

Inmovilización covalente de β -galactosidasa de *A. fonsecaeus* sobre sílice aminada

R. GONZÁLEZ¹, P. MONSAN² y O. ROS³

¹ Instituto Nacional de Endocrinología, La Habana, Cuba

² ERA CNRS 879 INSA, Toulouse, Francia

³ Facultad de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1988

RESUMEN

La β -galactosidasa semipurificada del *A. fonsecaeus* fue inmovilizada covalentemente sobre sílice aminada activada con glutaraldehído. Se estudió la influencia del área específica del soporte, de la concentración de proteínas y del pH de inmovilización sobre los rendimientos del proceso.

Se demostró que el área específica más efectiva fue de 122 m² (aproximadamente 250 Å) y que la concentración de proteínas y el pH óptimo de inmovilización fueron de 1,6 g/l y 8,6 respectivamente.

La enzima inmovilizada tiene una zona de pH óptimo para la hidrólisis del orto-nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG) semejante a la enzima libre. Los resultados obtenidos utilizando la β -galactosidasa purificada de *A. oryzae* son comparables a los resultados obtenidos con los preparados semipurificados de β -galactosidasa de *A. fonsecaeus*.

Este estudio crea las premisas para el empleo de la β -galactosidasa de esta nueva fuente microbiana, en la inmovilización covalente sobre otros soportes utilizables en procesos industriales, para los que las propiedades de esta enzima sean relevantes.

SUMMARY

Semi-purified β -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus* was covalently immobilized on aminated silica, activated with glutaraldehyde.

We studied the influence of the support's specific area, of protein concentration and of the pH of immobilization on the yield of this process. The most effective specific area was 122 m²/g (approximately 20 Å), while the optimal protein concentration and the optimal pH were 1,6 g/l and 8,6, respectively.

The immobilized enzyme has an optimal pH zone for the hydrolysis of ONPG, similar to that of the free enzyme. The results obtained using purified β -galactosidase from *A. oryzae* are comparable to those obtained with a semipurified preparation of the enzyme from *A. fonsecaeus*.

The present study lays the premises for the use of β -galactosidase from this new microbial source in the covalent immobilization of the enzyme on other supports employed in industrial processes for which the properties of this enzyme may be relevant.

INTRODUCCION

Las β -galactosidasas fúngicas han sido empleadas para la hidrólisis de la lactosa del suero lácteo ácido, con vistas a su utilización en la alimentación humana y animal (Zadow, 1984). Su aplicación industrial ha estado, sin embargo, limitada por los costos del proceso de hidrólisis con la enzima soluble, y es por ello que se han diseñado numerosos sistemas de β -galactosidasa inmovilizada sobre diversos soportes, lo cual, además de reducir el costo, también garantiza el control más exacto de la reacción catalítica (Hultin, 1983).

Las principales aplicaciones industriales de la β -galactosidasa implican la utilización de la enzima de *A. niger* inmovilizada covalentemente sobre sílice porosa (Baret, 1981). La enzima de *A. oryzae* también ha sido frecuentemente utilizada para estos fines (Hirohara et al., 1982).

La sílice porosa ha sido ensayada como soporte para la fijación de diversidad de enzimas y su capacidad de inmovilización covalente por activación con glutaraldehído fue estudiada en detalle por Monsan (1977).

La β -galactosidasa de *A. fonsecaeus* presenta características cinéticas que la hacen particularmente factible para su aplicación industrial sobre suero lácteo (González et al., 1987).

En este trabajo hemos estudiado las posibilidades de inmovilización de la β -galactosidasa de esta nueva fuente microbiana sobre sílice aminada, a partir de preparados semipurificados de la enzima, lo cual reduce los costos de los procesos industriales. Los datos obtenidos de la inmovilización covalente sobre el soporte activado con glutaraldehído pueden ser, de hecho, extrapolados a otros sistemas más asequibles y menos costosos, que abran las posibilidades de la aplicación de esta enzima en la industria láctea.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Soporte: Se utilizaron partículas de sílice porosa aminada (Spherosil X-OB-075 NH) de diferentes áreas específicas (6, 24, 122, 190 y 450 m²/g), con un diámetro promedio de 100-200 μ m.

Preparado enzimático: Los preparados semipurificados de β -galactosidasa de *A. fonsecaeus*, se obtuvieron a partir de extractos acuosos de los cultivos de este microorganismo en medio salvado de trigo-CIH.

Metodos

Activación del soporte: Se realizó según el método descrito por Monsan (1977). Cien miligramos de cada tipo de Spherosil fueron activados con 20 ml de solución de glutaraldehído al 1,25% en buffer pirofosfato de sodio 0,05 M a pH 8,6. La solución de glutaraldehído se preparó a partir de solución acuosa del reactivo comercial al 25% y el pH se ajustó antes del uso. Las mezclas se agitaron en mezclador bidireccional durante dos horas a 25°C. Después de decantar, las partículas se lavaron varias veces con 20 ml de buffer pirofosfato para eliminar el exceso de glutaraldehído. Posteriormente el soporte activado se lavó tres veces con 20 ml del buffer de pH correspondiente a los respectivos experimentos de inmovilización enzimática.

Inmovilización: A las partículas de Spherosil activadas con glutaraldehído se le adicionaron 20 ml del preparado enzimático. El tiempo de fijación fue de 17 horas a 4°C con agitación constante en mezclador bidireccional. El complejo enzima-soporte se lavó varias veces con el buffer de fijación y con NaCl 1M, hasta que se comprobó la ausencia de proteínas en las aguas de lavado. La enzima inmovilizada se conservó a 4°C en buffer acetato 0,1 M; pH 4,5.

Determinación de actividad enzimática y de proteínas totales: La actividad enzimática de la enzima soluble se determinó utilizando orto-nitro fenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) por el método modificado por nosotros (González et al., 1987).

Para el complejo enzima-soporte, la determinación se realizó en tubos de ensayo adicionando solución de ONPG 50 mM en buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 3; la mezcla se agitó durante 10 min a 37°C.

La cantidad de proteínas totales de los preparados enzimáticos y de los sobrenadantes de la inmovilización se determinó por el método de Lowry *et al.*, 1951).

Influencia del tipo de sílice aminada: El preparado de β -galactosidasa utilizado para la inmovilización sobre los diferentes tipos de sílice, presentaba 174,5 U/ml y 13,4 U/mg, de actividad enzimática y específica, respectivamente. Con las partículas de sílice de 122 m²/g se estableció la comparación de la inmovilización de la β -galactosidasa de *A. oryzae* (Lab. Miles, RFA) a partir de soluciones con 2 000 U/ml y 48,2 U/mg de actividad enzimática y específica, respectivamente.

Influencia de la concentración de proteínas: Se utilizaron partículas e sílice aminada de 122 m²/g y preparados de β -galactosidasa con concentraciones proteicas entre 0,4-4,0 g/l, resultantes de un preparado inicial de 39,2 U/ml y 9,6 U/mg de actividad enzimática y específica, respectivamente.

Influencia del pH de inmovilización: El efecto del pH sobre la inmovilización de la β -galactosidasa fue estudiado utilizando buffers pirofosfato de sodio 0,05 M con pH variable entre 4 y 10. El preparado enzimático empleado contenía 15,7 U/ml y 9,6 U/mg de actividad enzimática y específica, respectivamente, lo que corresponde a 1,6 g/l de proteína; la inmovilización se realizó sobre sílice aminada de 122 m²/g.

Determinación del pH óptimo de la β -galactosidasa inmovilizada: Se estudió la hidrólisis del ONPG a diferente pH, utilizando complejos de enzima inmovilizada sobre sílice de 122 m²/g. El sustrato fue disuelto en buffer citrato fosfato 0,1 M de pH variable entre 2,6 y 7.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del efecto del área específica de la sílice porosa aminada sobre la inmovilización covalente de la β -galactosidasa se muestran en la tabla 1.

Tabla 1
EFECTO DEL AREA ESPECIFICA DEL SPHEROSIL SOBRE LA INMOVILIZACION COVALENTE DE LA β -GALACTOSIDASA

Spherosil área específica (m/g)	Proteína inmovilizada mg/g sílice	Enzima inmovilizada activa (%)	Actividad U/g	Actividad específica U/mg	Rendimiento % Actividad específica
6	34,3	0,06	5,3	0,15	1,1
24	49,8	0,63	55,6	1,26	8,2
122	55,8	0,84	74,6	1,32	9,9
190	49,7	0,10	8,9	0,20	1,2
450	43,0	0,06	5,6	0,18	1,0

Los mayores porcentajes de fijación proteica y de enzima inmovilizada activa se obtuvieron con el empleo de la sílice de 122 m²/g. Con este tipo de soporte también se alcanzó la máxima actividad específica de la enzima inmovilizada. A partir de estos resultados los estudios posteriores se realizaron con este tipo de Spherosil.

La eficiencia de la inmovilización covalente de la β -galactosidasa fue baja cuando se utilizó un preparado enzimático de actividad específica de 13,4 U/mg que contenía 3,2 g de proteína/litro.

En el sobrenadante correspondiente a la inmovilización sobre Spherosil de 122 m²/g, se recuperó el 81,3% de la actividad total ofrecida a los 100 mg del soporte. Si se considera que los procesos de desnaturalización proteica fueron mínimos, se obtiene que aproximadamente el 19% de la enzima fue fijada sobre el soporte, de la cual el 4,4% (0,85% del total) mostró actividad catalítica sobre ONPG.

El rendimiento de la reacción de inmovilización en función de la actividad específica varió entre 0,96 y 9,9%, para partículas de 450 y 122 m²/g, respectivamente.

El área específica del soporte es un factor importante que influye sobre la eficiencia de la inmovilización enzimática; la densidad de los grupos amino del Spherosil está relacionada directamente con el área específica, y por tanto, con la cantidad de glutaraldehído enlazado al soporte (Monsan, 1977). Cuando la β -galactosidasa se une al Spherosil activado, el parámetro más importante no es la densidad de los grupos reactivos, expresados por la cantidad de glutaraldehído presente después de la activación, sino la porosidad del soporte.

De acuerdo con nuestros resultados, existe un área específica óptima de alrededor de 120 m²/g; esto corresponde a un tamaño de poro de las partículas de Spherosil aproximadamente de 250 Å. De acuerdo con la experiencia de Messing (1975), el área específica óptima se relaciona con la medida del poro que duplica la longitud del eje mayor de la molécula de enzima, por lo que las mayores áreas específicas de la Spherosil amina indican un tamaño de poro que no es suficiente para permitir la penetración en la enzima; en nuestro caso sólo el área externa del soporte se encuentra asequible para la inmovilización. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Monsan (1978), sobre la inmovilización de tripsina en este soporte.

La sílice aminada ha sido utilizada como soporte para la inmovilización de β -galactosidasa purificada de diversos microorganismos, especialmente del *A. niger* (Pitcher, 1975; Dohan et al., 1980) y del *A. oryzae* (Durand y Monsan, 1982) con fines de aplicación en tratamiento de suero lácteo.

Como se muestra en la tabla 2, al comparar el proceso de inmovilización de la β -galactosidasa del *A. oryzae* sobre sílice aminada de 122 m²/g, se observó que el rendimiento de la inmovilización (1,56%) fue superior al obtenido en el proceso cuando se empleó la enzima de *A. fonsecaeus* (0,85%).

Tabla 2
COMPARACION DE LA INMOVILIZACION COVALENTE DE β -GALACTOSIDASA
DE *A. ORYZAE* Y *A. FONSECAEUS* SOBRE SPHEROSIL DE 122 m²/g

	Unidades totales ofrecidas	Actividad especifica (U/mg)	Actividad enzima/soporte (U/g)	Proteína (g/l)	Rendimiento % Actividad total
<i>A. oryzae</i>	2760,0	82,0	431,0	8,30	1,56
<i>A. fonsecaeus</i>	872,5	13,4	74,6	3,23	0,85

Lógicamente, al utilizar preparados enzimáticos de mayor pureza y mayor actividad catalítica, como la de la enzima del *A. oryzae*, se deben esperar resultados superiores en cuanto a la actividad enzimática total del complejo enzima-soporte.

Sin embargo, las relaciones de actividad total ofrecida y actividad específica de ambos preparados enzimáticos (3,16 y 3,59, respectivamente), no se correlacionan linealmente con la razón de los rendimientos del proceso de inmovilización covalente sobre Spherosil (1,83). Por tanto, es de esperar que la utilización de preparados enzimáticos más activos y puros de la β -galactosidasa de *A. fonsecaeus* produzca mayores rendimientos del proceso de inmovilización que los obtenidos con la enzima de *A. oryzae* de similares características.

Los resultados obtenidos indican que la competencia inespecífica de las proteínas contaminantes para formar enlaces covalentes con los derivados del poliglutaraldehído presentes en la sílice activada es menor que la que ocurre con al enzima de *A. oryzae*; en este último caso debe considerarse también la interacción enzima-enzima, ya que el preparado de aquella contenía 2,8 veces más proteína que el del *A. fonsecaeus*.

En la tabla 3 se muestran los datos obtenidos en la inmovilización sobre sílice aminada utilizando preparados de β -galactosidasa de *A. fonsecaeus* de diferentes concentraciones proteicas.

Tabla 3

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS SOBRE LA INMOVILIZACION COVALENTE DE β -GALACTOSIDASA DEL *A. FONSECAEUS* SOBRE SPHEROSIL

Concentración proteínas (g/l)	Actividad enzima/soporte (U/g)	Proteína residuales sobrenadantes (%)	Actividad específica enzima inmovilizada (U/mg)	Rendimiento inmovilización actividad específica (%)
0,40	54,06	50,00	1,32	13,7
0,81	69,53	72,05	1,52	15,8
1,35	43,54	79,55	0,77	8,1
1,62	87,80	83,08	1,59	16,4
2,03	23,76	87,99	0,48	4,9
4,07	20,75	97,40	0,98	10,0

La actividad máxima del complejo enzima-soporte (87,8 U/g) se obtuvo al emplear 1,6 g de proteína. En esta concentración se alcanzaron también los mayores resultados de actividad específica y rendimiento de inmovilización en función de esta.

La concentración inicial de proteínas y la actividad enzimática ofrecida para la inmovilización tienen un efecto importante sobre la eficacia del acoplamiento β -galactosidasa-Spherosil. A bajas concentraciones proteicas (0,4-1,6 g/l) se alcanzaron los rendimientos superiores del proceso, y la enzima fijada fue más activa. Como se observa, las concentraciones superiores produjeron un marcado descenso de la actividad catalítica y específica de la enzima inmovilizada, y además, menores rendimientos.

En nuestra experiencia se muestra claramente que la enzima puede ser inmovilizada en formas inactivas, sobre todo, cuando se trabaja con preparados no totalmente purificados.

Este fenómeno ha sido reportado por otros autores. Monsan (1978), demostró que la variación de la concentración inicial de tripsina (0,1-10 g/l) no produce un rendimiento constante de la inmovilización sobre Spherosil. El valor máximo se obtuvo al utilizar la concentración de 2 g/l y la actividad de los derivados enzima-soporte decreció a altas concentraciones proteicas. Aunque no se alcanzó la saturación del soporte, la actividad de los derivados de la tripsina no se relacionó directamente con el contenido enzimático del Spherosil.

La fijación covalente de la β -galactosidasa de *A. fonsecaeus* sobre el mismo soporte, realizada por nosotros, mostró resultados semejantes. Por tanto, es absolutamente innecesario tratar de acoplar la máxima cantidad de enzima sobre la sílice aminada, en virtud de que este parámetro no se corresponde con la mayor actividad catalítica del derivado inmovilizado. El alto costo de las enzimas le confiere un gran valor a este resultado.

La formación de los enlaces mínimos entre los residuos de poliglutaraldehído y la lisina, determina la fijación de las moléculas proteicas sobre este soporte activado; esta reacción no es específica en lo absoluto para el acople de la β -galactosidasa y puede ocurrir con otras proteínas que contengan este aminoácido.

El decremento de la actividad observada puede ser atribuido a impedimentos estéricos y a las interacciones enzima-enzima y enzima-proteína contaminante. Varios autores han reportado el descenso de la eficiencia de la inmovilización cuando se incrementa la cantidad inicial de la enzima, pero la concentración óptima no se señala en sus resultados (Ford y Pitcher, 1975).

El valor óptimo para la β -galactosidasa (1,6 g/l) fue utilizado en los experimentos posteriores sobre la inmovilización de esta enzima en sílice aminada.

Los resultados del efecto del pH de inmovilización en la eficiencia de la fijación covalente de la β -galactosidasa sobre sílice aminada se muestran en la figura 1.

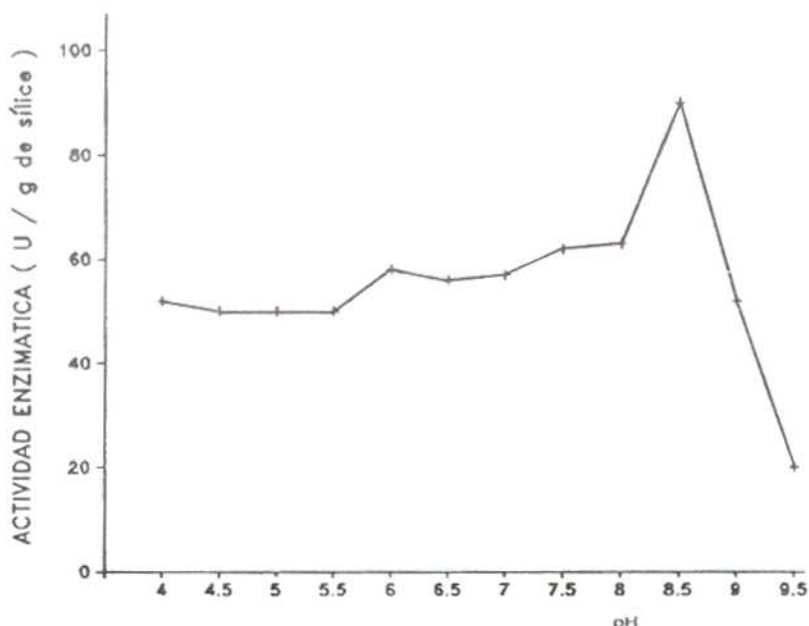


FIG. 1. Efecto del pH en la inmovilización de la β -galactosidasa de *A. fonscaeus* sobre Spherosil.

La zona de pH comprendida entre 4 y 8, produjo resultados similares en cuanto a la cantidad de enzima inmovilizada activa. Valores superiores incrementan el acoplamiento enzima-soporte, hasta llegar al máximo a pH 8,6.

Los pH extremadamente alcalinos provocaron la disminución de la cantidad de enzima inmovilizada. A pH 10 la actividad enzimática es nula. Este resultado puede ser atribuido a modificaciones estructurales de la β -galactosidasa, que impliquen menor posibilidad de fijación y actividad catalítica menor.

El pH óptimo de inmovilización (8,6) aparece como un compromiso entre el establecimiento del enlace glutaraldehído-enzima y la desnaturalización de la β -galactosidasa, la cual es inestable a pH superiores a 6 (González et al., 1987).

La curva obtenida es similar a las reportadas para otras enzimas. La variación del pH de inmovilización tiene un pequeño efecto sobre la fijación de glucosa oxidasa en Spherosil amina, activado con glutaraldehído. Este efecto es particularmente despreciable a pH mayor de 6 (Cailleau, 1974). Sin embargo, según Monsan (1978), la tripsina produjo resultados diferentes; mostró la mayor actividad cuando la fijación covalente se realizó a pH 8,6. Los valores superiores de pH provocaron disminución notable de la eficiencia del acoplamiento tripsina-soporte y los pH comprendidos entre 1 y 3 resultaron inadecuados para el proceso. La tripsina es particularmente estable en soluciones de pH 3 (Walsh, 1970); así mismo, la β -galactosidasa del *A. fonscaeus* es estable en medio ácido y el comportamiento de ambas enzimas es semejante en cuanto a la inmovilización sobre Spherosil a pH 8,6.

Los resultados de la influencia del pH de reacción sobre la actividad catalítica de la β -galactosidasa inmovilizada utilizando ONPG como sustrato, se muestran en la figura 2.

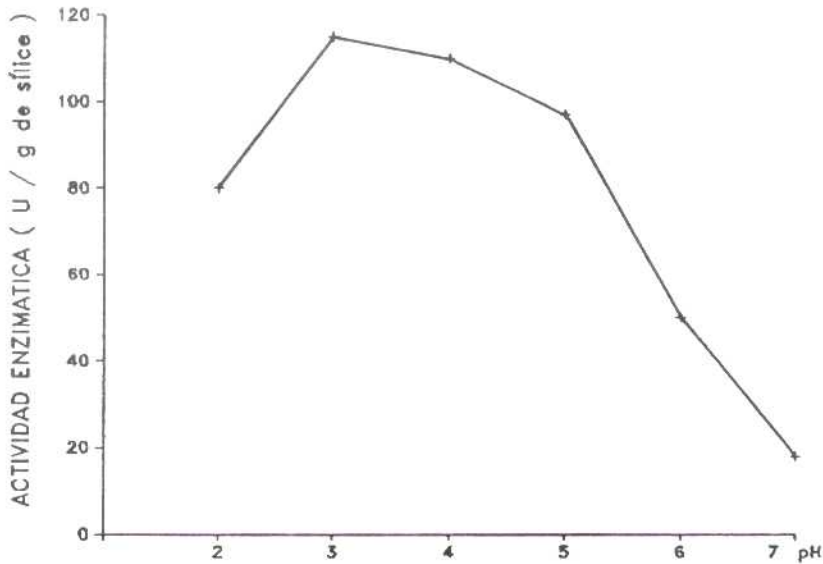


FIG. 2. Efecto del pH sobre la actividad de la β -galactosidasa del *A. fonsecaeus* inmovilizada sobre Spherosil. El pH óptimo de la enzima libre se encuentra en la zona de 3 y 4,6 (González *et al.*, 1987), y el de la enzima inmovilizada en la zona de 3 y 4. Esto indica que la inmovilización covalente a través del glutaraldehído de la β -galactosidasa sobre Spherosil no influye significativamente sobre este parámetro.

En el rango de pH superiores a 5 se observa un decremento significativo de la actividad enzimática. La enzima inmovilizada sólo retuvo el 15% de la actividad máxima a pH 7. Si la zona de pH óptimo se hubiera desplazado hacia valores más básicos, se obtendrían ventajas en la aplicación de la enzima sobre suero dulce o leche.

Durante los procesos de inmovilización covalente, a menudo se observa un pequeño corrimiento hacia zonas más ácidas del pH óptimo de la enzima libre, aunque no existe un patrón general previsible para esta conducta. Según Dohan *et al.* (1980) la lactasa de *A. niger* covalentemente unida a la sílice porosa tuvo un pH óptimo entre 3,2 y 4,3 y la enzima libre presentó la mayor actividad catalítica en la zona de pH 4 a 4,5. Esta misma enzima mostró un corrimiento de la zona de pH óptimo cuando fue inmovilizada sobre sílice y óxido de titanio (Pitcher y Ford, 1979).

El hecho puede ser explicado por las modificaciones intrínsecas en la estructura de la enzima fijada sobre el soporte (Monsan, 1978).

CONCLUSIONES

La β -galactosidasa del *A. fonsecaeus* puede ser inmovilizada covalentemente sobre sílice aminada, a partir de preparados semipurificados que contengan 1,6 g de proteína/l a pH 8,6 con resultados comparables a los obtenidos con la enzima purificada del *A. oryzae*.

La β -galactosidasa del *A. fonsecaeus* inmovilizada covalentemente sobre sílice aminada no cambia la zona de pH óptimo de hidrólisis de ONPG con respecto a la enzima libre.

La β -galactosidasa del *A. fonsecaeus* presenta características interesantes para ser inmovilizada covalentemente sobre otros soportes, con vistas a su aplicación en la industria láctea.

REFERENCIAS

- BARET, J. L. (1981). *Les enzymes immobilisées dans l'industrie Lactière*. Techn. Lait 958: 33.
- CAILLEAU, M. (1974). Doct. Ing. Thesis, Univ. Paul Sabatier, Toulouse Nr. 416.
- DURAND, G. y MONSAN, P. (1982). *Les enzymes: production et utilisation industrielles*. Gauthiers Villars, París.
- DOHAN, L. A.; J. L. BARET; S. PAIN y P. DELANDE (1980). *Lactose hydrolysis by immobilized lactase: semi industrial experience*. Enz. Eng. 5: 279.
- FORD, J. R. y W. H. PITCHER (1975). "Enzyme engineering case study: immobilized lactase", en: *Immobilized enzyme technology*. Editores H. H. Weetall y A. Susuki, pp. 17-25, Plenum Press, New York.
- GONZALEZ, R. R. y P. MONSAN (1987). *Production and purification of β -galactosidase from A. fonsecaeus*. (En preparación).
- HIROHARA, H.; H. YAMAMOTO; E. KAWANO y T. NAGASE (1982). "Continuous hydrolysis of lactose in skim milk and acid whey by immobilized lactase of *A. oryzae*", en: *Enzyme Engineering*, 6: 295-297. Editores I. Chibata, S. Fukui y L. Wingard, Plenum Press, New York and London.
- HULTIN, H. (1983). *Current and potential uses of immobilized enzymes*. Food Techn., pp. 66-82.
- LOWRY, D. H.; N. J. ROSEBROUGH; A. L. FARR y R. J. RANDALL (1951). *Protein measurement with Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 139: 265.
- MARCONI, W.; F. CECERE, F. MURISI; G. DELLA PENA y B. RAPPOLI (1973). J. Antibiot. 26: 228-232.
- MESSING, R. A. (1975). *Immobilized enzymes for industrial reactors*. Academic Press, New York.
- MONSAN, P. (1977). *Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization*. J. Molec. Catalysis, 3: 371.
- MONSAN, P. (1978). *Influence of conditions of trypsin immobilization onto Spherosil on coupling efficiency*. Eur. J. Appl. Microb. Biotech. 5: 1-11.
- PITCHER, W. H. (1975). *Hydrolysis of whey by immobilized lactase*. Am. Dairy Rev. 37: 9.
- PITCHER, H. W. y J. R. FORD (1979). "Development of an adsorbed lactase immobilized enzyme system", en: *Enzyme engineering*, 3: 473-486. Inc. Publ. New York.
- WALSH, K. A. (1970). *Trypsinogens and trypsins of various species*. Academic Press, New York, 19: 41-63.
- ZABOW, J. G. (1984). *Lactose. Properties and uses*. Symposium: "Production and utilization of whey and whey components". J. Dairy Sci. 67: 2654-2679.