiones válidas para plantear un nuevo modelo:

- Si no existiera ningún tipo de inhibición, los valores de K_m y r_{max} obtenidos para todos los ajustes deberían coincidir pues las constantes cinéticas sólo son dependientes de la temperatura y del pH del medio pero no de la concentración de sustrato o producto.
- Del ajuste de los datos obtenidos en los experimentos realizados a diferentes concentraciones de sustrato se deduce que existe un importante efecto de inhibición por sustrato, mucho más patente para concentraciones iniciales de celobiosa superiores a 10 mM

- Del ajuste de los datos obtenidos en los experimentos a diferentes concentraciones de glucosa se deduce la existencia de inhibición por producto, que puede encuadrarse dentro del tipo de inhibición no competitiva descrita en el apartado 2.3.3. de la Introducción pues por un lado aumenta el valor aparente de K_m , disminuyendo al mismo tiempo r_{max} sin existir entre ambos parámetros una relación constante. Este tipo de inhibición también se denomina en ocasiones mixta pues el inhibidor puede unirse tanto al complejo enzima-sustrato como a la enzima.

Además, en todos los ajustes se obtienen discrepancias muy elevadas entre los valores experimentales y los predichos por el modelo, superiores incluso al 30 % en algunos casos.

TABLA 6.4
VALORES DE K_m , r_{max} Y ERROR MEDIO OBTENIDOS AL AJUSTAR
LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE CELOBIOSA A LA ECUACION DE MICHAELIS-MENTEN

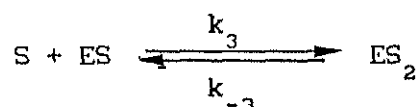
C celobio.	K_m	r_{max}	ϵ (%)
2	4.23	0.0827	12.7
5	5.19	0.0807	23.4
10	7.07	0.0809	32.1
15	12.62	0.0802	32.7
25	29.42	0.0802	5.0
mM	mM	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min}}$	

TABLA 6.5
 VALORES DE K_m , r_{max} Y ERROR MEDIO OBTENIDOS AL AJUSTAR
 LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE DIFERENTES CONCENTRACIONES
 DE GLUCOSA A LA ECUACION DE MICHAELIS-MENTEN

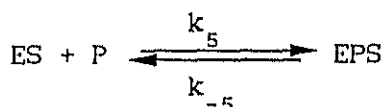
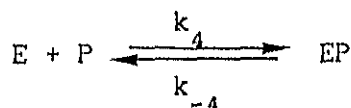
$C_{glucosa}$	K_m	r_{max}	e (%)
0	7.07	0.0839	32.1
5	7.27	0.0816	23.6
10	8.32	0.0803	15.3
15	10.24	0.0793	20.3
mM	mM	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min}}$	

Teniendo en cuenta estas premisas se propuso un mecanismo de reacciones que incluyera los dos efectos de inhibición observados.

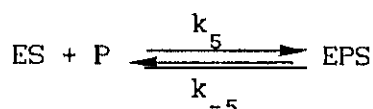
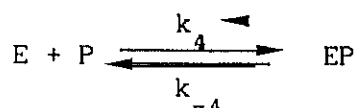
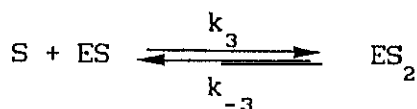
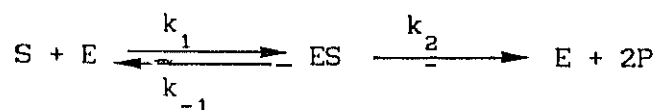
Para el sustrato se propuso el mecanismo habitual de inhibición:



Para el producto se propuso un mecanismo de inhibición no competitiva ya empleado por Halwachs para describir la hidrólisis de L-fenilalaninametiléster (Halwachs, 1978) y por Ladish y col. para describir la hidrólisis de celobiosa con endoglucanasa (Ladish, 1980):



por lo que el mecanismo completo de hidrólisis de celobiosa quedaría según el siguiente esquema de reacciones:



incluyéndose el coeficiente estequiométrico de la reacción, 2, puesto que una molécula de celobiosa conduce a dos de glucosa.

Aplicando la aproximación al estado estacionario a las diferentes especies intermedias que aparecen en el proceso:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad [6.7]$$

$$\frac{d[ES_2]}{dt} = 0 \quad [6.8]$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = 0 \quad [6.9]$$

$$\frac{d[EPS]}{dt} = 0 \quad [6.10]$$

y teniendo en cuenta que para cualquier tiempo t , la concentración total de enzima será la suma de la enzima libre y la combinada formando todos los intermedios de reacción presentes en el mecanismo propuesto:

$$E_{total} = E + [ES] + [ES_2] + [EP] + [EPS] \quad [6.11]$$

se obtiene, para la velocidad de reacción, la siguiente expresión:

$$r = - \frac{dS}{dt} = \frac{k'_2 E_{total} S}{K_m + S + K_1 S P + K_2 P + K_3 S^2} \quad [6.12]$$

donde:

$$k'_2 = 2 k_2 \quad [6.13]$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad [6.14]$$

$$K_1 = \frac{k_5}{k_{-5}} \quad [6.15]$$

$$K_2 = \frac{k_4}{k_{-4}} K_m \quad [6.16]$$

$$K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad [6.17]$$

Es importante la presencia, en la ecuación de velocidad, del término E_{total} , que representa la concentración total de enzima o más propiamente dicho la actividad enzimática total a lo largo de la reacción. Como ya se ha visto anteriormente (apartado 6.3 de la Discusión de resultados), la actividad enzimática varía con el tiempo y la temperatura debido a la desnaturalización de la enzima, según la ecuación [6.5]. Con el fin de tener en cuenta este efecto, que aunque no influye directamente sobre los resultados del ajuste a una determinada temperatura, conduce a valores de la velocidad máxima ($r_{max} = k'_2 E_{total}$) menores a los reales, se sustituyó en la ecuación de velocidad E_{total} por la expresión obtenida para la variación de la actividad con el tiempo a las diferentes temperaturas obtenidas:

$$r = - \frac{dS}{dt} = [E] \left(a_1 - \frac{a_2 k_1}{k_1 - k_2} \right) \exp(-k_1 t) + \frac{a_2 k_1}{k_1 - k_2} \exp(-k_2 t) \frac{k'_2 S}{K_m + S + K_1 S P + K_2 P + K_3 S^2} \quad [6.18]$$

Ajustando, mediante el programa de cálculo ya mencionado, los datos de los experimentos realizados a 60 °C y diferentes concentraciones iniciales de celobiosa y glucosa, así como para diferentes actividades enzimáticas iniciales, se obtuvieron los siguientes valores de las cons-

tantes cinéticas de la ecuación [6.18]:

$$k'_2 = 0.1021 \text{ min/mM UI/ml}$$

$$K_m = 4.23 \text{ mM}$$

$$K_1 = 0.0804 \text{ mM}$$

$$K_2 = 0.0994 \text{ mM}$$

$$K_3 = 0.0813 \text{ mM}$$

que, a diferencia de los obtenidos al ajustar los datos experimentales a la ecuación de Michaelis Menten, son independientes de las concentraciones iniciales de celobiosa y glucosa.

Una vez seleccionado este mecanismo de reacción, se ajustaron a la ecuación obtenida los resultados de los experimentos realizados a diferentes temperaturas. Los valores de las constantes cinéticas para las diferentes temperaturas se resumen en la tabla 6.6.

TABLA 6.6
VALORES DE LAS CONSTANTES DE LA ECUACION [6.18]
PARA LAS DIFERENTES TEMPERATURAS

Temperatura	k'_2	K_m	K_1	K_2	K_3
30	0.0510	16.40	0.0340	0.0870	0.0540
40	0.0607	13.98	0.0467	0.0925	0.0620
50	0.0855	8.13	0.0633	0.0963	0.0759
60	0.1021	4.23	0.0804	0.0994	0.0813
70	0.1221	3.01	0.0924	0.0999	0.0883
°C	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min UI}}$	mM	mM^{-1}	mM^{-1}	mM^{-1}

En la figura 6.34 se representan las concentraciones de celobiosa experimentales frente a las obtenidas mediante la ecuación [6.18] para los experimentos realizados a diferentes temperaturas. Se observa que en todos los casos el error es inferior al 10 %.

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- N: 200 r.p.m.

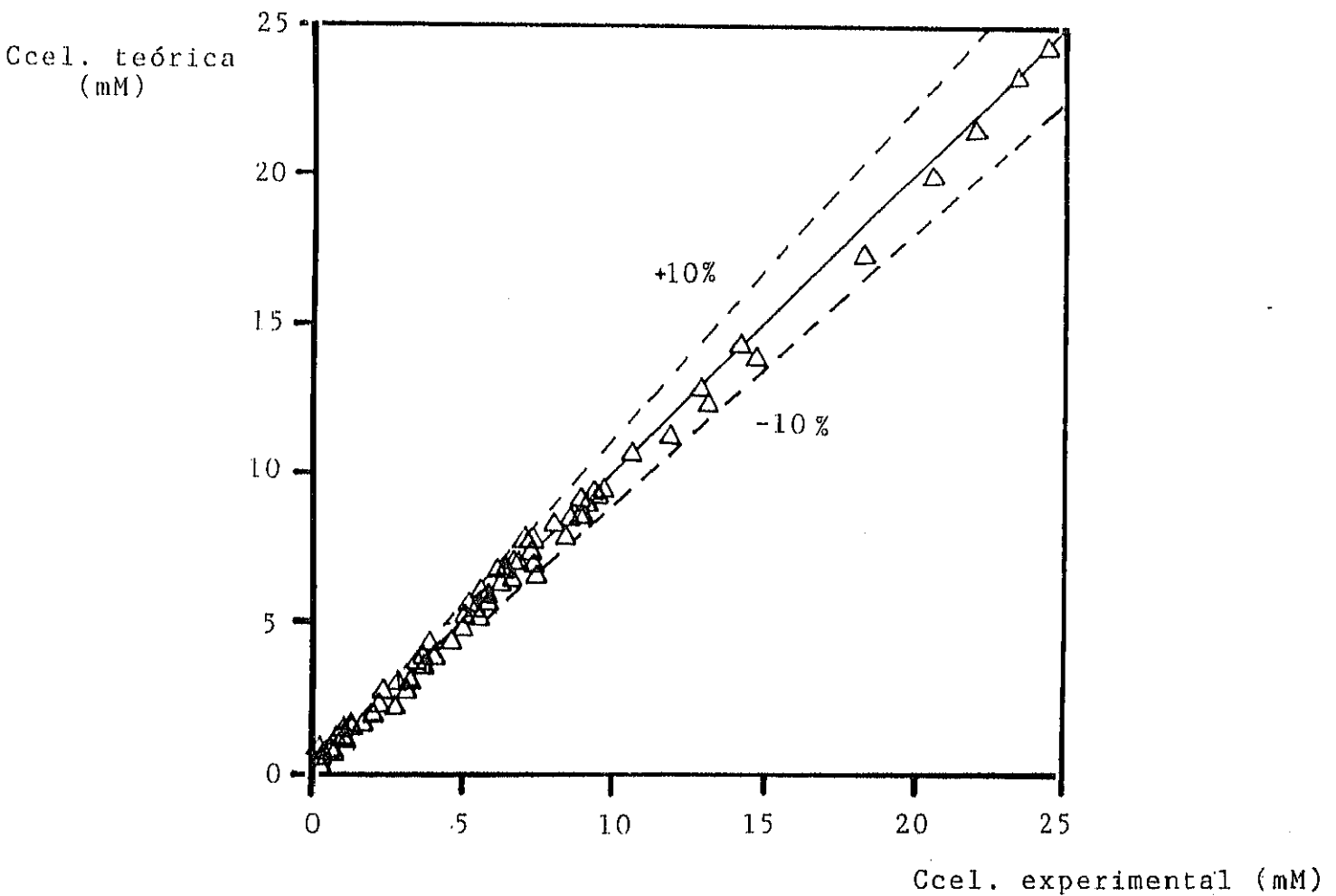


Figura 6.34. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo cinético.

Como se indica en el apartado 2.3.4. de la Introducción, las constantes cinéticas de las reacciones enzimáticas aumentan su velocidad con la temperatura según la relación de Arrhenius:

$$k = k_0 e^{(-E_a/RT)} \quad [2.22]$$

Todas las constantes de reacción relacionadas con el mecanismo propuesto así como el cociente o el producto de dos o más de ellas deben, por tanto, cumplir la ecuación de Arrhenius.

Teniendo en cuenta esto se llevó a cabo el ajuste de las constantes k'_2 , K_1 y K_3 a la ecuación de Arrhenius de forma directa. Los valores de la energía de activación y de las constantes preexponenciales obtenidos se resumen en la tabla 6.7. Por otro lado, la constante de Michaelis (K_m) incluye en su expresión la suma de dos constantes cinéticas por lo que no es posible ajustarla a una expresión del tipo Arrhenius de forma directa, sin embargo, esta constante se puede descomponer en la suma de dos cocientes entre constantes cinéticas, a las que llamaremos K_{m_1} y K_{m_2} según la expresión:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_{m_1} + K_{m_2} \quad [6.19]$$

y estas dos nuevas constantes si pueden ser ajustadas a la ecuación de Arrhenius. Los valores para la energía de activación y la constante preexponencial para ambas constantes se detallan en la tabla 6.7.

De igual forma, K_2 es el producto de un cociente de constantes cinéticas y K_m , por lo que si se divide esta constante por K_m , se obtiene el cociente k_4/k_{-4} que puede ajustarse a la ecuación de Arrhenius. En la tabla 6.7 se resumen los valores de la energía de activación y de la constante preexponencial para este cociente de constantes cinéticas.

TABLA 6.7

VALORES DE E_a Y k_o PARA LAS DIFERENTES CONSTANTES DE LA ECUACION [6.18]

	k'_2	K_{m_1}	K_{m_2}	K_1	K_3	k_4/k_{-4}
E_a (cal/mol)	4689.9	- 8009.9	- 16968.9	5273.8	2604.2	10160.3
k_o	$1.22 \cdot 10^2$	$2.31 \cdot 10^{-5}$	$4.18 \cdot 10^{-12}$	$2.24 \cdot 10^2$	4.15	$9.79 \cdot 10^4$
	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min UI}}$	mM	mM ⁻¹	mM ⁻¹	mM ⁻¹	

En las figuras 6.35 y 6.36 se representan los logaritmos de las constantes cinéticas frente al inverso de la temperatura y su ajuste a la ecuación de Arrhenius. En dicha figura se observa el buen ajuste de todas las constantes cinéticas con excepción de K_{m2} debido, probablemente, a que esta constante junto con K_{m1} se calculan a partir de K_m , ajustando los valores obtenidos a las cinco temperaturas estudiadas, a la expresión:

$$K_m = K_{m1} + K_{m2} = k_{o1} e^{(-E_{a1}/RT)} + k_{o2} e^{(-E_{a2}/RT)} \quad [6.20]$$

y aunque se obtuvieron ajustes con menores errores, los valores obtenidos para E_{a1} , k_{o1} , E_{a2} y k_{o2} en ellos no tenían significado físico.

Por último se ajustaron al modelo seleccionado los resultados obtenidos al realizar la hidrólisis de celobiosa a concentración inicial de celobiosa 10 mM, 60 °C y diferentes valores de pH. En la figura 6.37 se representan las concentraciones de celobiosa experimentales y las obtenidas a partir de la ecuación [6.18]. Se observa que el error medio es inferior al 10%.

Asimismo, en la tabla 6.8 se resumen los valores de las diferentes constantes cinéticas para los tres valores de pH estudiados.

TABLA 6.8
VALORES DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA ECUACION [6.18]
PARA LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS A DIFERENTES pH

$C_{cel.} = 10 \text{ mM}; C_{glu.} = 0 \text{ mM}; T = 60 \text{ }^\circ\text{C}; A_0 = 1.17 \text{ UI/ml}$

pH	k'_2	K_m	K_1	K_2	K_3
3.5	0.0427	15.60	0.0104	0.0494	0.0613
4.8	0.1021	4.23	0.0804	0.0994	0.0813
6.3	0.0737	10.20	0.0304	0.0864	0.0323
	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min UI}}$	mM	mM^{-1}	mM^{-1}	mM^{-1}

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: variable estudiada
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : 1.16 UI/ml

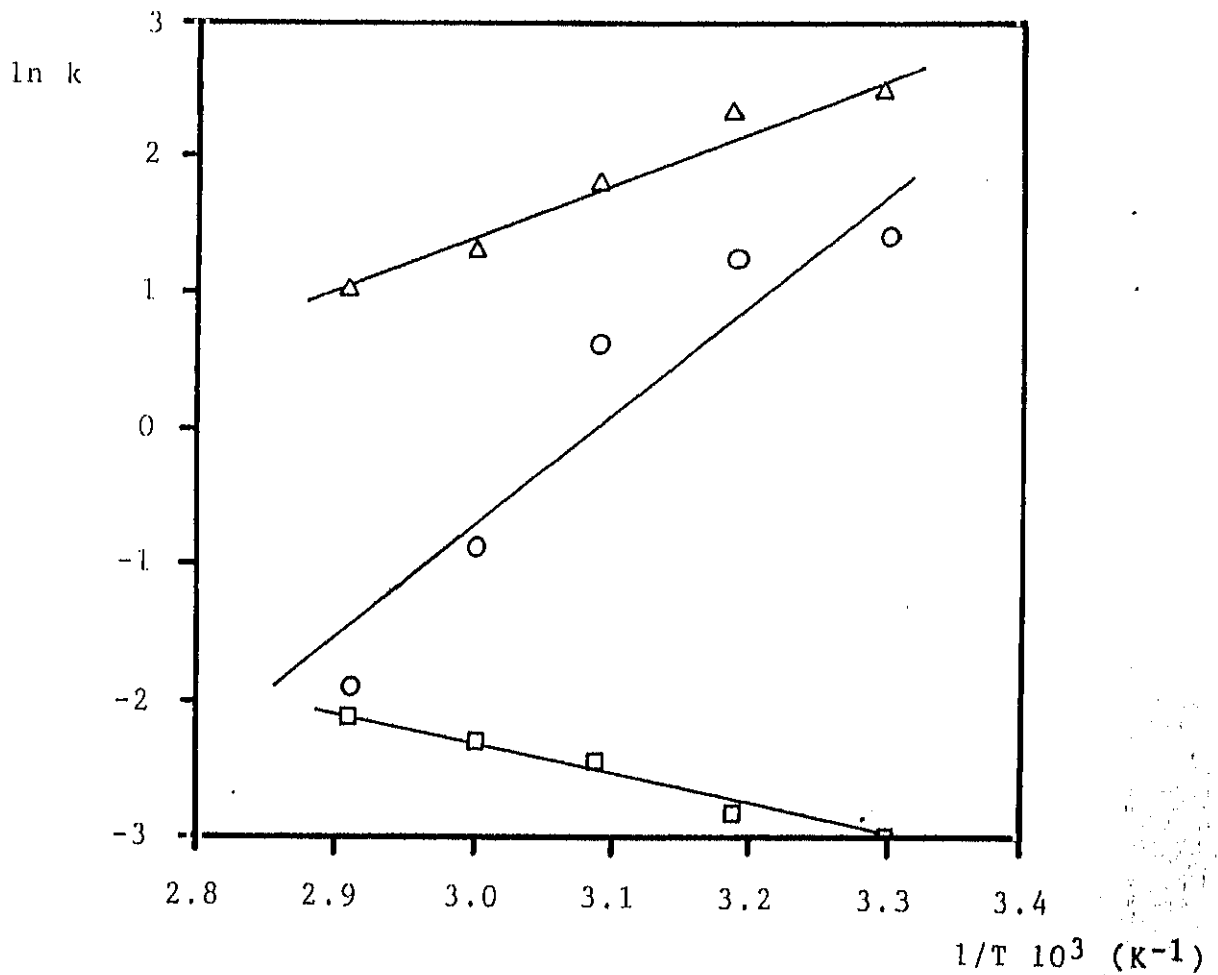


Figura 6.35. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Ajuste de las constantes cinéticas a la ecuación de Arrhenius: □ k_2 ; △ K_{m1} ; ○ K_{m2}

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: variable estudiada
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : 1.16 UI/ml

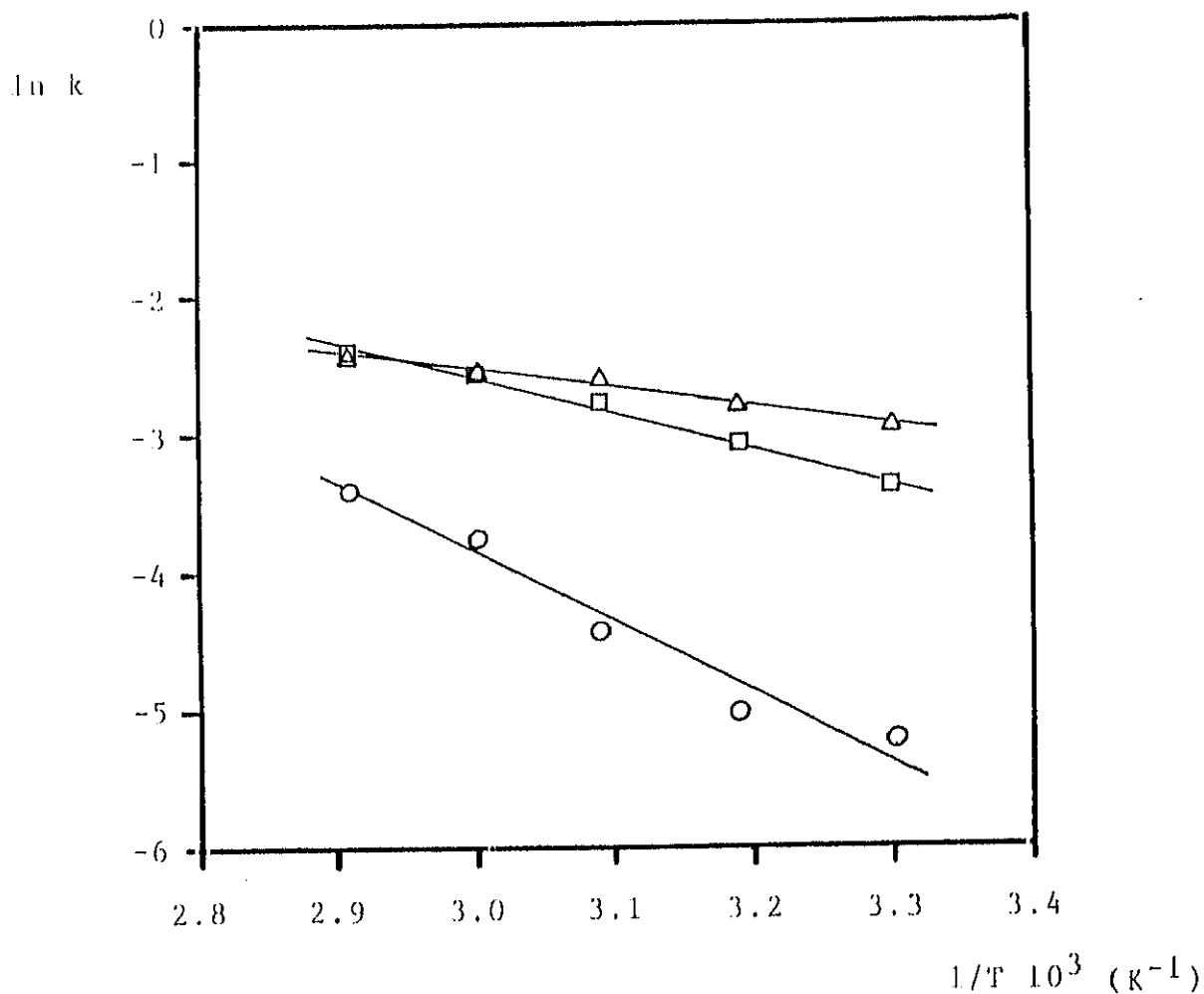


Figura 6.36. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Ajuste de las constantes cinéticas a la ecuación de Arrhenius: $\square K_1$; $\triangle k_4/k_{-4}$; $\circ K_3$

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: variable estudiada
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- A_0 : 1.16 UI/ml

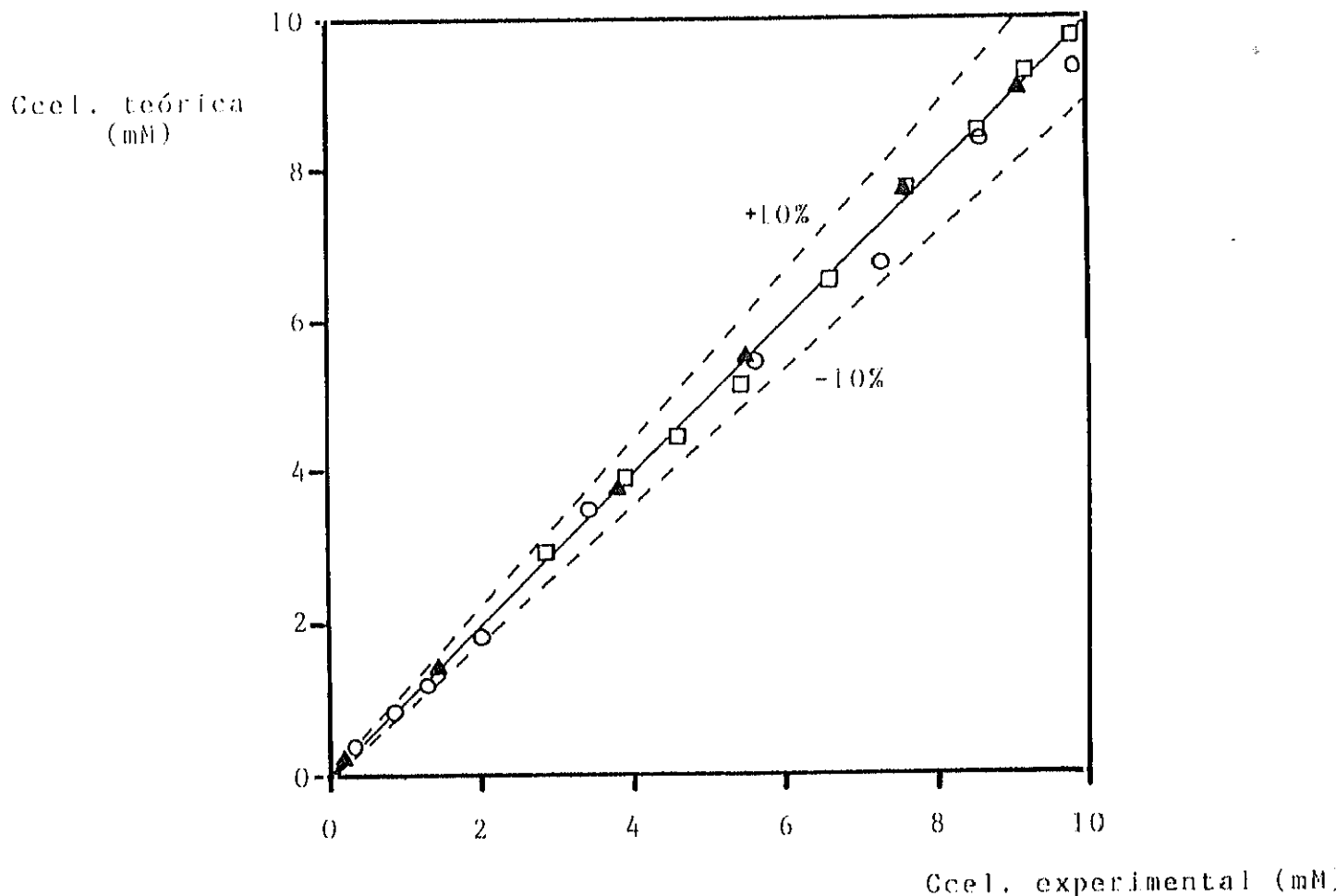


Figura 6.37. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* LIBRE: Comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo cinético. Influencia del pH: \square 3.5; \blacktriangle 4.8; \circ 6.3

En la tabla 6.8 se observa que, si bien valores diferentes del pH óptimo (4.8), desfavorecen la reacción de hidrólisis (disminuye k'_2 y aumenta K_m), también desfavorecen las reacciones de inhibición, lo que en cierto modo compensa la menor actividad de la enzima. La influencia del pH sobre las reacciones de inhibición es diferente, de forma que a pH más ácido que el óptimo, las reacciones de inhibición por producto se ven fuertemente desfavorecidas (constantes K_1 y K_2) mientras que la influencia sobre la reacción de inhibición por sustrato (constante K_3) es pequeña. A pH menos ácido que el óptimo, todas las reacciones de inhibición se ven desfavorecidas, siendo mayor este efecto en las constantes K_1 y K_2 .

6.4.2. HIDROLISIS CON β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

Dado que la inmovilización de la enzima puede provocar modificaciones de su actividad frente a un determinado sustrato, se realizó un estudio cinético de la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada sobre nylon en polvo.

En primer lugar y dado que en el caso de la enzima inmovilizada la reacción es heterogénea, se estudió la influencia de la velocidad de agitación. En el caso de la enzima libre, esta variación no se estudió por tratarse de un sistema homogéneo y únicamente se trabajó con una velocidad de agitación de 200 r.p.m. suficiente para que el medio de reacción estuviera bien homogeneizado.

1) INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACION

En la figura 6.38 se presentan los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la velocidad de agitación sobre la velocidad de reacción. Estos datos se resumen en las tablas 5.46 a 5.48.

En la figura se observa que cuando la reacción se lleva a cabo sin agitación, la velocidad de reacción es menor que cuando la reacción se lleva a cabo con una agitación de 200 r.p.m. Sin embargo, un nuevo aumento hasta 400 r.p.m. no provoca modificaciones apreciables de la velocidad de reacción.

A partir de estos resultados se eligió 200 r.p.m. como velocidad de agitación manteniéndose su valor constante a lo largo de las restantes experimentos.

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4,8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : variable estudiada
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

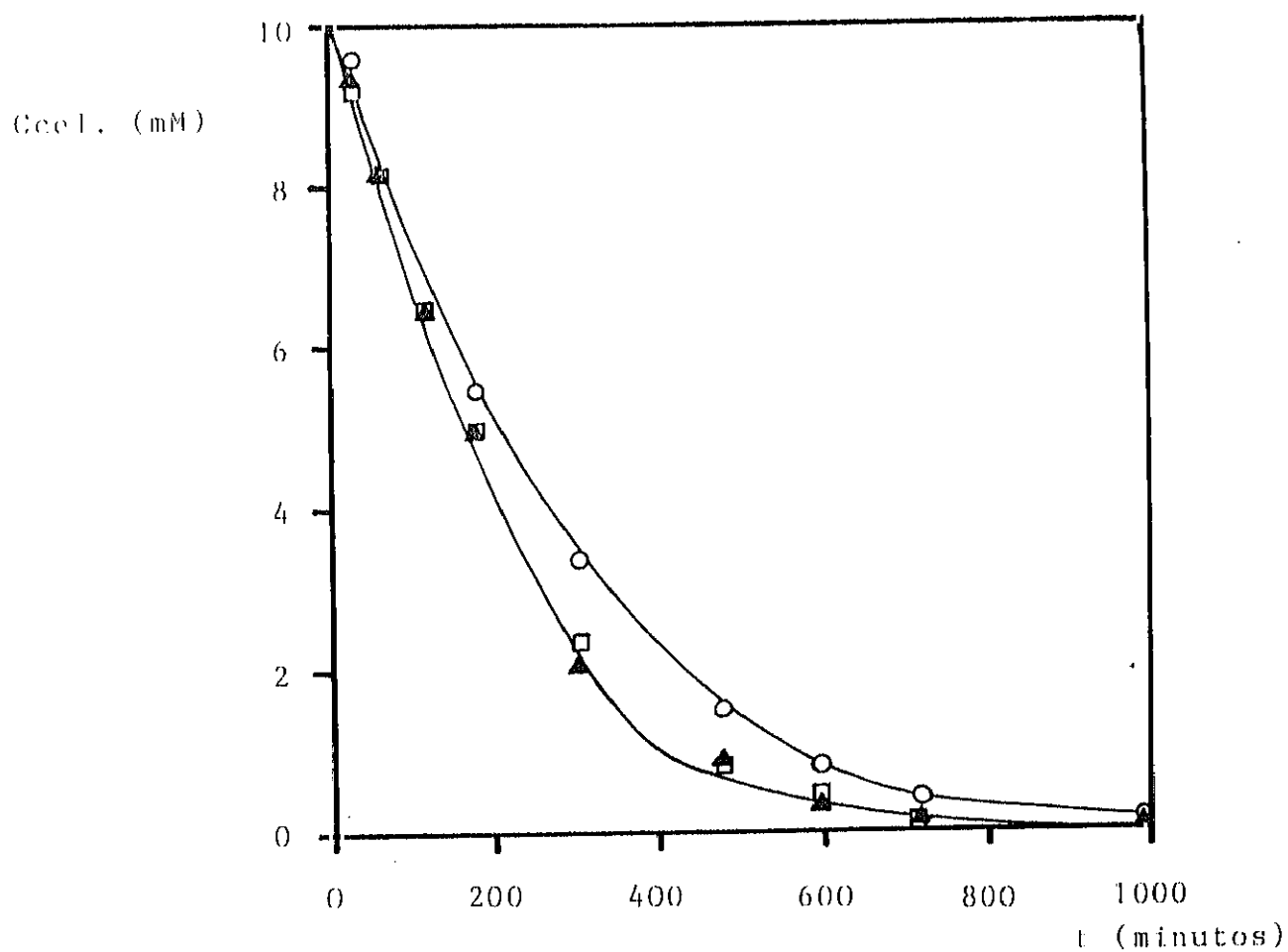


Figura 6.38. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Influencia de la velocidad de agitación: \circ 0 r.p.m.; \blacktriangle 200 r.p.m.; \square 400 r.p.m.

II) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

En la figura 6.39 se representan los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción. Estos resultados se resumen en las tablas 5.47 y 5.49 a 5.52.

Se observa en esta figura que, como en cualquier reacción química, al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de reacción. Sin embargo, para una temperatura de 70 °C se observa una disminución en la velocidad de reacción respecto de la obtenida a 60 °C, resultando prácticamente coincidente con la de 50 °C

Por otro lado, si se comparan estos resultados con los obtenidos para la hidrólisis con enzima libre (figura 6.29), es importante destacar que la influencia de la temperatura es mayor cuando la hidrólisis se realiza con enzima inmovilizada, ya que el aumento observado en la velocidad de reacción al aumentar la temperatura de 30 a 40 °C es mucho mayor. Así, mientras que en la hidrólisis con enzima libre utilizar temperaturas superiores a 60 °C detiene la reacción a partir de un determinado tiempo, sin alcanzar la conversión total debido a la desnaturalización enzimática, al emplear enzima inmovilizada, aunque la velocidad se reduce, haciéndose menor que la de 60 °C, la disminución es pequeña debido a que en el caso de la enzima inmovilizada la desnaturalización observada es mucho menor, no perdiéndose nunca totalmente la actividad de la enzima.

III) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE CELOBIOSA

Los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la concentración inicial de celobiosa, que se resumen en las tablas 5.47 y 5.53 a 5.56, se representan en la figura 6.40 de la forma concentración de celobiosa frente al tiempo.

En esta figura se puede observar que las curvas obtenidas para las diferentes concentraciones iniciales son prácticamente paralelas, obteniéndose valores semejantes de la velocidad de reacción para una misma concentración de celobiosa. Sin embargo, y dado que cuando se empleaba enzima libre se observaba un ligero efecto de inhibición por sustrato, es posible que esta también exista en el proceso realizado con enzima inmovilizada, aunque para valores de concentración de celobiosa más elevados.

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: variable estudiada
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

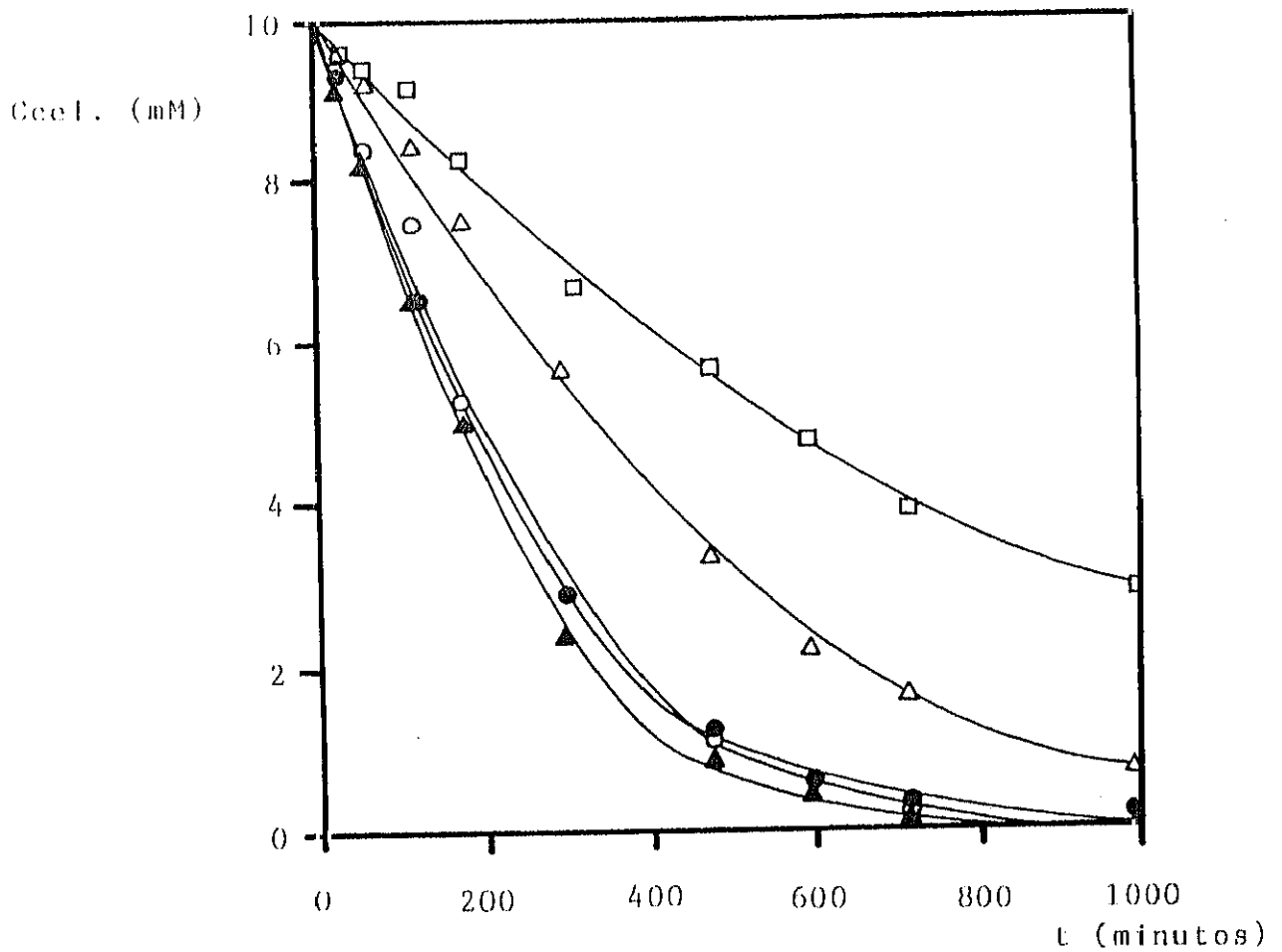


Figura 6.39. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Influencia de la temperatura: \square 30 °C; \triangle 40 °C; \circ 50 °C; \blacktriangle 60 °C; \bullet 70 °C

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : variable estudiada
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

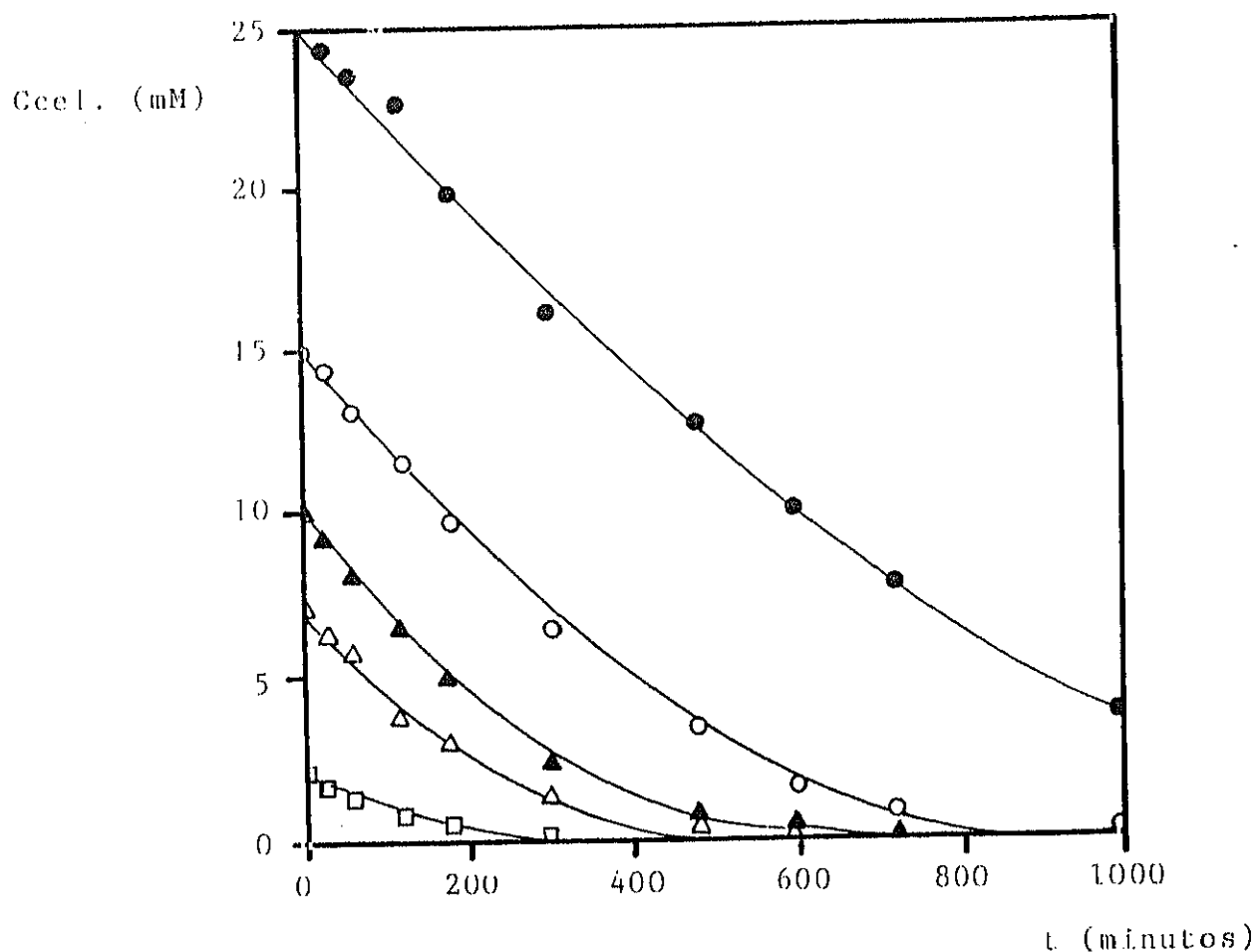


Figura 6.40. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Influencia de la concentración inicial de celobiosas: □ 2 mM; △ 5 mM; ▲ 10 mM; ○ 15 mM; ● 25 mM

IV) INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA

En la figura 6.41 se representan los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la concentración inicial de glucosa sobre la velocidad de reacción. Estos resultados se recogen en las tablas 5.47 y 5.57 a 5.59.

En esta figura se observa que, a medida que aumenta la concentración de glucosa adicionada inicialmente al medio, disminuye la velocidad con la que desaparece la celobiosa a lo largo del tiempo.

Este efecto puede explicarse por la existencia de inhibición por producto sobre la reacción. Sin embargo, si se comparan estos resultados con los obtenidos al utilizar enzima libre se observa que el efecto de inhibición es menor cuando la hidrólisis se realiza con enzima inmovilizada.

Esta disminución observada en los efectos de inhibición puede explicarse de igual modo que se explica la disminución de la velocidad de la reacción de hidrólisis al emplear enzima inmovilizada, ya que la inmovilización puede suponer impedimentos estéricos y de difusión hasta los centros de la enzima tanto en la reacción de hidrólisis propiamente dicha como los procesos de inhibición.

V) INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

En la figura 6.42 se representan los resultados de las tablas 5.47, 5.60 y 5.61, correspondientes al estudio de la influencia de la actividad enzimática sobre la velocidad de reacción.

En esta figura se observa que al aumentar la actividad enzimática (producto de la concentración del complejo enzima-soporte y de la actividad específica del mismo) en el medio de reacción aumenta lógicamente la velocidad de reacción.

Si se comparan estos resultados con los de la figura 6.32, correspondiente a la hidrólisis de celobiosa con enzima libre se puede observar que la influencia favorable de la actividad enzimática sobre la velocidad de reacción se mantiene para valores más elevados de la actividad enzimática cuando se utiliza enzima inmovilizada. Así, puede observarse, comparando ambas figuras, que para valores bajos de la actividad enzimática, la velo-

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : variable estudiada
- N : 200 r.p.m.
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

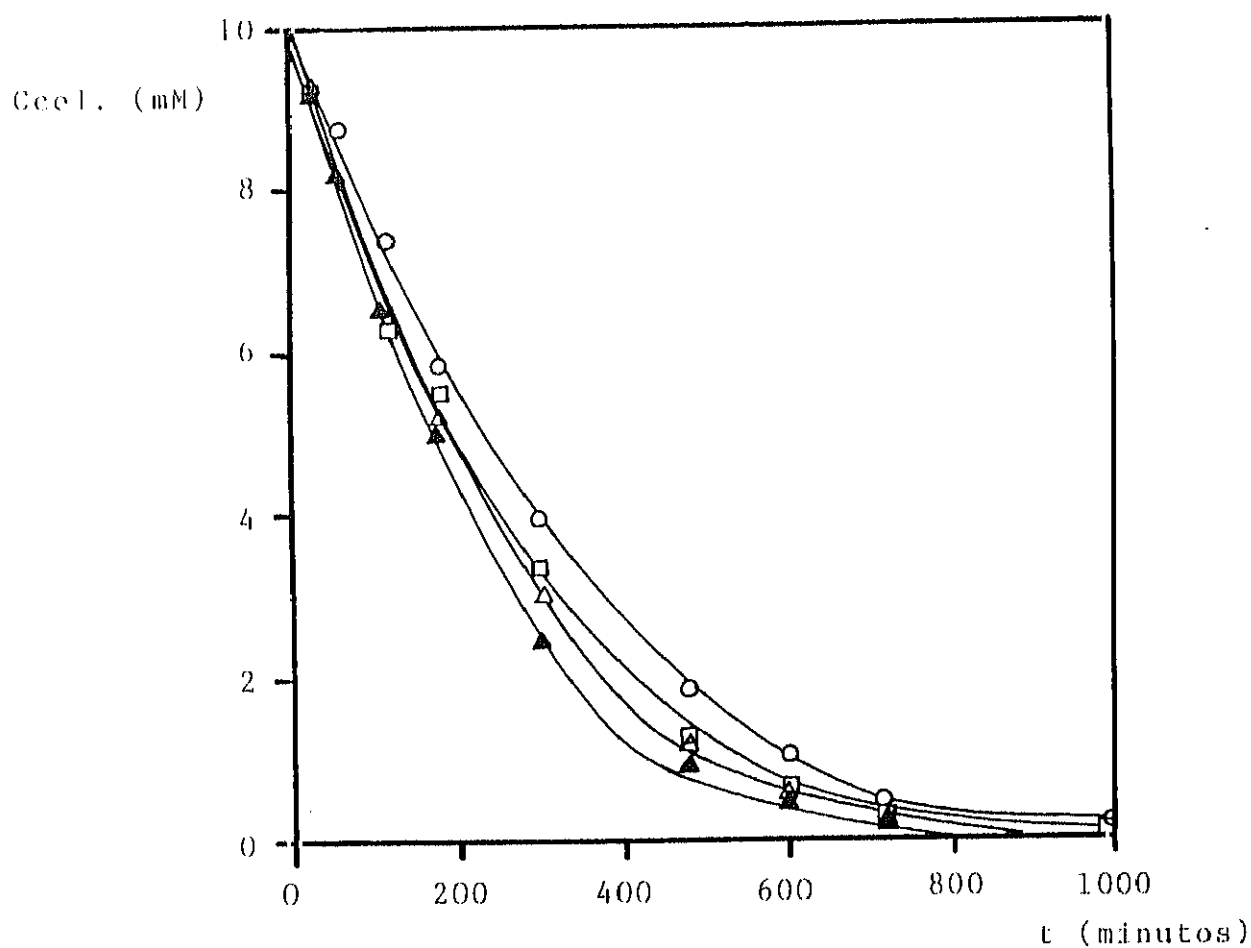


Figura 6.41. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Influencia de la concentración inicial de glucosa: \blacktriangle 0 mM; \triangle 5 mM; \square 10 mM; \circ 20 mM

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N: 200 r.p.m.
- C_{SE} : variable estudiada

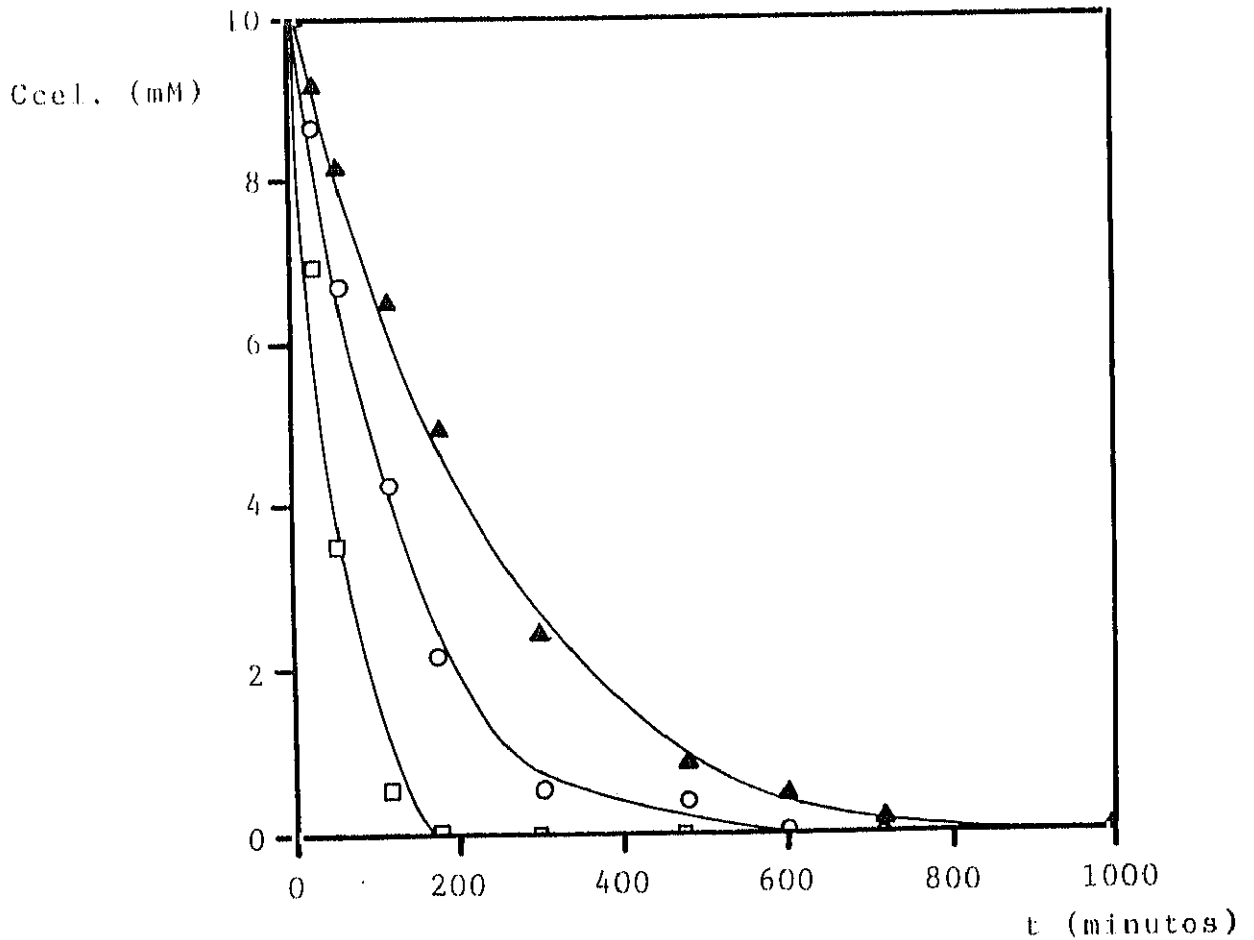


Figura 6.42. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Influencia de la actividad inicial de la disolución: ▲ 0.06 g soporte/ml; ○ 0.12 g soporte/ml; □ 0.24 g soporte/ml. Todos los soportes con una actividad específica de 17.5 UI/ml

cidad de hidrólisis es superior cuando se utiliza enzima libre, mientras que para valores más elevados de la actividad enzimática, la velocidad de hidrólisis es superior con enzima inmovilizada.

VI) INFLUENCIA DEL pH:

Los resultados obtenidos al estudiar la influencia del pH del medio sobre la velocidad de reacción, y que se resumen en las tablas 5.47, 5.62 y 5.63, se representan en la figura 6.43.

Se puede observar que, de los tres valores de pH ensayados, el que proporciona una mayor velocidad de reacción es 4.8. Estos resultados coinciden con los obtenidos para la enzima libre, si bien el efecto de un pH más ácido sobre la velocidad de reacción es menos acusado que en aquel caso. Esta coincidencia en lo que se refiere al pH más adecuado para llevar a cabo la reacción de hidrólisis para enzima libre y enzima inmovilizada se explica al efectuar la caracterización de la enzima frente al pH donde no se observan modificaciones importantes en la actividad enzimática al inmovilizar la enzima (apartado 9.3 del Apéndice).

6.4.2.1. Modelo cinético para la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada.

Como ya se ha comentado en el apartado 2.5.4. de la Introducción, la inmovilización suele provocar modificaciones sobre los parámetros cinéticos. La constante de Michaelis (K_m) suele aumentar tras la inmovilización debido a la aparición de efectos difusionales tanto externos como internos, a problemas de impedimento estérico y a cambios conformacionales, siendo estos últimos la causa más frecuente en las técnicas de inmovilización por formación de enlace covalente, en las que se produce modificación química de la enzima.

La variación de la velocidad máxima de reacción, r_{max} , suele ser menos importante, si bien puede disminuir hasta la décima parte de su valor.

Sin embargo, la inmovilización no suele provocar modificaciones en el mecanismo de reacción por lo que se ha aplicado a la hidrólisis de celobiosa con enzima inmovilizada el mismo mecanismo propuesto para la hidrólisis con enzima libre.

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: variable estudiada
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

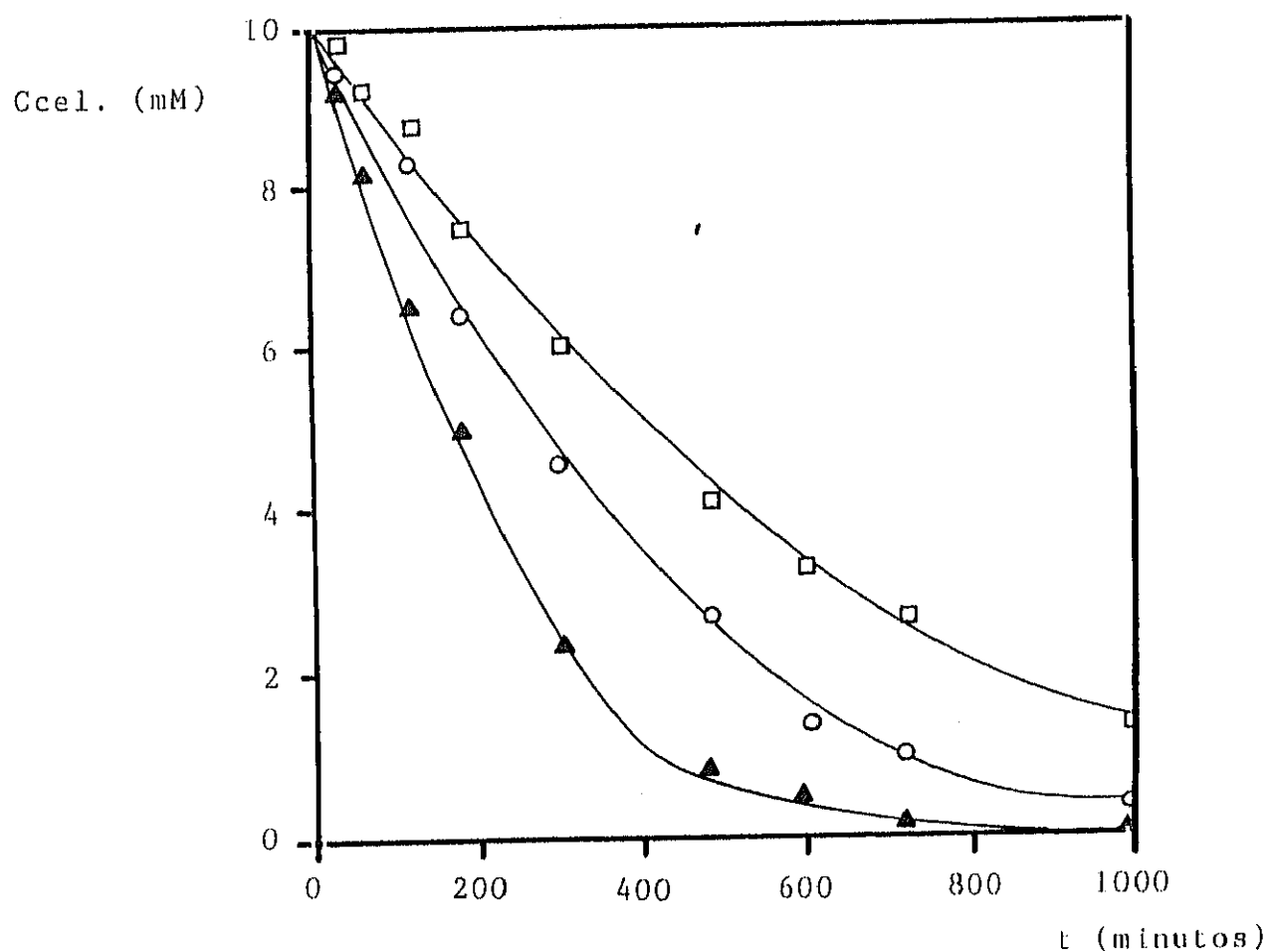


Figura 6.43. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Influencia del pH: \square 3.5; \blacktriangle 4.8; \circ 6.3

Por tanto, la ecuación representativa de la velocidad de reacción coincidirá con la ecuación [6.12], en la que ahora E_{total} vendrá dada por la ecuación [6.6] correspondiente a la variación de la actividad enzimática de β -glucosidasa con el tiempo, calculada en el apartado 6.3.2.1. para la enzima inmovilizada. Combinando ambas ecuaciones se obtiene:

$$r = - \frac{dS}{dt} = \left(1 - \frac{B t}{C + t} \right) \frac{k'_2 S}{K_m + S + K_1 S P + K_2 P + K_3 S^2} \quad [6.21]$$

Ajustando los resultados obtenidos en todos los experimentos de hidrólisis de celobiosa con enzima inmovilizada a pH = 4.8, a la ecuación [6.21] mediante el empleo de un programa de cálculo basado en el Algoritmo de Marquardt para la resolución de sistemas de ecuaciones no lineales combinado con el método de Runge-Kuta para la resolución numérica de ecuaciones diferenciales, se obtiene los valores de las constantes cinéticas que se resumen en la tabla 6.9.

En la figura 6.44 se representan los valores experimentales de la concentración de celobiosa frente a los obtenidos mediante la ecuación [6.21], observándose que en todos los casos el error medio es inferior al 10 %.

TABLA 6.9
VALORES DE LAS CONSTANTES DE LA ECUACION [6.21]
PARA LAS DIFERENTES TEMPERATURAS

Temperatura	k'_2	K_m	K_1	K_2	K_3
30	0.0317	18.86	0.0162	0.0689	0.0370
40	0.0510	16.55	0.0222	0.0745	0.0487
50	0.0754	11.96	0.0331	0.0831	0.0501
60	0.0894	9.35	0.0383	0.0899	0.0598
70	0.1040	7.94	0.0465	0.0912	0.0632
°C	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min UI}}$	mM	mM^{-1}	mM^{-1}	mM^{-1}

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- N: 200 r.p.m.

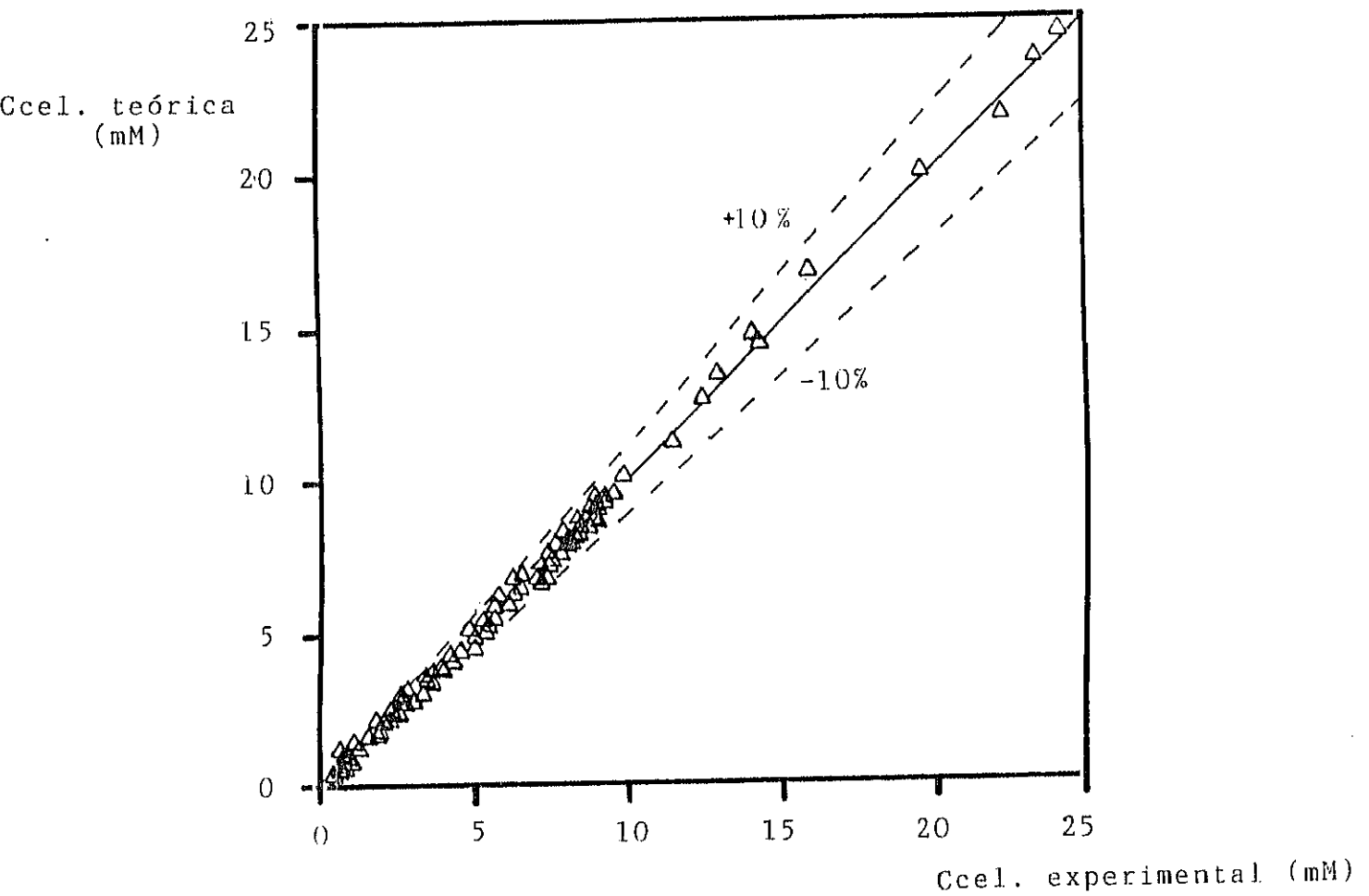


Figura 6.44. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo cinético.

Siguiendo un criterio semejante al establecido para la enzima libre, se llevó a cabo el ajuste de las constantes cinéticas, o de combinaciones adecuadas de las mismas, a la ecuación de Arrhenius para las diferentes temperaturas ensayadas. En la tabla 6.10 se resumen los valores de energía de activación y de la constante preexponencial obtenidos para estas constantes.

En las figuras 6.45 y 6.46 se representan de la forma logaritmo de la constante cinética frente a la inversa de la temperatura los valores experimentales y los ajustes a la ecuación de Arrhenius obtenidos. Se puede observar que se obtiene buen ajuste para todas las constantes, con errores medios inferiores al 5 %.

Por último se ajustaron los datos obtenidos para los experimentos realizados a concentración inicial de celobiosa 10 mM, concentración inicial de glucosa 0 mM, temperatura de 60 °C y tres valores de pH, a la ecuación cinética propuesta, obteniéndose los valores de las constantes que se resumen en la tabla 6.11.

En la figura 6.47 se representan los valores experimentales de la concentración de celobiosa obtenidos a los diferentes valores de pH y los calculados a partir de la ecuación [6.21] con los valores de las constantes de la tabla 6.11.

TABLA 6.10

VALORES DE E_a Y k_0 PARA LAS DIFERENTES CONSTANTES DE LA ECUACION [6.21]

	k'_2	K_{m_1}	K_{m_2}	K_1	K_3	k_4/k_{-4}
E_a (cal/mol)	6087.9	- 4700.5	- 4700.5	5464.6	2631.2	6165.4
k_c	$8.37 \cdot 10^2$	$7.34 \cdot 10^{-3}$	$8.05 \cdot 10^{-3}$	$1.46 \cdot 10^2$	3.08	$9.89 \cdot 10^1$
	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min UI}}$	mM	mM ⁻¹	mM ⁻¹	mM ⁻¹	

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: variable estudiada
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

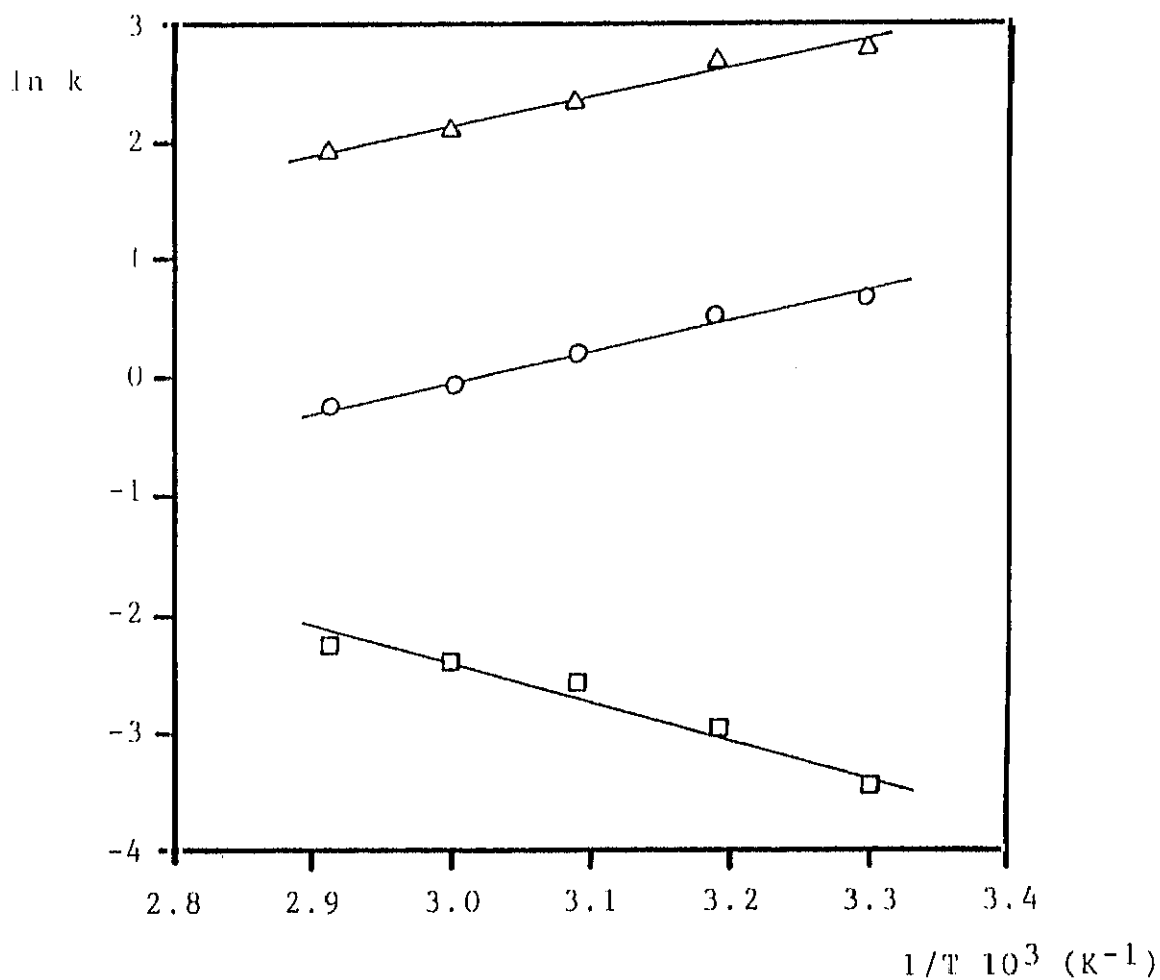


Figura 6.45. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Ajuste de las constantes cinéticas a la ecuación de Arrhenius: \square k_2 ; Δ K_{m1} ; \circ K_{m2}

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: variable estudiada
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: 4.8
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

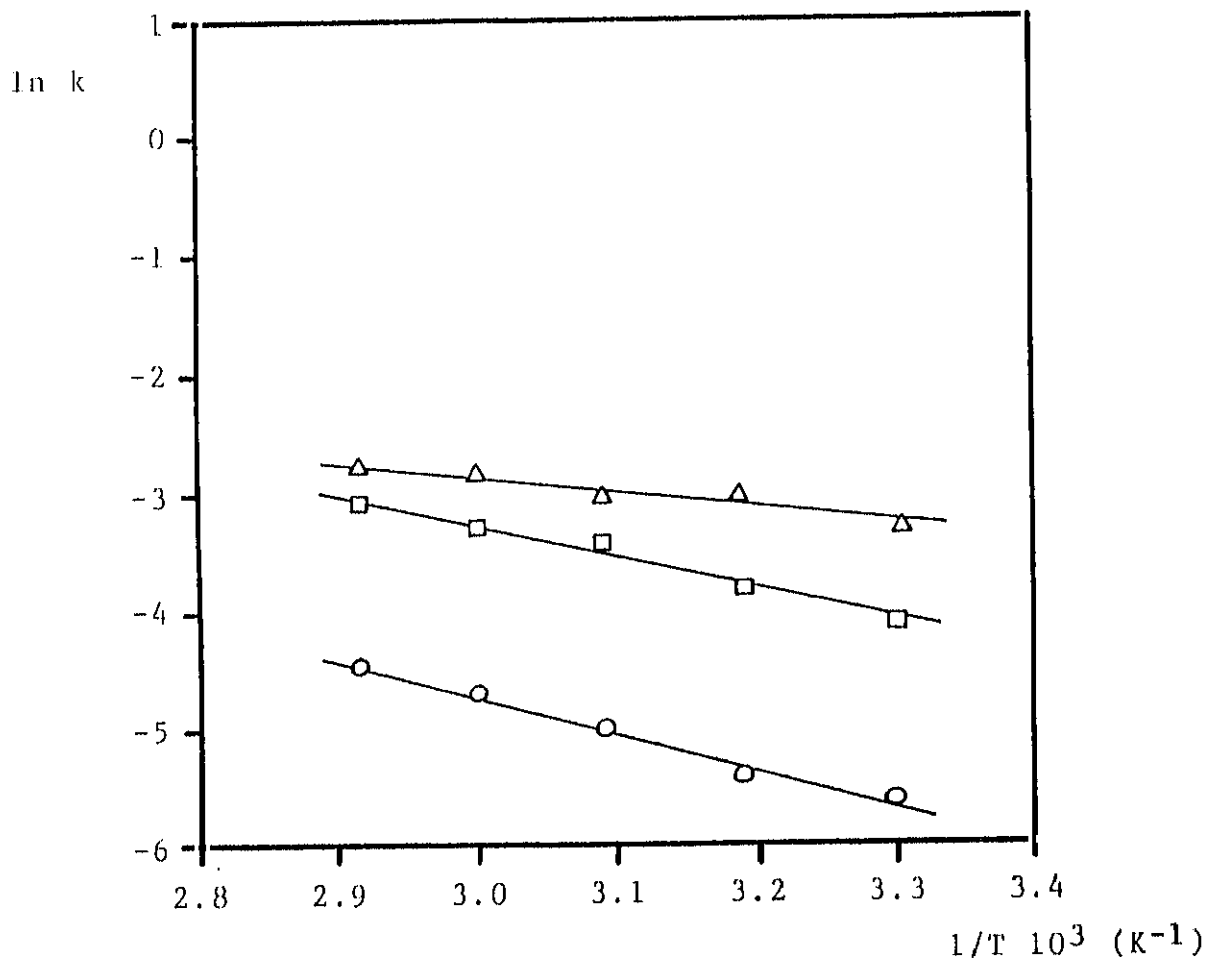


Figura 6.46. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA; Ajuste de las constantes cinéticas a la ecuación de Arrhenius; \square K_1 ; Δ k_4/k_{-4} ; \circ K_3

CONDICIONES DE OPERACION:

- TEMPERATURA: 60 °C
- VOLUMEN TOTAL: 100 ml
- pH: variable estudiada
- C_{cel} : 10 mM
- C_{glu} : 0 mM
- N : 200 r.p.m.
- C_{SE} : 0.06 g/ml (17.5 UI/g)

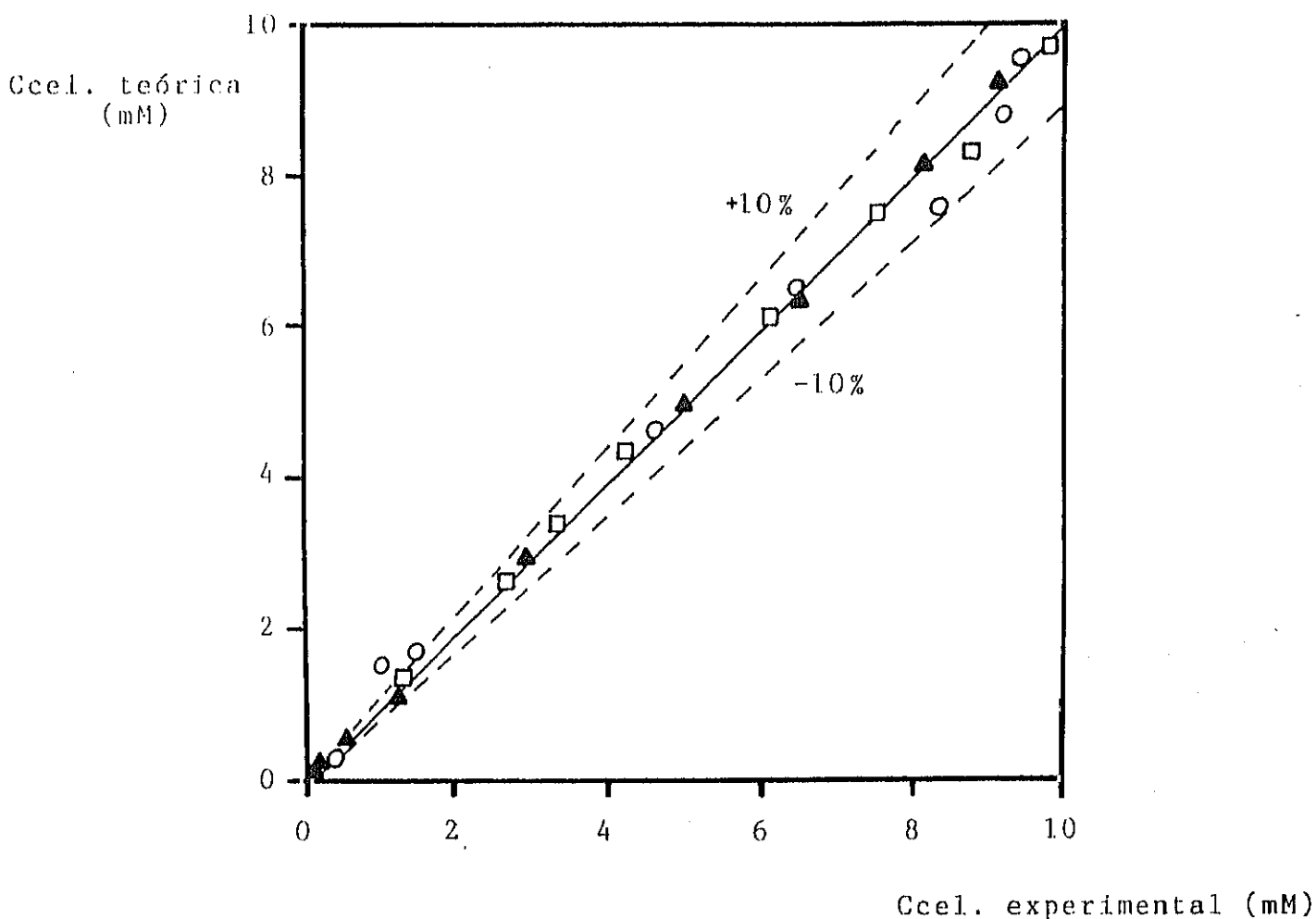


Figura 6.47. HIDROLISIS DE CELOBIOSA CON β -GLUCOSIDASA DE *P. funiculosum* INMOVILIZADA: Comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el modelo cinético. Influencia del pH: \square 3.5; \blacktriangle 4.8; \circ 6.3

TABLA 6.11
VALORES DE LAS CONSTANTES CINETICAS DE LA ECUACION [6.21]
PARA LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS A DIFERENTES pH

pH	k'_2	K_m	K_1	K_2	K_3
3.5	0.0412	11.50	0.0213	0.0636	0.0564
4.8	0.0894	9.35	0.0383	0.0899	0.0598
6.3	0.0623	10.80	0.0422	0.0543	0.0676
	$\frac{\text{mol}}{\text{ml min UI}}$	mM	mM^{-1}	mM^{-1}	mM^{-1}

Los efectos observados sobre las reacciones de inhibición por el pH son en el caso de la enzima inmovilizada, diferentes a los observados en el caso de la enzima libre. En el caso de un pH menos ácido que el que proporciona la máxima velocidad de reacción (4.8), las constantes K_1 y K_3 aumentan ligeramente respecto de los valores obtenidos a pH 4.8, mientras que la constante K_2 disminuye casi hasta la mitad. Cuando se emplea un pH más ácido, todas las constantes correspondientes a las reacciones de inhibición disminuyen, siendo K_3 la que disminuye en menor proporción.

Finalmente, y una vez realizado el estudio cinético tanto para la β -glucosidasa libre como para la enzima inmovilizada sobre nylon en polvo, se pueden hacer algunas consideraciones generales, comparando los resultados obtenidos.

Si se comparan los valores de las constantes k'_2 para la enzima libre e inmovilizada y para las diferentes temperaturas, se observa que en todos los casos el valor de esta constante para la enzima inmovilizada es siempre menor al obtenido para la enzima libre, manteniéndose entre ambas para las diferentes temperaturas estudiadas, una relación k'_{2i}/k'_2 entre 0.75 y 0.85.

La comparación entre los diferentes valores de K_m para la enzima libre e inmovilizada, muestra que el valor que para esta constante se obtiene en el caso de la enzima libre es siempre menor que el obtenido para la enzima inmovilizada, obteniéndose una relación entre ambos valores que aumenta a medida que aumenta la temperatura, y que está comprendida entre 1.2 y 2.7.

La inhibición de la β -glucosidasa por producto (constantes K_1 y K_2) resulta ser siempre menor cuando la hidrólisis se realiza con enzima libre que cuando esta se encuentra inmovilizada aunque la temperatura origina efectos opuestos según el tipo de inhibición (la inmovilización competitiva, K_1 , se favorece más con la temperatura en el caso de la enzima libre, mientras que la no competitiva, K_2 , se favorece más con la temperatura en el caso de la enzima inmovilizada).

Por el contrario, la enzima inmovilizada se inhibe en menor grado por el sustrato que en estado libre, ejerciendo la temperatura un efecto semejante en ambos casos.

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente investigación es posible extraer las siguientes conclusiones:

1. Las condiciones de inmovilización seleccionadas fueron:

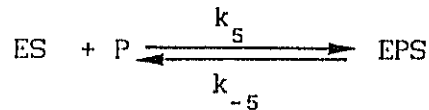
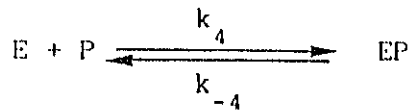
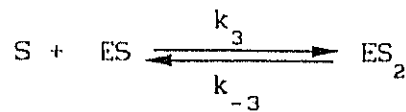
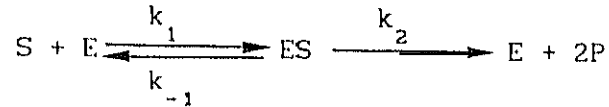
- Origen de la β -glucosidasa: *Penicillium funiculosum*
- Soporte: Nylon en polvo
- Activación del soporte: Mediante o-alkilación durante 15 minutos con tetrafluoruro de trietiloxonio al 12.5 % en diclorometano, posterior aminoactivación durante 120 minutos con etilendiamina y activación final con glutaraldehído al 5 % en agua destilada durante 15 minutos.
- Inmovilización propiamente dicha: a 25 °C durante 15 horas empleando una disolución enzimática de actividad 1.17 UI/ml.

Empleando estas condiciones de activación e inmovilización se obtiene un soporte con una retención activa del 70 % y una elevada estabilidad térmica a 50 °C (. % de la inicial al cabo de 25 horas).

2. La desnaturalización térmica de la β -glucosidasa libre transcurre a través de una estructura intermedia de mayor actividad que la estructura original, que implica la aparición de un máximo de actividad a tiempos menores cuanto mayor es la temperatura y que sólo puede ser apreciado a temperaturas inferiores a 55 °C, pudiéndose ajustar los resultados obtenidos a un modelo de dos reacciones en serie de primer orden, que reproduce los datos experimentales con un error medio inferior al 10 %.
3. La inmovilización de la β -glucosidasa sobre nylon en polvo conduce a un importante aumento de estabilidad térmica a todas las temperaturas estudiadas. Los resultados obtenidos al estudiar la desnaturalización térmica de la enzima inmovilizada se ajustan a un modelo empírico de tipo hiperbólico, que reproduce los mismo con un error medio inferior al 5 %.
4. La temperatura más adecuada para llevar a cabo la hidrólisis de celobiosa es de 60 °C, tanto con β -glucosidasa libre como inmovilizada.
5. Existe un efecto de inhibición por sustrato para concentraciones de celobiosa superiores a 15 mM cuando se utiliza enzima libre y superior a 25 mM cuando se emplea enzima inmovilizada.
6. Se observa la existencia de inhibición por producto, de tipo competitivo, tanto con enzima libre como inmovilizada, que se hace patente desde valores muy bajos de la concentración de glucosa.
7. Al estudiar la influencia del pH sobre la hidrólisis con enzima libre e inmovilizada, se observa que el valor óptimo de trabajo es de 4.8. Valores de pH más ácidos implican una importante disminución de la velocidad de reacción, mientras que pH más básicos conducen a una disminución de la velocidad de hidrólisis mucho menos acusada.

conducen a una disminución de la velocidad de hidrólisis mucho menos acusada.

8. Se ha propuesto el siguiente modelo cinético, válido tanto para la hidrólisis con enzima libre como inmovilizada:



Dicho modelo conduce a la siguiente ecuación para la velocidad, que reproduce los resultados experimentales con un error inferior al 10 %.

$$r = \frac{k_2' E_{\text{total}} S}{K_m + S + K_1 S P + K_2 P + K_3 S^2}$$

9. Del ajuste de los resultados al modelo cinético se deduce que en todos los casos la hidrólisis con enzima inmovilizada conduce a valores de r_{max} 25 % inferiores a los correspondientes a la enzima libre y a valores de K_m 20 % superiores.

8. RECOMENDACIONES

A la vista de los resultados obtenidos y con vistas a posteriores investigaciones, se recomienda:

1. Estudiar la utilización de otras posibles fuentes de β -glucosidasa, principalmente bacterias termófilas, lo que permitiría trabajar con temperaturas de hidrólisis más elevadas, es decir a mayores velocidades de reacción, y con mayor protección frente a la contaminación microbiana.
2. Estudiar otros posibles métodos de activación del nylon en polvo, como por ejemplo la hidrólisis ácida controlada o la N-alquilación.
3. Dentro del método de inmovilización seleccionado, utilizar otros agentes aminoactivantes como la 1,6-hexanodiamina o diaminas

aromáticas, que poseen un importante carácter aminante.

4. El uso de otros agentes de entrecruzamiento que permitan un mayor control del nivel de entrecruzamiento, como el ácido tánico, con el fin de aumentar la retención activa y disminuir el obturamiento de los poros por exceso de entrecruzamiento.
5. Dentro del proceso de hidrólisis, trabajar con mayores actividades iniciales, con el fin de obtener el valor de saturación de la enzima.

9.1. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES DE β -GLUCOSIDASA

La actividad β -glucosidasa se determinó mediante el método del p-nitrofenol (Lee, Y.H., 1980).

Este método se basa en la capacidad de la β -glucosidasa para hidrolizar el p-nitrofenil- β -D-glucósido (PNPG) a p-nitrofenol y glucosa. El p-nitrofenol presenta coloración fuertemente amarilla en medio básico por lo que es posible establecer la concentración del mismo en el medio a un tiempo determinado por análisis espectrofotométrico. Dicha concentración nos da una medida de la actividad de la enzima.

9.1.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA EN DISOLUCION:

Se adicionan 1.6 ml de PNPG 5 mM a 2.2 ml de tampón citrato 0.1M. El conjunto se incuba a 50 °C durante 10 min. tras adicionarle 0.2 ml de la

disolución enzimática cuya actividad se desea medir. Pasado este tiempo se para la reacción añadiendo 6 ml de una disolución de hidróxido sódico 0.1 N, valorándose el p-nitrofenol liberado al medio durante la reacción. Para ello se determina la absorbancia de la muestra a 420 nm en un espectrofotómetro KONTRON INSTRUMENTS UVIKON 930, calculándose la concentración de p-nitrofenol por comparación con la recta de calibrado previamente determinada.

Si la actividad de la enzima es elevada se puede modificar el ensayo disminuyendo la cantidad de disolución enzimática adicionada sin variar el volumen del ensayo, diluyendo la disolución enzimática cuya actividad se desea medir o modificando el tiempo de reacción.

Los resultados se expresan en forma de Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml)*.

En todos los casos se realizó un ensayo en blanco utilizando 1.6 ml de PNPG 5 mM incubados en 2.4 ml de tampón citrato 0.1 M pH 4.8, a los que se añaden 6 ml de disolución de hidróxido sódico con el fin de igualar el volumen del ensayo en blanco con los de medida de actividad.

9.1.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA:

El soporte con la enzima inmovilizada se suspende en un volumen conocido de tampón citrato y se mantiene en agitación constante durante la toma de la muestra que se utiliza para la determinación de la actividad enzimática.

El ensayo se realiza de forma semejante al descrito en el apartado anterior para la enzima en disolución.

La actividad se expresa en unidades internacionales por gramo de soporte.

* La Unidad Internacional (UI) de actividad enzimática β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de p-nitrofenol por minuto a 50 °C y pH 4.8 utilizando como sustrato p-nitrofenil- β -D-glucósido.

9.1.3. OBTENCION DE LA RECTA PATRON PARA EL ANALISIS DE ACTIVIDAD DE β -GLUCOSIDASA:

Se prepararon muestras de 4 ml de p-nitrofenol a distintas concentraciones partiendo de una disolución 200 μ M, en tampón citrato 0.1 M. Se incubaron durante 10 min. a 50 °C añadiéndose posteriormente 6 ml de disolución de hidróxido. sódico 0.1 N. Por último se determinaron las absorbancias de las distintas muestras a 420 nm. Cada uno de estos ensayos se realizó por duplicado.

En la tabla 9.1 se presentan los resultados obtenidos en este calibrado. En la figura 9.1 se representan dichos resultados de la forma concentración de PNP frente a la absorbancia a 420 nm, cuyo ajuste mediante mínimos cuadrados, conduce a la siguiente expresión para el cálculo de la concentración de PNP:

$$\mu\text{mol de PNP} = \frac{\text{ABSORBANCIA} - 0.00714}{2.625} \quad [9.1]$$

$$\text{Actividad (UI/ml)} = \frac{\mu\text{mol de PNP}}{\text{tiempo} \times \text{vol. disol. enzimática}} \times \text{Dilución} \quad [9.2]$$

TABLA 9.1
CALIBRADO PARA EL CALCULO DE LA ACTIVIDAD

MUESTRA	μ mol de PNP	ABSORBANCIA
1	0.00	0.0000
2	0.04	0.1137
3	0.08	0.2186
4	0.10	0.2710
5	0.12	0.3234
6	0.16	0.4283
7	0.20	0.5332
8	0.30	0.7954
9	0.40	1.0576
10	0.50	1.3198
11	0.60	1.5820
12	0.70	1.8443
13	0.80	2.1065

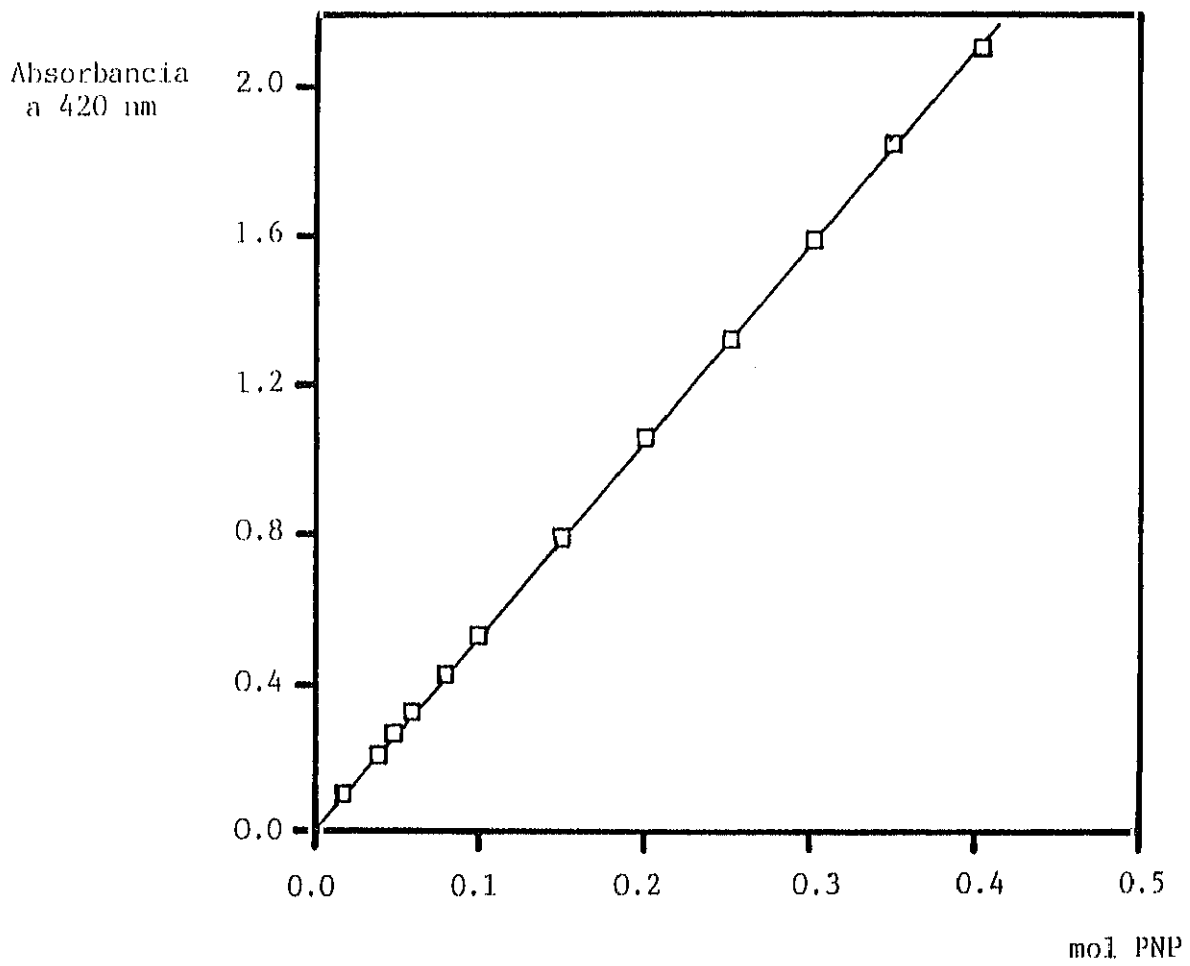


Figura 9.1. Recta de calibrado para el análisis de actividad β -glucosidasa

9.2. ANALISIS DE GLUCOSA Y CELOBIOSA

La medida de la concentración de azúcares (glucosa y celobiosa) se realizó mediante el empleo de un cromatógrafo de líquidos HPLC KONIK KNK 500-A en las siguientes condiciones:

- Disolvente portador: Mezcla 75 % acetonitrilo y 25 % agua destilada y desionizada.
- Agente desgasificador: Helio
- Detector: Índice de refracción
- Columna: S 10 AMINO. Longitud: 25 cm
Diámetro: 4.6 mm
- Caudal de portador: 1.5 ml/min.
- Volumen de muestra: 20 μ l
- Temperatura de trabajo: Temperatura ambiente

En la figura 9.2 se representa un cromatograma en el que se aprecia la separación entre los picos de glucosa y celobiosa.

9.2.1. OBTENCION DE LA CURVA DE CALIBRADO DE GLUCOSA Y CELOBIOSA:

Para llevar a cabo el calibrado del cromatógrafo de líquidos para el análisis de las mezclas de azúcares (glucosa y celobiosa) se prepararon varias disoluciones de glucosa y celobiosa de concentraciones comprendidas dentro del intervalo de las mismas habitual en los experimentos de hidrólisis realizadas en este trabajo, obteniéndose por cromatografía los porcentajes de área que correspondían a las concentraciones de las muestras preparadas.

En la tabla 9.2 se muestran los resultados obtenidos en el calibrado.

Ajustando los resultados obtenidos, que se representan en la figura 9.3, mediante mínimos cuadrados se obtuvieron las ecuaciones de las rectas

de calibrado para ambos compuestos, que resultaron ser:

GLUCOSA:

$$[\text{Glucosa}] (\text{mM}) = \frac{\text{Area glucosa} - 173.20}{12760.84} \quad [9.3]$$

CELOBIOSA:

- Para Areas de celobiosa \leq 200000:

$$[\text{Celobiosa}] (\text{mM}) = \frac{\text{Area celobiosa} + 2052.19}{21284.87} \quad [9.4]$$

- Para Areas de celobiosa \geq 200000:

$$[\text{Celobiosa}] (\text{mM}) = \frac{\text{Area celobiosa} + 79411.57}{24021.23} \quad [9.5]$$

TABLA 9.2
CALIBRADO DEL CROMATOGRAFO

MUESTRA	[CELOBIO.] (mM)	[GLUCOSA] (mM)	A. CELOBIO.	A. GLUCOSA
1	40	0	859295	0
2	35	5	751331	64295
3	30	10	643368	127956
4	25	15	535405	191617
5	20	20	427442	255278
6	15	25	319478	318938
7	10	30	211515	382599
8	8	32	168329	408064
9	4	36	81959	458993
10	2	38	38773	484457
11	0	40	0	509922

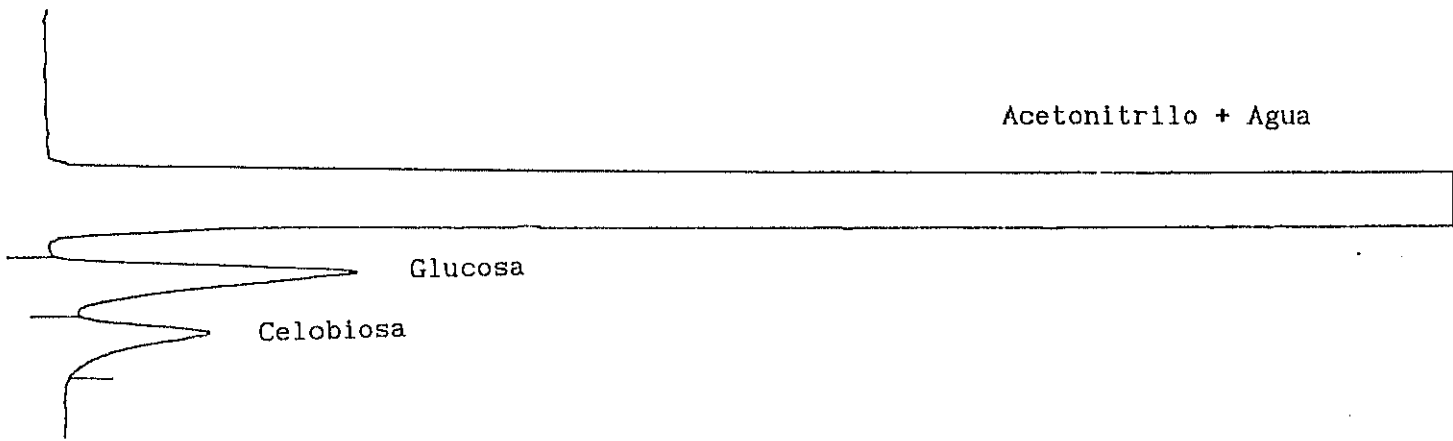


Figura 9.2. Cromatograma de un análisis de glucosa y celobiosa

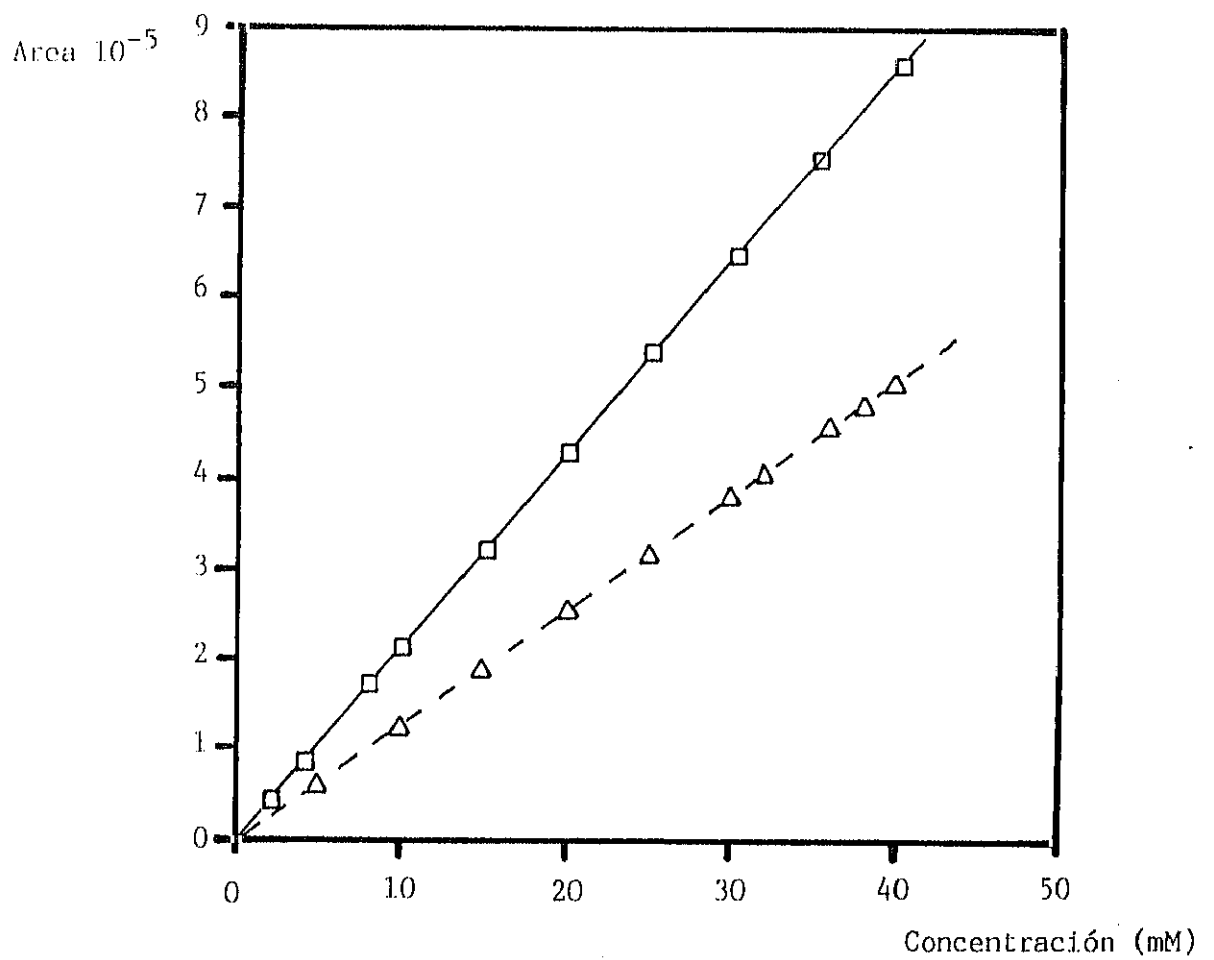


Figura 9.3. Rectas de calibrado para el análisis por cromatografía de:
Δ glucosa; □ celobiosa

9.3. CARACTERIZACION DE LA β -GLUCOSIDASA DE *Penicillium funiculosum*: PERFILES DE pH Y TEMPERATURA

9.3.1. PERFIL DE pH

Con el fin de estudiar la influencia del pH sobre la actividad β -glucosidasa del complejo celulasas de *P. funiculosum*, tanto en su forma libre como inmovilizada sobre nylon en polvo según el método seleccionado previamente, se llevó a cabo el estudio de la variación de su actividad frente al pH, tomando como base el ensayo estandar de actividad, en el que se mantuvieron constantes la temperatura del ensayo, 50 °C, la duración del mismo, 10 minutos, el sustrato, p-nitrofenilglucósido y su concentración, 5 mM, variándose en los diferentes experimentos el pH entre 3 y 8.

En la tabla 9.3 se presentan los resultados obtenidos, tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada.

TABLA 9.3
PERFILES DE pH PARA LA β -GLUCOSIDASA LIBRE E INMOVILIZADA
SOBRE NYLON EN POLVO

pH	% Actividad máxima	
	Enzima libre	Enzima inmovilizada
3.0	3.07	0.01
4.0	4.78	8.18
4.5	100.00	100.00
4.8	90.80	92.50
5.0	86.40	90.77
5.5	67.50	63.56
6.0	46.76	58.29
7.0	31.27	54.58
8.0	29.92	36.93

Los resultados de la tabla 9.3 se representan en la figura 9.4, de la forma % de actividad máxima frente al pH. Se puede observar que el pH óptimo para la β -glucosidasa de *P. funiculosum*, tanto libre como inmovilizada sobre nylon en polvo según el método previamente seleccionado, es 4.5. Se observa también, que en ambos casos, la actividad aumenta de forma muy brusca en el intervalo de pH comprendido entre 4 y 4.5, mientras que, una vez superado el pH óptimo, el descenso de actividad es mucho menos acusado. A la vista de estos resultados se puede concluir que la inmovilización no afecta apreciablemente al perfil de pH de la β -glucosidasa.

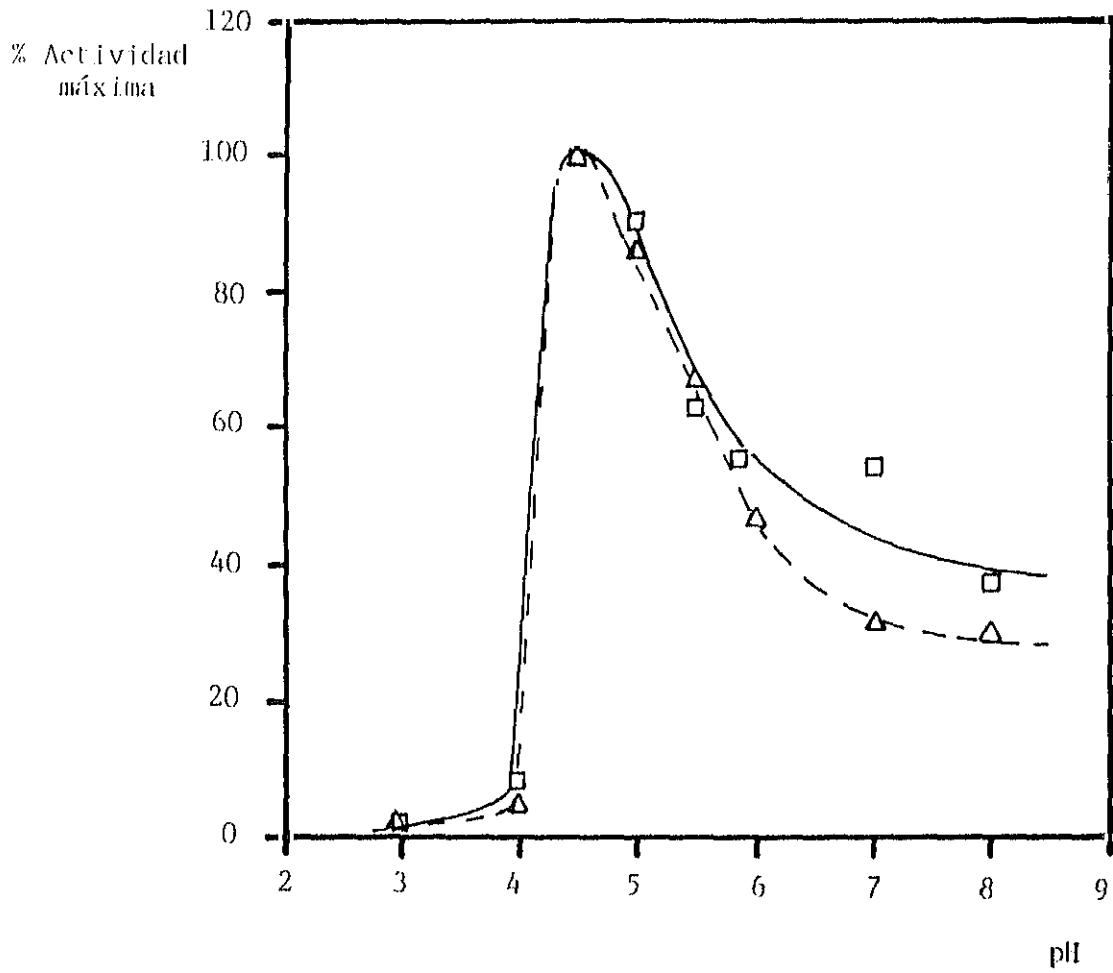


Figura 9.4. Perfil de pH para la β -glucosidasa de *P. funiculosum*:
 Δ libre; \square inmovilizada sobre nylon en polvo.

9.3.2. PERFIL DE TEMPERATURA

Con el fin de estudiar la influencia de la temperatura sobre la actividad β -glucosidasa del complejo celulasas de *P. funiculosum*, tanto en su forma libre como inmovilizada sobre nylon en polvo según el método previamente seleccionado, se llevó a cabo el estudio de la variación de su actividad frente a la temperatura, tomando como base el ensayo estandar de actividad, en el que mantuvieron constantes, el pH del ensayo, 4.8, la duración del mismo, 10 minutos, el sustrato, p-nitrofenilglucósido y su concentración, 5 mM, variándose en los diferentes experimentos la temperatura del medio de reacción entre 40 y 85 °C.

En la tabla 9.4 se presentan los resultados obtenidos, tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada.

TABLA 9.4
PERFILES DE TEMPERATURA PARA LA β -GLUCOSIDASA LIBRE
E INMOVILIZADA SOBRE NYLON EN POLVO

T(°C)	% Actividad máxima	
	Enzima libre	Enzima inmovilizada
40.0	36.10	37.50
50.0	63.00	91.57
55.0	78.73	97.13
60.0	95.31	100.00
65.0	100.00	96.89
70.0	80.19	55.25
75.0	44.34	27.92
80.0	18.46	16.93
85.0	6.80	7.39

En la figura 9.5 se representan los resultados de la tabla 9.4, de la forma % de actividad máxima frente a la temperatura. En esta figura puede observarse que existen importantes diferencias en lo que se refiere al comportamiento de la enzima estudiada frente a la temperatura, según se encuentre libre o inmovilizada. Para la enzima libre, la temperatura óptima es 65 °C, experimentando caídas bruscas de actividad para los restantes valores de temperatura ensayados. Sin embargo, la temperatura óptima para la enzima inmovilizada es 60 °C, pero existe un amplio intervalo de temperaturas (entre 50 y 65 °C) en el que la actividad prácticamente es igual a la máxima, cayendo bruscamente la actividad para los restantes valores de temperatura estudiados. Este hecho conduce a un ensanchamiento del perfil de temperatura, lo que representa un aumento de la estabilidad de la enzima frente a esta variable.

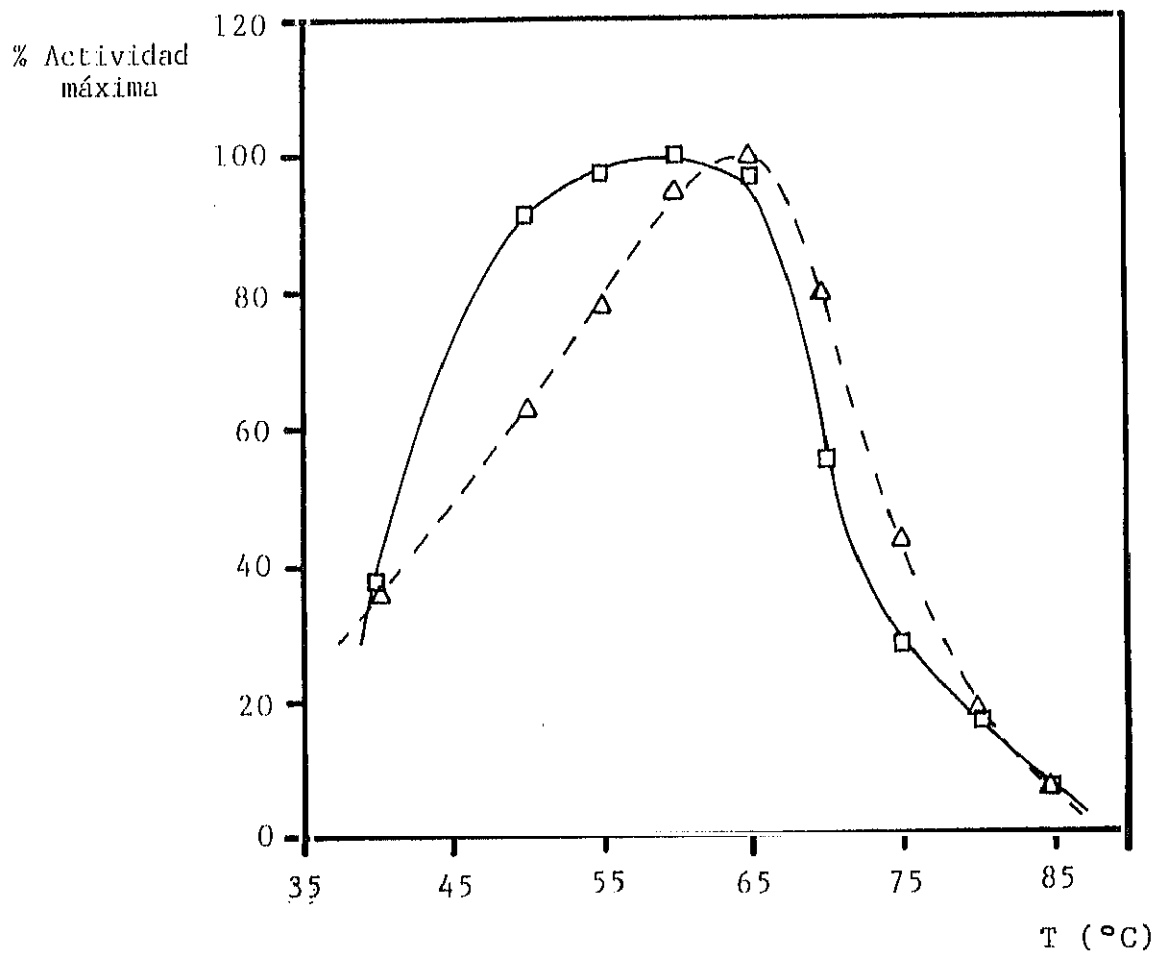


Figura 9.5. Perfil de temperatura para la β -glucosidasa de *P. funiculosum*:
 Δ libre; \square inmovilizada sobre nylon en polvo.

9.4. CALCULO DE UN EXPERIMENTO COMPLETO

A modo de ejemplo, se detallan los cálculos realizados en el experimento reseñado en la tabla 5.56, correspondiente a la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada.

La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

- Inmovilización de la β -glucosidasa:

Soporte : Nylon en polvo

Masa de soporte: 0.5 g

C_s : 40 g/l

O-alquilación:

- Tiempo, t_{TT} : 15 minutos

- Temperatura, T_{TT} : 20 °C

- Conc. de tetrafluoroborato de trietiloxonio, C_{TT} : 12.5%

- Volumen, V_{TT} : 2.5 ml

Amino-activación:

- Tiempo, t_{EDA} : 2 horas

- Temperatura, T_{EDA} : 20 °C

- Concentración de etilendiamina, C_{EDA} : 100%

- Volumen, V_{EDA} : 5 ml

Activación con glutaraldehído:

- Tiempo, t_{GLU} : 15 minutos

- Temperatura, T_{GLU} : 20 °C

- Concentración de glutaraldehído, C_{GLU} : 12.5%

- Volumen, V_{GLU} : 5 ml

Inmovilización:

- Tiempo, t_i : 15 horas

- Temperatura, t_i : 25 °C

- Volumen, V_i : 12.5 ml

- Hidrólisis de celobiosa:

Temperatura, T: 60 °C

Concentración inicial de celobiosa, C_{cel} : 10 mM

Concentración inicial de glucosa, C_{glu} : 10 mM

Concentración del soporte, C_{SE} : 0.06 g/ml

- # *Actividad específica del soporte*, A_I : 17.5 UI/g
- # *Volumen total*, V : 100 ml
- # *Velocidad de Agitación*, N : 200 r.p.m.
- # *pH*: 4.8

En primer lugar, se llevó a cabo la inmovilización de la enzima sobre el nylon en polvo, midiéndose, por el procedimiento descrito en el apartado 9.1 del Apéndice, la actividad β -glucosidasa inmovilizada y la de la disolución inicial.

Las absorbancias medidas resultaron ser:

- Absorbancia disolución inicial: 0.5626
- Absorbancia enzima inmovilizada: 0.3846

y mediante la ecuación de calibrado [9.1] se obtienen los siguientes valores de la actividad:

- Actividad disolución inicial: 1.054 UI/ml
- Actividad enzima inmovilizada: 0.70 UI/ml
- Actividad inmovilizada = $\frac{0.7 \text{ UI/ml}}{0.04 \text{ g/ml}} = 17.5 \text{ UI/g}$

A partir de la definición de retención activa, ecuación [5.1]:

$$\text{- Retención activa} = \frac{17.5 \text{ UI/g} \cdot 0.04 \text{ g/ml}}{1.054 \text{ UI/ml}} \cdot 100 = 66.4 \%$$

Una vez obtenido el complejo enzima-soporte, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de la celobiosa. Para ello, y una vez que la incubadora orbital alcanzó la temperatura adecuada se introdujo un matraz de 250 cm³ con las disoluciones de celobiosa y glucosa en tampón citrato 0.1 M, y el complejo enzima-sustrato preparado, tomando ese momento como tiempo cero.

A los tiempos deseados se tomaron muestras cuyo contenido en glucosa y celobiosa se midió empleando el método descrito en el apartado 9.2 del Apéndice. A modo de ejemplo, los valores de las áreas para un tiempo de hidrólisis de 120 minutos fueron:

- Area glucosa: 221905.6
- Area celobiosa: 132340.5

y empleando las ecuaciones de calibrado [9.3] a [9.5] del apartado 9.2. del Apéndice, se obtienen las concentraciones de ambos compuestos en el medio de reacción:

- Concentración de glucosa: 17.376 mM

- Concentración de celobiosa: 6.314 mM

$$\text{- Conversión} = \frac{[\text{Celobiosa}]_0 - [\text{Celobiosa}]}{[\text{Celobiosa}]_0} = \frac{10 - 6.314}{10} = 0.369$$

10. BIBLIOGRAFIA

-
- Adami, A., Cavazzoni, V., Trezzi, M. y Craveri, R., "Cellobiose hydrolysis by *Trichosporon pullulans* cells immobilized in calcium alginate", *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 391-5 (1988)

 - Alfani, F., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Pezzulo, L., Scardi, V. y Cantarella, M., "Characterization of the β -glucosidase activity associated with immobilized cellulase of *Aspergillus niger*", *Ann. N.Y. Acad. Scien.*, 1987

 - Andreotti, R., "Proceedings Second Bioconversion Symposium III", Delhi, Marzo (1980)

 - Ait, N., Creuzet, N. y Cattanes, N., "Characterization and purification of thermoestable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 537 (1979)

 - Barker, S.A., Duss, S.H., Gray, C.J., Kennedy, J.F., Stacey, M. y Yeo, T.H., " β -D-glucosidase chemically bound to microcrystalline cellulose", *Carbohyd. Res.*, 20, 1-7 (1971)

 - Bernfield, P. y Bieber, R.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 131, 587 (1969)

 - Bisset, B., Ratonamenia, R., Arnaud, A. y Galzy, P., *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 750 (1978 a)

 - Bissett, F. y Sternberg, D., "Immobilization of *Aspergillus* β -glucosidase on chitosan", *Appl. Env. Microbiol.*, Abril, 750-5 (1978 b)

 - Briggs, G.E. y Haldane, J.B.S., "Kinetics of enzyme action", *Biochem. J.*, 19, 338 (1925)

 - Calbin, J. y Witham, G., "Modern Pulp and Paper Making" 3^a ed. Chapman y Hall, Ltd. London (1957)

 - Camacho, F., Bravo, V., Paez, M.P. y Martínez, T., "Hidrólisis de celobiosa con β -1,4-glucosidasa procedente de almendras", *Anal. Quim.*, 83(1), 71-6 (1987)

-
- Cardoso, J.P. y Emery, A.N., "A study of the effect of dispersion on the enzymic conversion of starch to glucose in a small pilot plant fluidized bed reactor", *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 1471-7 (1978)
 - Chibata, I., Tsoa, T. y Sato, T., "Polysaccharide gel beads", *Appl. Microbiol.*, 27, 878 (1979)
 - Eberhart, B.M. y Beck, R.S., "Induction of β -glucosidases in *Neurospora crassa*", *J. Bacteriol.*, 116, 295 (1973)
 - Emert, H.W., Wilke, C.R.; *Chemtech*, 610-4, Octubre (1980)
 - Eriksson, K.E. y Pettersson, B., "Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chyso sporium lignorum* for the breakdown of cellulose", *Eur. J. Biochem.*, 51, 193 (1975)
 - Fadda, M.B., Desi, M.R., Maurici, R., Rinaldi, A. y Satta, G., "Highly efficient solubilization of natural lignocellulosic materials by a commercial cellulase immobilized on various solid supports", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 306-11 (1984)
 - Fernández, J.; "La biomasa como fuente de energía y otros productos para la agricultura y la industria", Congreso sobre biomasa, Lubia, Soria. Julio, 1989.
 - Filipusson, H. y Hornby, W.E., "Preparation of trypsin chemically attached to nylon tubes", *Biochem. J.*, 120, 215 (1970)
 - Fischer, J., Ulbrich, R., Zeinan, R., Flaten, S., Walna, P., Schleif, M., Plushke, V. y Schellenberg, A., "Thermal inactivation of immobilized enzymes: a kinetic study", *J. Solid Phase Biochem.*, 5, 79 (1980)
 - Fogarty, W.V. y Kelly, C.T., "Topics in enzyme and fermentation biotechnology", 3, Wiseman, A. ed., Ellis Horwood, Chichester, (1979)
 - Gianfreda, L., Marrucci, G., Grizzuti, N. y Greco, G., "Acid phosphatase deactivation by a series mechanism", *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 518 (1984)

- Goldstein, L., *Methods Enzymol.*, **44**, 397 (1976)
- Gong, C., Ladish, M.R. y Tsao, G.T., "Cellobiase from *T. viride*: Purification, properties, kinetics and mechanism", *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 959 (1977)
- Gray, C.J. y Livingstone, C.M., "Properties of enzymes immobilized by the diazotized m-diaminobenzene method", *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 349-64 (1977)
- Greco, G., Marrucci, G., Grizzuti, N. y Gianfreda, L., "Series mechanism of enzyme deactivation. Characterization of intermediate forms", *Enzyme Eng.*, (1985)
- Groleau, D. y Forsberg, C.W., "Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacterioides succinogenes*", *Can. J. Microbiol.*, **27**, 517 (1981)
- Hagglund, E. "Chemistry of wood". Academic Press. Inc. Publisher, New York (1951)
- Halwachs, W., " K_m y V_{max} from only one experiment", *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 281-5 (1978)
- Henry, V., *C.R. Acad. Sci. Paris*, **135**, 916 (1902)
- Hornby, W.E. y Morris, D.L., *U.K. Patent 37230/73* (1974)
- Hougen, O.A. y Watson, K.M., "Solid catalyst and reaction rates", *Chemical Process Principles*, **3**, J. Wiley, New York (1947)
- Hong, J., Ladish, M.R., Gong, C., Wankat, P.C. y Tsao, G.T., "Combined product and substrate inhibition equation for cellobiase", *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2779 (1981)
- Instituto de Ingeniería de España, Centro de Estudios de la Energía, Catálogo de Proyectos Nacionales sobre Bioenergía, Diciembre, 1981
- Inglin, M., Feimberg, B.A. y Loewenberg, J.R., *Biochem. J.*, **185**, 515 (1980)

-
- Jain, D. y Ghose, T.K., "Cellobiose hydrolysis using *Pichia etchellsii* cells immobilized in calcium alginate", *Biotechnol. Bioen.*, 26, 340 (1984)

 - Johansson, A.C. y Mosbach, K., "Acrylic copolymers as matrices for the immobilization of enzymes. I. Covalent binding or entrapping of various enzymes to bead-formed acrylic copolymers", *Biochim. Biophys. Acta*, 370(2), 339-47 (1974)

 - Knapper, D., Grethlein, H. y Converse, A., "Hydrolysis of poplar wood as a pretreatment for enzymatic hydrolysis", *Biotech. Bioeng. Symp.*, 11, 67-77 (1981)

 - Kennedy, J.F., Barker, S.A. y Rosevear, A., "Preparation of a water-insoluble trans-2,3-cyclic carbonate derivative of macroporous cellulose and its use as a matrix for enzyme immobilization", *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 2568 (1972)

 - Kennedy, J.F., Barker, S.A. y Humphreys, J.D., "Insoluble complexes of amino-acids peptides and enzymes with metal hydroxides", *J.C.S. Perkin I*, (1976 a)

 - Kennedy, J.F. y Cabral, J.M.S., "Solid-Phase Biochemistry" ed. W.H. Scouten, Wiley, New York, 253-391 (1976 b)

 - Kennedy, J.F. y Cabral, J.M.S., "Immobilised cells and enzymes. A practical approach". Ed. J. Woodward, IRL Press, 19-54 (1983)

 - Kennedy, J.F. y Doyle, C.E., "Active water-insoluble derivatives of D-glucose oxidase and alginic acid, chitin and celite", *Carbohydr. Res.*, 28, 89-92 (1973)

 - Klivbanov, A.M., "Immobilized enzyme and cells as practical catalyst", *Science*, 219, 722-7 (1983)

 - Lachke, A.H., Deshpande, M.V. y Srinivassan, M.C., "Isolation of a non-clerotical mutant of *Sclerotium rolfsii* and its cellulolytic activity", *Folia Microbiol.*, 31(2), 138-42 (1986)

-
- Lachke, A.H., Sadana, J.C. and Patil, R.V., "Endo-1,4- β -glucanases from *Sclerotium rolfsii*. Purification, substrate specificity and mode of action", *Carbohydr. Res.*, 133(2), 297-312 (1982)
 - Ladish, M.R., Gong, C.S. y Tsao, G.T., "Cellobiose hydrolysis by endoglucanase (glucan glucanohydrolase) from *Trichoderma reesei*: kinetics and mechanism", *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1107-26 (1980)
 - Langmuir, I., "Chemical reaction on surfaces", *J. Am. Chem. Soc.*, 38, 2221 (1916)
 - Lee, Y.H., Fan, L.T. y Fan, Y.S., "Kinetics of hydrolysis of insoluble cellulose by cellulase", *Ind. Adv. Biochem. Eng.*, 17, 132 (1980)
 - Leemputten, E.V. y Horisberger, M., *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 997-1003 (1974)
 - Macarron, R., Tesina de Licenciatura, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Biológicas, U.C.M. (1988)
 - Mandels, M. y Reese, T.E., "Induction of cellulase of *Trichoderma reesei* as influenced by C sources and metals", *J. Bacteriol.*, 79, 816 (1960)
 - Mandels, M. y Weber, J., "Cellulases and their application", *Adv. Chem. Ser.*, 95, 391 (1969)
 - Mandels, M. y Andreotti, R.E., "Problems and Challenges in the cellulase to cellulose fermentation", *Proc. Biochem.*, Mayo (1978)
 - Marquardt, D.W., "An algorithm for least squares estimation of non-linear parameters", *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, 11(2), 413 (1963)
 - Martín, C., "Transformación de la biomasa lignocelulósica. Avances y perspectivas de la hidrólisis enzimática de la celulosa", *Química e industria*, 32 (11), 832-5 (1986)

-
- Matteau, P.P. y Saddler, J.N., "Continuous glucose production using encapsulated mycelid-associated β -glucosidase from *Trichoderma* E58", *Biotechnol. Lett.*, **4**(11), 715-20 (1982)
 - Matteau, P.P. y Sadler, J.N., "Glucose production using immobilized mycelial-associated β -glucosidase of *Trichoderma* E58", *Biotechnol. Lett.*, **4**(8), 513-8 (1982)
 - Michaelis, L. y Menten, M.L., "Kinetics of invertase action", *Biochem. Z.*, **49**, 333 (1913)
 - Mitchell, R.W., Hann-Hagerdal, B., Ferchak, J.D. y Pye, F.K., "Characterization of β -1,4-glucosidase activity in *Thermoanaerobacter ethanolicus*", *Biotech. Bioeng. Symp.*, **12**, 461 (1982)
 - Miyairi, S. y Sugiyura, M., "Properties of β -glucosidase immobilized in sericin membrane", *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 303-8 (1978)
 - Miyairi, S., "An enzyme-polymer film prepared with the use of poly(vinylalcohol) bearing photosensitive aromatic azido groups", *Bioph. Acta*, **571**, 374-7 (1979)
 - Montenecourt, B.S. y Eveling, D.E., "*Trichoderma reesei* cellulases", *Tuppi. Am. Proc. Tech. Ass. Pulp. Paper Industry*, Atlanta G.A., 101 (1979)
 - Mori, T., Tosa, T. y Chibata, I., "Preparation and properties of asparaginase entrapped in the lattice polyacrylamide gel", *Biochem. Biophys. Acta*, **321**, 653 (1973)
 - Morris, D.L., Campbell, J. y Hornby, W.E., "A Chemistry for the Immobilization of Enzymes on Nylon", *Biochem. J.*, **147**, 593-603 (1975)
 - Nelson, J.M. y Griffin, E.G., "Influence of certain substances on activity of invertase", *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 1109 (1916)
 - Nisizawa, K., Suzuki, H., Nakayama, M. y Tomita, T., "Partial proteolysis of some cellulose components from *T. viride* and the substrate specificity of the modified products", *J. Biochem.*, **70**, 375 (1971)
 - O'Malley, J.J. y Ulmer, "Thermal stability of glucosa oxidase and its

- admixtures with synthetic polymers", R.W., *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 917-25 (1973)
- Rao, M., Deshpande, V. y Mishra, Ch., "Immobilisation and reuse of β -glucosidase from *Penicillium funiculosum*", *Biotechnol. Lett.*, 5 (2), 75-8 (1983)
- Reiner, J.M., "Behaviour of enzymes systems", 2nd ed., Van Nostrand, New York, 296 (1969)
- Richards, F.M. y Knowles, J.R., *J. Mol. Bio.*, 37, 231 (1968)
- Rudick, M.J. y Elbein, A.D., "Glycoprotein enzymes secreted to *A. fumigatus*. Purification and properties of β -glucosidase", *J. Bacteriol.*, 124, 534 (1975)
- Sadana, A., "The optimum temperature policy for a deactivating moving bed reactor", *Biotechnol. Lett.*, 3, 279-84 (1980)
- Saddler, A.B. y Mohamed, S., "Protein-alginate gel for enzyme immobilisation", *Biotechnol. Lett.*, 4(6), 387-92 (1982)
- Saeman, J.F., "Kinetics of wood hydrolysis and the decomposition of sugars in diluted acids at high temperatures", *Ind. Eng. Chem.*, 37, 43 (1945)
- Saeman, J.F., *Symposium on biomass as a non fossilfuel source*. Honolulu, Abril (1979)
- Sarkar, J.M. y Burns, A.G., "Immobilisation of β -glucosidase and β -D-glucosidase-phenolic complexes", *Biotechnol. Lett.*, 5(9), 519-24 (1983)
- Sternberg, D., *Appl. Microbiol.*, 31, 648 (1976)
- Sternberg, D., Vijayakumar, P. y Reese, E.T., *Can J. Microbiol.*, 23, 139 (1977)
- Sundaram, P.V. y Hornby, W.E., "Preparation and properties of urease

- chemically attached to nylon tube", *FEBS Lett.*, **10**, 325-7 (1970)
- Sundaram, P.V., "New method of coupling proteins to insoluble polymers", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 717-22 (1974)
 - Sundaram, P.V., "Analytical applications for routine use with immobilized enzyme nylon tube reactor", *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 290-8 (1982)
 - Sundstrom, D.W., Klei, H.E., Coughlin, R.W., Biederman, G.J. y Brovwer, C.A., "Enzymic hydrolysis of cellulose to glucose using immobilized β -glucosidase", *Biotech. Bioeng.*, **23**, 473 (1981)
 - Suzuki, S.T., Shiral, S.T., *Biotech. Bioeng.*, **19**, 1189 (1977)
 - Tanford, C., "Protein denaturation", *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121 (1968)
 - Tyn, D.D. y Mandels, M., *Enz. Microbiol. Tech.*, **2**, 91 (1980)
 - Usami, S. y Kuratsu, Y., "Preparation and properties of water-insoluble saccharase immobilized on polyacrylamide gel", *Hakko Kogaku Zasshi*, **51**, 789 (1973)
 - Van Slyke, D.D. y Cullen, G.E., "Action of urease and enzymes in general", *J. Biol. Chem.*, **19**, 141 (1914)
 - Vernardos, D. y Klei, H.E., *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 112 (1980)
 - Wenzl, H.F.J., *The Chemical Technology of wood*, New York, London Academic Press (1970)
 - Wilke, C.R., Yang, R.D., Sociamanna, A.F. y Freitas, R.P., "Raw materials evaluation and process development studies for conversion of biomass to sugars and ethanol", *Biotech. Bioeng. Symp.*, **11**, 67-77 (1981)
 - Woodward, J. y Arnold, S.L., "The inhibition of β -glucosidase activity in *T. reesei* C30 cellulase by derivatives and isomers of glucose", *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1553 (1981)

-
- Woodward, J. y Wiseman, A., "Fungal and other β -D-glucosidases- their properties and applications", *Enzyme Microbiol. Technol.*, 4, 73-9 (1982)
 - Woodward, J. y Wohlpart, D.L.J., "Properties of native and immobilized preparations of β -D-glucosidase from *Aspergillus niger*", *Chem. Technol. Biotechnol.*, 32, 547-52 (1982)
 - Woodward, J. y Zachry, G.S., "Immobilization of cellulose through its carbohydrate side chains, a rationale for its recovery and reuse", *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 245-8 (1982)
 - Woodward, J.R., Yazdi, M.T., Radford, A. y Keen, J.N., "Cellulase production by *Neurospora crassa*: purification and characterisation of cellulolytic enzymes",