

UNIVERSIDAD DE MURCIA



**Departamento de Tecnología de Alimentos,
Nutrición y Bromatología**

**INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN ÉSTERES
CINÁMICOS DE CARBOHIDRATOS:
NUEVOS SOPORTES FOTOENTRECRUZABLES**

*Memoria presentada para aspirar al
grado de Doctor en Ciencias Químicas*

Francisco Rojas Melgarejo

Marzo-2002

Quisiera expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de alguna manera han sido partícipes en el desarrollo de la presente Memoria:

A los **Dres. Pedro Antonio García Ruiz y José Neptuno Rodríguez López** por sus constantes enseñanzas, continuo estímulo e ilimitada dedicación en la dirección y elaboración de esta Tesis Doctoral.

Quisiera desear un especial agradecimiento al **Dr. Pedro Antonio García Ruiz**, por la lealtad, confianza en nuestro trabajo, esfuerzo y amistad demostrada a lo largo de tantos años de intenso trabajo salpicados de momentos estériles y llenos de incertidumbre. Un agradecimiento por los innumerables consejos que como Profesor, compañero e indiscutiblemente como amigo he tenido la suerte de recibir y no tendré la posibilidad de devolver en su justa medida. Del mismo modo agradecerle la extrema generosidad mostrada para disponer de cuantos medios materiales, económicos y humanos fueron necesarios para posibilitar la realización de los trabajos desarrollados en la presente Memoria en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Murcia.

Al **Dr. Fulgencio Marín Iniesta** por su colaboración en algunas partes de esta Memoria, así como a su contribución al inicio de esta Tesis y a su labor como Tutor.

Al **Dr. Francisco García Cánovas** por transmitirme la ilusión de la labor investigadora a lo largo de los años que, durante la carrera en la especialidad de Bioquímica, pude disfrutar de sus enseñanzas, y por su desinterés en resolverme cuantas dudas le he planteado a lo largo de la realización de este trabajo.

Al **Dr. Francisco Torrella Mateu** por su entera disponibilidad e importante contribución en la obtención de los datos de microscopía óptica.

Al **Dr. José Tudela Serrano** por su total disponibilidad en todas aquellas cuestiones para las que fue necesaria su colaboración.

A aquellos que en algún momento de este largo periplo han sido compañeros de batallas: A Silvia, Mari Paz, Miguel, Eduardo, Juan Antonio, M^a Teresa, Roberto, y, posiblemente, a otros que sin ser menos importantes olvidé.

A mis amigos de casi siempre, que han contribuido a forjar mi carácter y aprecio por lo bien hecho: A Antonio Munuera, Antonio Piñera, Juan Quijada y Rafael.

Mención especial hecha a, probablemente, la ausencia más dolorosa en el día de la lectura de esta Tesis: A César Gómez Vázquez.

A mis padres, Antonio y Gloria, por tantas pequeñas y grandes razones que aunque obvias son difíciles de expresar.

A mis hermanos Antoñín, Pepe, Mari Carmen y Gloria, porque todos ellos han protagonizado etapas importantes y entrañables de mi vida y continuarán haciéndolo.

A mi abuela María, siempre en mi memoria.

A mi segunda familia, por hacer que los días discurrieran fácilmente en momentos cruciales y decisivos de mi vida. Con profundo cariño a Ángel y Mari, y a unos encantadores hijos y hermanos, Ángel, Inma, Esther y Alejandra, sin olvidar a los abuelos Julián, María y Ángel.

A Ruth,.....

....., a tanto y tanto tiempo desatendido; un precio demasiado alto.

"El lenguaje con el que se expresa y nos envuelve la Naturaleza es sencillo y silencioso. Los investigadores, continuamente, se afanan en hablarle y preguntar para aclarar nuestras interminables dudas y desconocimiento, pero sólo unos pocos son los privilegiados tocados por la magia de sus respuestas. Cualquier reconocimiento humano es minúsculo e imperceptible al compararse con la sensación de escuchar sus sigilosas pistas. Sensaciones anónimas y sin aplausos experimentadas desde la soledad de un laboratorio, tan anónimas y plenas como la mirada y sonrisas de un inocente. La mayoría de los agraciados son desconocidos: ¿Quizás yo?. Sólo ella lo sabe".

CONTENIDO

	<u>Pág.</u>
ÍNDICE.....	III
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Los fotopolímeros entrecruzables como soportes.....	1
1.2 Inmovilización de enzimas.....	33
1.3 Objetivos.....	100
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
2.1 Diseño experimental.....	101
2.2 Soportes de inmovilización.....	102
2.3 Aplicación de los soportes.....	106
2.4 Condiciones de inmovilización.....	110
2.5 Procedimientos de lavado.....	113
2.6 Técnicas analíticas.....	120
2.7 Análisis de regresión.....	130
2.8 Análisis de datos experimentales.....	132
3 SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN.....	133
3.1 Soportes obtenidos.....	133
3.2 Aplicación de soportes para la inmovilización de HRPc.....	139
3.3 Aplicación de soportes para la inmovilización de β -galactosidasa.....	171
3.4 Procedimientos de lavado para HRPc inmovilizada.....	173
3.5 Procedimientos de lavado para β -galactosidasa inmovilizada.....	186
4 INMOVILIZACIÓN DE HRPc.....	189
4.1 Condiciones de inmovilización de HRPc.....	189
4.2 Actividad en diferentes soportes.....	197
4.3 Ensayos de inactivación.....	200
4.4 Cálculo de las constantes cinéticas.....	222
4.5 Actividad enzimática residual debida a interacciones no hidrofóbicas.....	228
5 INMOVILIZACIÓN DE β-GALACTOSIDASA.....	243
5.1 Condiciones de inmovilización de β -galactosidasa.....	243

5.2 Efecto del tipo de sólido de inmovilización.....	251
5.3 Estabilidad en el almacenado.....	254
5.4 Estabilidad frente a la reutilización.....	271
6 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	275
6.1 Antecedentes.....	275
6.2 Ensayos previos.....	275
6.3 Tratamiento de aguas residuales.....	279
CONCLUSIONES.....	289
BIBLIOGRAFÍA.....	293
APÉNDICE.....	309

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LOS FOTOPOLÍMEROS ENTRECruzABLES COMO SOPORTES.....	1
1.1.1 Introducción.....	1
1.1.2 Fotopolimerización.....	3
1.1.2.1 Fotopolimerización de cuatro centros.....	4
1.1.2.2 Ventajas sobre otros métodos de polimerización.....	5
1.1.3 Polímeros fotoentrecruzables.....	6
1.1.3.1 Fotoentrecruzamiento por cromóforos excitados.....	6
1.1.3.2 Entrecruzamiento por especies reactivas fotogeneradas.....	16
1.1.3.3 Resinas basadas en cambios de polaridad fotoinducida.....	22
1.1.4 Mecanismos de fotoentrecruzamiento.....	23
1.1.4.1 Química-Física del entrecruzamiento.....	26
1.1.5 Aplicaciones.....	28
1.1.6 Ventajas en la inmovilización.....	32
1.2 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.....	33
1.2.1 Introducción.....	33
1.2.2 Métodos de inmovilización de enzimas.....	38
1.2.2.1 Método de enlace a un soporte.....	39
1.2.2.2 Método de entrecruzamiento.....	62
1.2.2.3 Método de atrapamiento.....	64
1.2.2.4 Otros métodos de inmovilización.....	69
1.2.2.5 Conclusión.....	71
1.2.3 Propiedades de enzimas inmovilizadas.....	74
1.2.3.1 Especificidad por el sustrato.....	74
1.2.3.2 pH óptimo de enzimas inmovilizadas.....	75
1.2.3.3 Temperatura óptima de enzimas inmovilizadas.....	77
1.2.3.4 Constantes cinéticas de enzimas inmovilizadas.....	77
1.2.3.5 Estabilidad.....	80
1.2.4 Ventajas y desventajas de la inmovilización.....	84
1.2.5 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.....	86
1.2.5.1 Utilización de enzimas inmovilizadas en procesos químicos.....	88

	<u>Pág.</u>
1.2.5.2 Aplicaciones analíticas.....	92
1.2.5.3 Aplicaciones médicas.....	94
1.2.5.4 Aplicaciones en la elaboración de alimentos.....	95
1.2.5.5 Cromatografía de afinidad.....	96
1.2.5.6 Tratamiento de aguas residuales.....	97
1.2.5.7 Células de combustible y baterías bioquímicas.....	99
1.2.5.8 Otras aplicaciones.....	99
1.3 OBJETIVOS.....	100
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	101
2.2 SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN.....	102
2.2.1 Productos de partida.....	102
2.2.1.1 Derivados de Hidratos de Carbono.....	104
2.2.2 Preparación de cinamatos.....	104
2.2.2.1 De Hidratos de Carbono.....	104
2.2.2.2 De Alcohol Polivinílico.....	105
2.2.2.3 De <i>p</i> -Hidroxibenzaldehído.....	106
2.2.3 Hidrólisis de derivados.....	106
2.2.3.1 De 2,3,4,6-Tetracinaoil-D-glucopiranososa.....	106
2.2.3.2 De 3,5,6-Tricinaoil-D-glucofuranosa.....	106
2.3 APLICACIÓN DE LOS SOPORTES.....	106
2.3.1 Desengrasado de las matrices inertes.....	107
2.3.1.1 Bolas de vidrio.....	107
2.3.2 Inmovilización de HRPc.....	108
2.3.2.1 Preparación de películas sobre soportes inertes.....	108
2.3.2.2 Irradiación de las muestras preparadas.....	109
2.3.3 Inmovilización de β -galactosidasa.....	109
2.4 CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN.....	110
2.4.1 Inmovilización de HRPc.....	110
2.4.1.1 Sólido de inmovilización convenientemente pulverizado.....	110
2.4.1.2 Utilización de matrices inertes.....	110
2.4.2 Inmovilización de β -galactosidasa.....	112
2.4.2.1 Sólido de inmovilización convenientemente pulverizado.....	112
2.4.2.2 Bolas de vidrio.....	112
2.5 PROCEDIMIENTOS DE LAVADO.....	113
2.5.1 HRPc.....	113

	<u>Pág.</u>
2.5.2 β -galactosidasa.....	119
2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	120
2.6.1 Análisis de soportes.....	120
2.6.1.1 Análisis elemental.....	120
2.6.1.2 Espectroscopía de infrarrojo.....	120
2.6.1.3 Espectroscopía Visible-UV.....	121
2.6.1.4 Espectroscopía de r.m.n.....	121
2.6.1.5 Espectrometría de masas.....	121
2.6.1.6 Análisis térmico.....	121
2.6.1.7 Microscopía electrónica.....	122
2.6.2 Medidas de actividad enzimática.....	122
2.6.2.1 HRPc.....	124
2.6.2.2 β -Galactosidasa.....	126
2.6.3 Coeficiente de extinción molar del ONF.....	128
2.7 ANÁLISIS DE REGRESIÓN.....	130
2.7.1 Regresión no lineal.....	130
2.7.2 Regresión lineal.....	132
2.8 ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES.....	132
3 SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN.....	133
3.1 SOPORTES OBTENIDOS.....	133
3.2 APLICACIÓN DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE HRPc.....	139
3.2.1 Empleo de sólido de inmovilización convenientemente pulverizado.....	139
3.2.2 Empleo de matrices inertes.....	139
3.2.2.1 Empleo de matrices de plástico.....	141
3.2.2.2 Bolas de vidrio de 3 mm de diámetro.....	143
3.2.3 Modo de aplicación sobre matrices inertes.....	145
3.2.4 Efecto del número de capas de sólido de inmovilización.....	158
3.2.5 Efecto del tiempo de irradiación.....	164
3.2.5.1 Sobre la actividad inicial retenida y estabilidad frente al almacenado.....	164
3.2.5.2 Sobre la densidad de entrecruzamiento.....	168
3.3 APLICACIÓN DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE β -GALACTOSIDASA...	171
3.3.1 Soporte sobre matrices inertes.....	171
3.3.2 Soporte como sólido de inmovilización convenientemente pulverizado.....	172
3.4 PROCEDIMIENTOS DE LAVADO PARA HRPc INMOVILIZADA.....	173
3.4.1 Enzima retenida por adsorción física.....	173
3.4.1.1 Gradiente de concentración de NaCl.....	174

	<u>Pág.</u>
3.4.1.2 Almacenado con una disolución acuosa de metil- α -D-manopiranosido.....	175
3.4.1.3 Empleo de agentes humectantes.....	176
3.4.1.4 Empleo de una disolución acuosa de H_3BO_3	177
3.4.1.5 Inmovilización en presencia de metanol.....	179
3.4.1.6 Uso de detergentes para el lavado de la enzima inmovilizada.....	180
3.4.1.7 Efecto de los detergentes sobre la enzima soluble.....	185
3.5 PROCEDIMIENTOS DE LAVADO PARA β -GALACTOSIDASA INMOVILIZADA.....	186
4 INMOVILIZACIÓN DE HRPc.....	189
4.1 CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN DE HRPc.....	189
4.1.1 Efecto del pH de inmovilización.....	189
4.1.2 Efecto del tiempo de inmovilización.....	191
4.1.2.1 Sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol.....	191
4.1.2.2 Sobre todos los sólidos de inmovilización.....	191
4.1.3 Efecto de la concentración de sólido de inmovilización.....	193
4.1.4 Efecto de la concentración de enzima.....	194
4.2 ACTIVIDAD EN DIFERENTES SOPORTES.....	197
4.3 ENSAYOS DE INACTIVACIÓN.....	200
4.3.1 Inactivación por temperatura.....	200
4.3.1.1 HRPc soluble.....	200
4.3.1.2 HRPc Inmovilizada.....	202
4.3.2 Inactivación de HRPc por peróxido de hidrógeno.....	213
4.3.2.1 Enzima soluble.....	213
4.3.2.2 Enzima inmovilizada.....	214
4.3.3 Inactivación por tiempo de almacenado.....	217
4.3.3.1 Almacenado de HRPc soluble.....	217
4.3.3.2 Almacenado de HRPc inmovilizada.....	217
4.4 CÁLCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS.....	222
4.4.1 Caracterización cinética de HRPc soluble.....	223
4.4.2 Caracterización cinética de HRPc inmovilizada.....	223
4.4.2.1 Determinación de constantes cinéticas aparentes.....	223
4.4.2.2 Determinación de constantes cinéticas absolutas.....	224
4.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RESIDUAL DEBIDA A INTERACCIONES NO HIDROFÓBICAS.....	228
4.5.1 Contribución de la actividad enzimática retenida covalentemente.....	228
4.5.1.1 Ensayos con monómeros reactivos.....	228
4.5.1.2 Ensayos con mezclas de soportes de inmovilización.....	231

	<u>Pág.</u>
4.5.1.3 Empleo de agentes reductores durante tiempos cortos de inmovilización....	234
4.5.1.4 Empleo de agentes reductores durante tiempos largos de inmovilización....	236
4.5.1.5 Efecto del tiempo de inmovilización en ausencia de reductores.....	237
4.5.1.6 Efecto del tamaño del prepolímero de inmovilización.....	238
4.5.2 Actividad enzimática retenida mediante el método de atrapamiento.....	240
5 INMOVILIZACIÓN DE β-GALACTOSIDASA.....	243
5.1 CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN DE β -GALACTOSIDASA.....	243
5.1.1 Utilización de iones Mg^{+2} como activadores de β -galactosidasa.....	244
5.1.2 Utilización de dioxano-1,4 durante el proceso de inmovilización.....	245
5.1.3 Efecto del tiempo de inmovilización.....	246
5.1.3.1 En muestras de β -galactosidasa inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona entrecruzados al 50%.....	246
5.1.3.2 En muestras de β -galactosidasa inmovilizada sobre los derivados cinamoilados de inulina y D-glucosona entrecruzados al 50%.....	248
5.2 EFECTO DEL TIPO DE SÓLIDO DE INMOVILIZACIÓN.....	251
5.2.1 Empleo de derivados parcialmente cinamoilados de inulina.....	252
5.3 ESTABILIDAD EN EL ALMACENADO.....	254
5.3.1 Efecto de la composición del medio de almacenado.....	254
5.3.1.1 Almacenado en seco.....	254
5.3.1.2 Efecto de los iones Mg^{+2}	255
5.3.1.3 Almacenado en medio acuoso.....	256
5.3.1.4 Almacenado en medio acuoso con diferentes aditivos.....	257
5.3.2 Efecto del tipo de sólido de inmovilización.....	259
5.3.3 Efecto del tiempo de inmovilización.....	260
5.3.4 Efecto del tiempo de almacenado.....	267
5.3.5 Efecto del pH de almacenado.....	270
5.4 ESTABILIDAD FRENTE A LA REUTILIZACIÓN.....	271
6 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	275
6.1 ANTECEDENTES.....	275
6.2 ENSAYOS PREVIOS.....	275
6.2.1 Recta de calibrado.....	275
6.2.2 Ensayos en ausencia de HRPc.....	278
6.3 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	279
6.3.1 HRPc inmovilizada sobre el derivado de D-glucosona.....	279
6.3.2 HRPc inmovilizada sobre el derivado de sacarosa.....	283

CONCLUSIONES.....	289
BIBLIOGRAFÍA.....	293
APÉNDICE.....	309

Capítulo 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS FOTOPOLÍMEROS ENTRECruzABLES COMO SOPORTES

1.1.1 Introducción

Además de ser una de las más antiguas de la historia pocas reacciones fotoquímicas han tenido tanta importancia como las de insolubilización de polímeros fotosensibles. Desde el antiguo Egipto en el que se utilizaba el betumen de Judea (Delzenne, 1972; Delzenne, 1974) hasta las modernas utilizaciones en circuitos integrados, fibras ópticas, prensas litográficas, etc., los polímeros fotosensibles han resultado ser de gran importancia.

Sin embargo, el betumen de Judea planteaba muchos inconvenientes como necesidad de largos tiempos de exposición, la solubilidad mostrada por las zonas expuestas y no expuestas no era muy diferente, no era disponible con una calidad reproducible, etc. Estas razones hicieron que se comenzaran a usar otros materiales tales como dicromato potásico embebido en papel, almidón o gelatina (Reiser, 1989).

Pero todos estos fotopolímeros naturales, aunque fueron de gran utilidad, tenían varios inconvenientes, entre ellos que las imágenes no eran muy resistentes al ataque ácido durante el revelado y había reacción en la oscuridad. Surgió, así, la necesidad de un fotopolímero hidrofóbico que por su naturaleza resistiera los ataques en medio acuoso ácido. El camino de partida que se escogió y que luego condujo al éxito fue la bien conocida fotodimerización del ácido cinámico en estado sólido (Delzenne, 1974; Egerton et al., 1981a; Minsk et al., 1959; Tsuda, 1964). Los dímeros resultantes son menos solubles que el ácido cinámico. La reacción que tiene lugar se muestra en la Figura 1.1.

Fue Louis Minsk el primero en fabricar el primer fotopolímero sintético. El funcionalizó un polímero vinílico con grupos cinamoilo, asumiendo que se daba la dimerización de dos grupos pertenecientes a distintas cadenas y que un determinado número de entrecruzamientos insolubilizaría el polímero. El compuesto utilizado fue el cinamato de polivinilo (PVCN) (Minsk y Van Deusen, 1948; Minsk et al., 1959). Este material fue un éxito puesto que no había reacción en la oscuridad, como ocurría en los fotopolímeros con dicromato, el material tenía un tiempo de vida largo, podía usarse en fotografía ya que era resistente al revelado y tenía una resolución excelente.

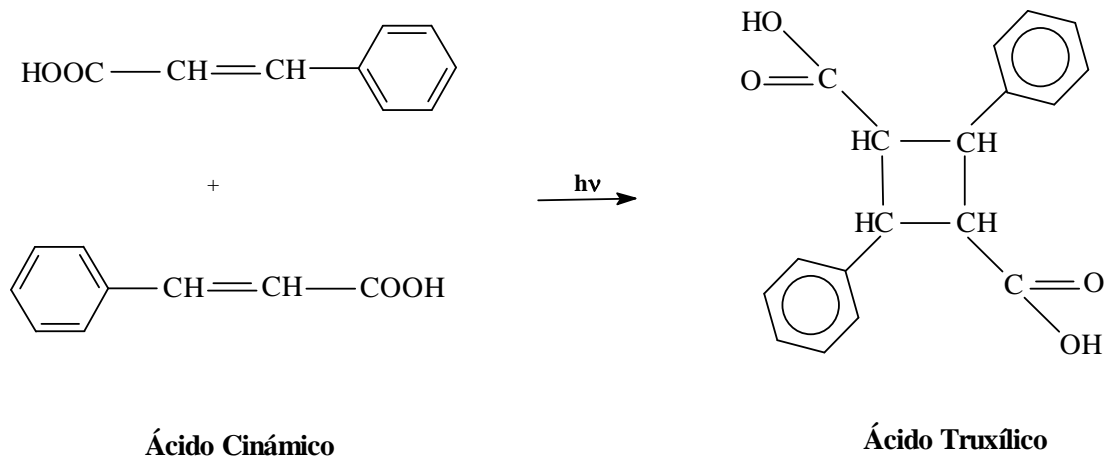


FIGURA 1.1 Fotodimerización del ácido cinámico.

De aquí en adelante comenzó el diseño de una amplia clase de fotopolímeros basados en cicloadiciones e inspirados en el PVCN. (Williams et al., 1971; Delzenne, 1972).

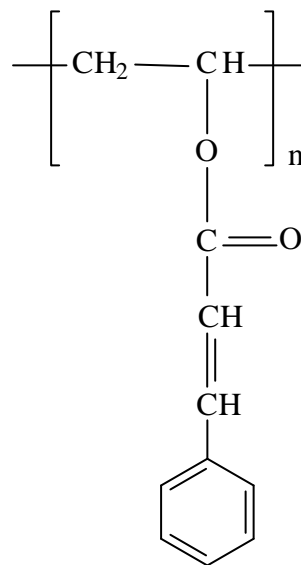


FIGURA 1.2 Unidad fotorreactiva en el PVCN.

El proceso de formación de una imagen en las resinas negativas y positivas comienza por la extensión de la resina en una placa. Tras ser secada, se expone a la

radiación. Por último se trata con un disolvente o mezcla de disolventes que actúan como “revelador”. En una resina negativa tras la irradiación, el revelador disuelve las partes no irradiadas de la resina y la imagen negativa del modelo permanece sin disolver. En las positivas ocurre lo contrario.

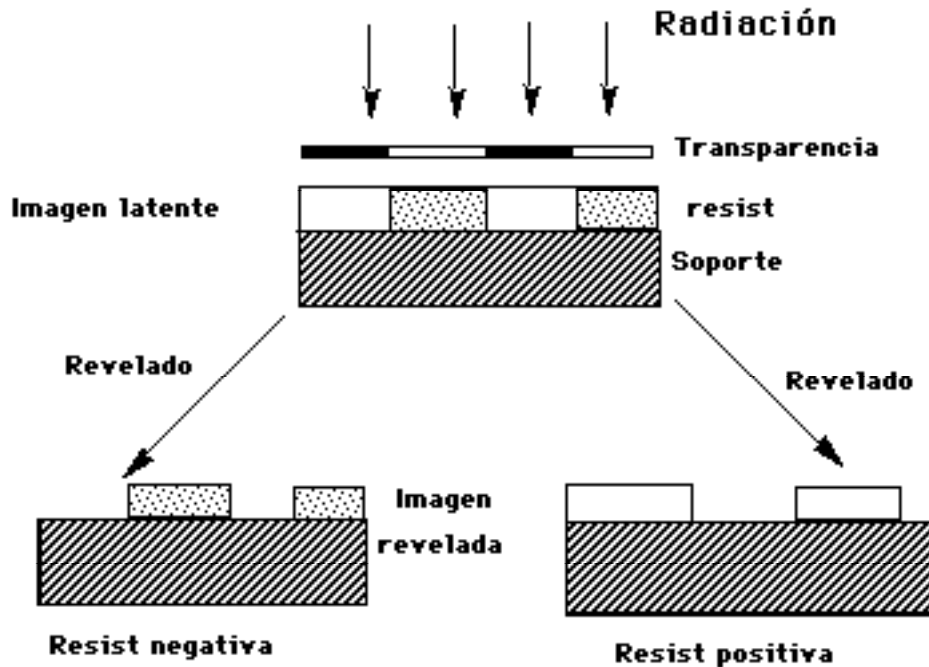


FIGURA 1.3 Procesado de una resina negativa y positiva.

Los primeros fotopolímeros, betumen de Judea, gelatina dicromada y otros coloides dicromados eran resinas negativas. La insolubilización de polímeros puede realizarse por entrecruzamiento, aunque éste no es el único mecanismo, ya que un gran número de materiales se basan en cambios de la polaridad fotoinducida en los grupos funcionales enlazados al polímero, que pueden tener un profundo efecto sobre la solubilidad del polímero, como se redacta en apartados posteriores de este capítulo.

1.1.2 Fotopolimerización

El presente trabajo se basa en la utilización de sólidos poliméricos que se comportarán como resinas negativas. Por ello, y en general, las afirmaciones realizadas en los apartados siguientes deberán tener en cuenta el hecho de estar trabajando con este tipo de resinas.

En la fotopolimerización, el resultado de la fotorreacción es la polimerización de un monómero para formar un polímero de más alto peso molecular. En las resinas

fotoentrecruzables se dan cambios en la solubilidad por formación de una red tridimensional a partir de un conjunto de cadenas lineales. En general, el efecto neto de la energía luminosa en la fotorreacción es la producción de alguna especie que actúe como iniciador. El esquema es el indicado en la Figura 1.4.

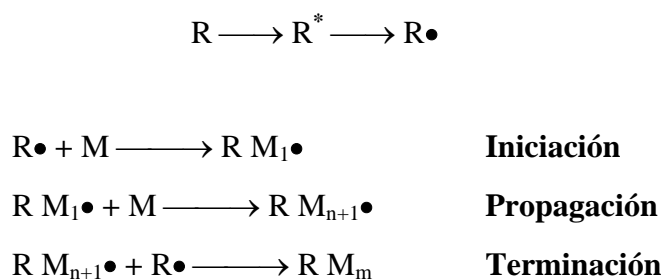


FIGURA 1.4 Esquema de fotopolimerización.

En el caso de las fotorresinas, su exposición a la luz da como resultado la formación de estructuras bidimensionales. Las áreas expuestas, y por lo tanto entrecruzadas, resultan insolubles en determinados disolventes. Las áreas no expuestas sí son solubles y pueden eliminarse por disolución o por acción química para proporcionar imágenes o modelos en relieve.

1.1.2.1 Fotopolimerización de cuatro centros

Existe un tipo especial de fotopolimerización denominada de “cuatro centros”. Es un método relacionado con la fotopolimerización de dobles enlaces, el cual se ha estudiado para diestirilpirazanos y también para trans, trans-1,4-bis(β -piridil-2-vinil) benceno (Wendell, 1983). Las estructuras de los productos de partida así como de las obtenidas tras el proceso de fotoentrecruzamiento se muestran en la Figura 1.5. En este tipo de fotopolimerización tiene gran importancia la distribución topoquímica de los dobles enlaces como lo demuestra el hecho de que los compuestos isómeros 1,4-bis(β -piridil-3-vinil) benceno y el 1,4-bis(β -piridil-4-vinil) benceno no sufran la fotopolimerización bajo las mismas condiciones. Un estudio con el éster etílico de los ácidos *p*-fenilén-diacrílicos muestra que la fotopolimerización tiene lugar en estado cristalino pero no en disolución. Estos compuestos polimerizan dando poliésteres que contienen unidades de ciclobutano.

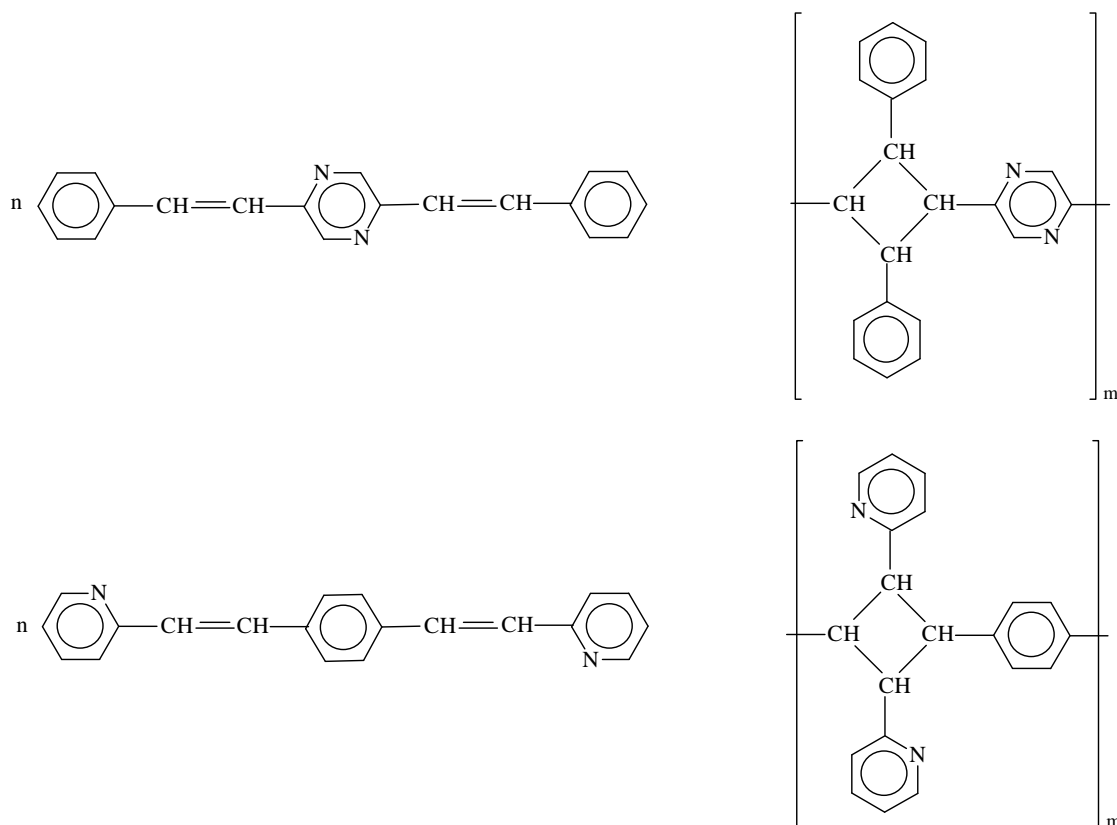


FIGURA 1.5 Polimerización de “cuatro centros”.

1.1.2.2 Ventajas sobre otros métodos de polimerización

Comparados con otros métodos convencionales de polimerización, el uso de la irradiación presenta muchas ventajas:

1. **Rapidez.** Para muchos sistemas fotopoliméricos, son suficientes tiempos de exposición de varios segundos. Algunos sistemas de ésteres acrílicos pueden ser entrecruzados en centésimas de segundo. Son obvias las ventajas para usos tales como, por ejemplo, las tintas de impresión.
2. **Bajos consumos de energía.**
3. **Bajas temperaturas de operación.** Se evitará así el daño a sustratos sensibles a la temperatura. Por otro lado, si el sistema tiene grupos reactivos al calor pueden quedar inalterados. Estos pueden ser implicados más tarde por medio de reacciones inducidas por calor. Así se hace posible un entrecruzamiento a pasos.

4. **Ventajas ecológicas.** Muchos sistemas de fotopolímeros no requieren la presencia de un disolvente. Por ello, los métodos de manufactura tradicional que requieren el uso de disolventes pueden reemplazarse por sistemas de este tipo, más “limpios”, que no los necesitan.
5. **Posibilidades de entrecruzamiento selectivo.** Si son expuestas a la luz UV (por ejemplo a través de un negativo fotográfico), solamente ciertas capas de fotopolímero sobre el soporte resultarán entrecruzadas, y por lo tanto insolubles. Este principio de formación de imágenes es utilizado en la manufacturación de circuitos impresos y de láminas de imprimir. Tales sistemas se les designa como foto-resinas de tipo “negativo” (en los procesos de copiado se usan como negativo del original) para distinguirlas de las de tipo “positivo” (Jaromir, 1964; Haas et al., 1983), las cuales resultan más solubles después de ser irradiadas, reproduciendo, así, una réplica exacta del original. Estas últimas se basan en diazocompuestos y diazoquinonas (Kalle & Co., 1931; 1939 y 1940).

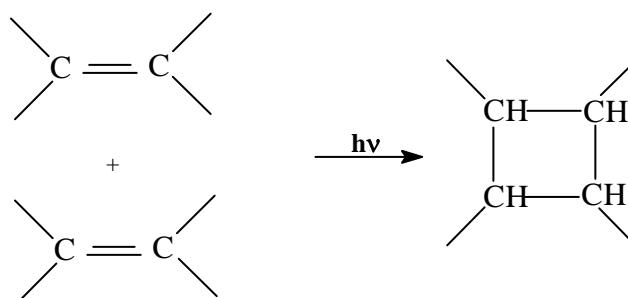
1.1.3 Polímeros fotoentrecruzables

En las resinas fotoentrecruzables se dan cambios en la solubilidad por formación de una red tridimensional a partir de un conjunto de cadenas lineales. La introducción de grupos fotorreactivos dimerizables en monómeros y/o polímeros, produce la posibilidad de su fotoentrecruzamiento por medio de la luz, variando propiedades de los compuestos de partida tales como la solubilidad en determinados disolventes. El grupo fotorreactivo puede ser añadido a un polímero ya formado a través de grupos reactivos presentes en este último que permitan su fijación, o bien puede ser introducido como un monómero que posteriormente será polimerizado para la obtención del polímero deseado, el cual tendrá en su composición los grupos fotorreactivos inicialmente introducidos (Moliner, 1986). Existen dos medios, principalmente, para el fotoentrecruzamiento de polímeros para su aplicación como fotorresinas.

1.1.3.1 Fotoentrecruzamiento por cromóforos excitados

Olefinas

Se basan en la ciclodimerización de dos dobles enlaces por medio de la absorción de la energía luminosa (Rusu et al., 1998).



Generalmente, los principales grupos utilizados, además de las olefinas, suelen ser las cetonas α,β insaturadas, ésteres α,β insaturados y polidienos conjugados (Ranby, 1998). Dentro de los cromóforos fotoentrecruzables que se pueden introducir a un monómero y/o polímero ya formado tenemos el cloruro de cinamoílo que reacciona con los grupos hidroxilo presentes en los compuestos de partida, dando lugar a la formación de los ésteres del ácido cinámico correspondientes. Uno de los más frecuentes y conocidos polímeros fotoentrecruzables es el cinamato de polivinilo (PVCN) obtenido por reacción del cloruro de cinamoílo con el alcohol polivinílico (PVA), por Minsk y colaboradores como se indicó en el apartado 1.1.1. La Figura 1.6 describe la reacción que tiene lugar para la síntesis del PVCN (Williams, 1974). Por tanto, lo que se hizo fue incorporar al alcohol polivinílico el sistema de fotodimerización en estado sólido ilustrado para el ácido cinámico en la Figura 1.1 del apartado 1.1.1.

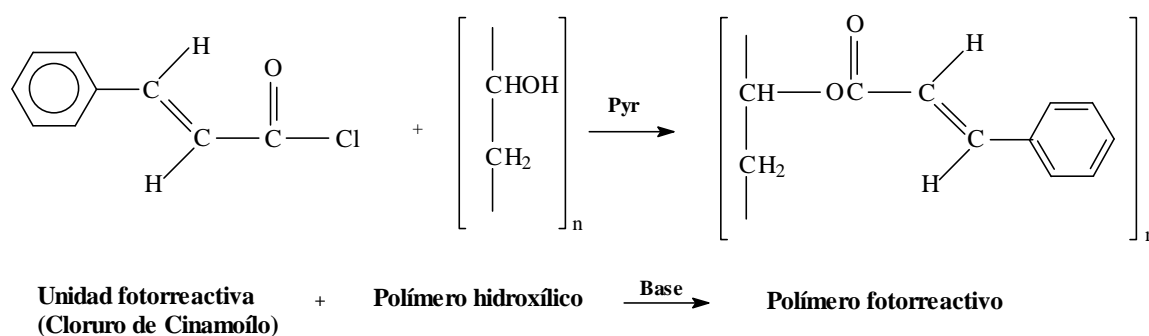
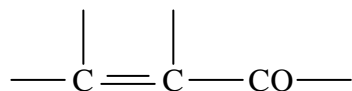


FIGURA 1.6 Preparación de cinamato de polivinilo.

La unidad básica necesaria para producir el fotoentrecruzamiento de los polímeros basados en el PVCN es la unidad



Los entrecruzamientos ocurren por fotoadición entre un grupo cinamoilo excitado (*) de una cadena con otro en su estado fundamental perteneciente a otra cadena diferente, tal y como se indica en la Figura 1.7.

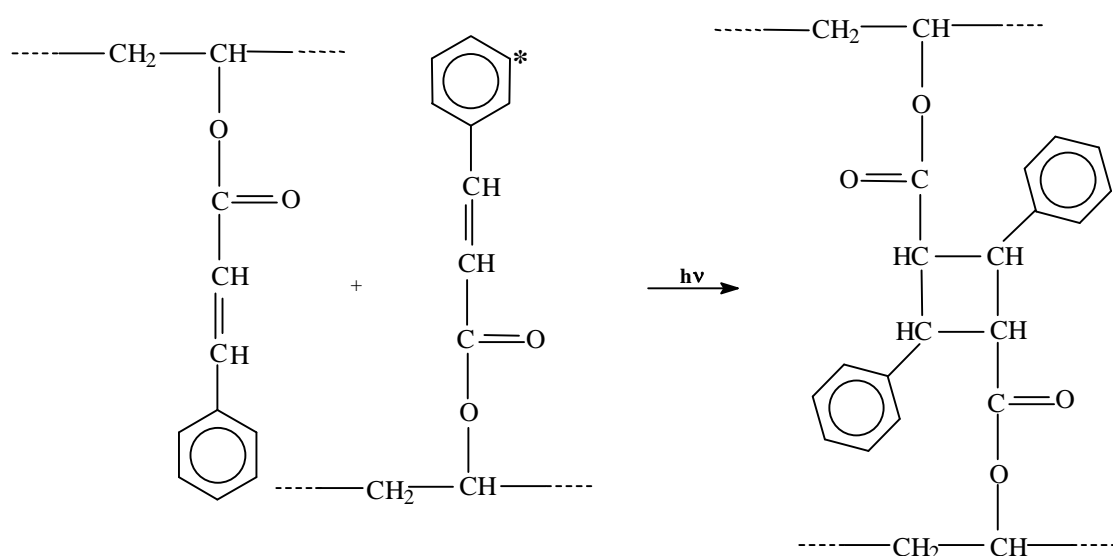
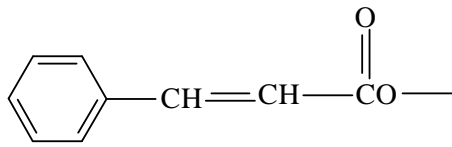
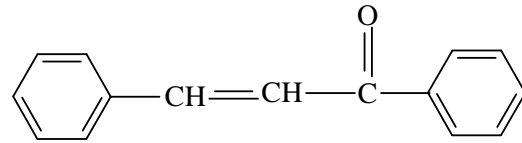
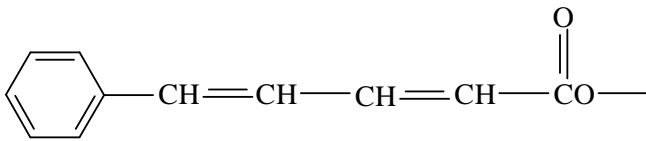
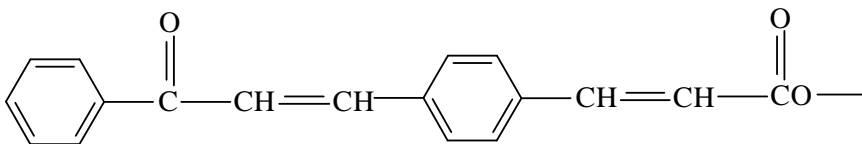
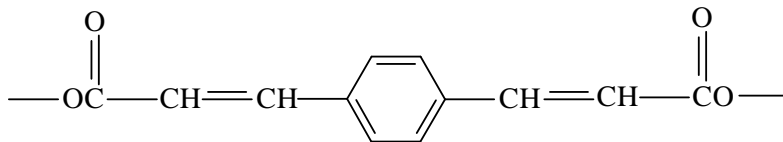
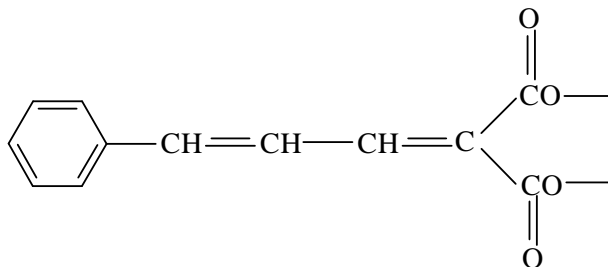


FIGURA 1.7 Fotoentrecruzamiento entre cadenas de PVCN.

La naturaleza del producto de esta reacción ha sido confirmada por su análisis directo (Egerton et al., 1981a y b). A baja temperatura más del 80% de los productos de reacción son ciclobutanos, el resto son el resultado de reacciones laterales via radical. La cicloadición supra-supra 2+2 en estado fundamental de los dos dobles enlaces carbono-carbono es prohibida por la simetría orbital (Woodward-Hoffman), pero es permitida si uno de los reactivos está en el estado excitado, por tanto está indicada como un mecanismo de fotoentrecruzamiento (Delzenne, 1972; Hasegawa, 1995). Es particularmente efectiva en grupos cinamoilo y sus análogos donde el carbonilo proporciona la polarización deseada al doble enlace reactivo y el fenilo aumenta la polarizabilidad y aumenta el poder de absorción de luz del cromóforo. En la Figura 1.8 se

escriben ejemplos de grupos fotodimerizables que pueden unirse a un determinado monómero y/o polímero.

**Cinamato****Chalcona****Estiril-acrilato****Chalcona-acrilato*****p*-Fenilén-diacrilato****Cinamilidén-malonato****FIGURA 1.8 Grupos fotodimerizables.**

No es casualidad que estos grupos aparezcan una y otra vez en las estructuras de un amplio rango de fotopolímeros muy importantes (Delzenne, 1974).

Aunque la fotorreacción de entrecruzamiento es razonablemente eficiente ($\phi = 0,1$), en la práctica cuando se expone el PVCN a la lámpara de mercurio la calidad fotográfica es pobre. Esto se debe al desplazamiento que existe entre el espectro de absorción del cinamoílo ($\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$) y el espectro de emisión del arco de mercurio (Reiser, 1989) (Figura 1.9).

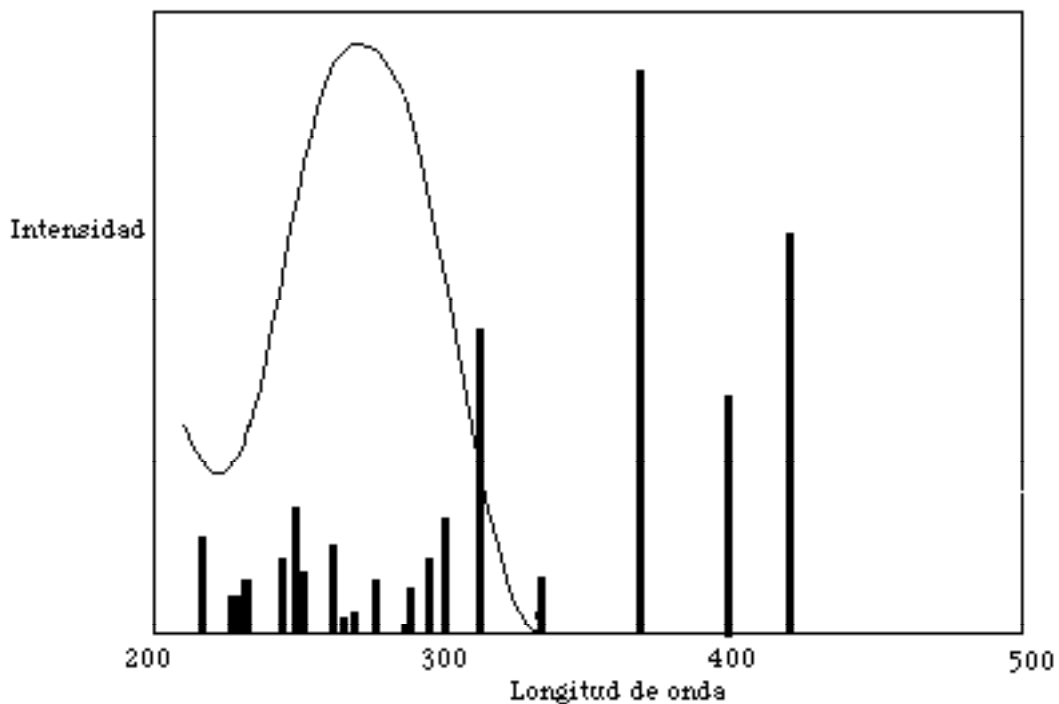
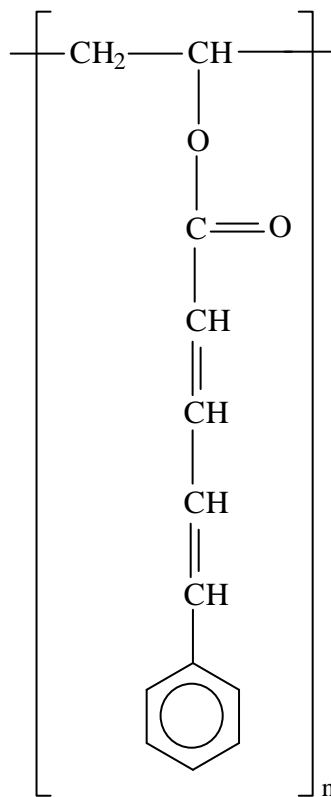


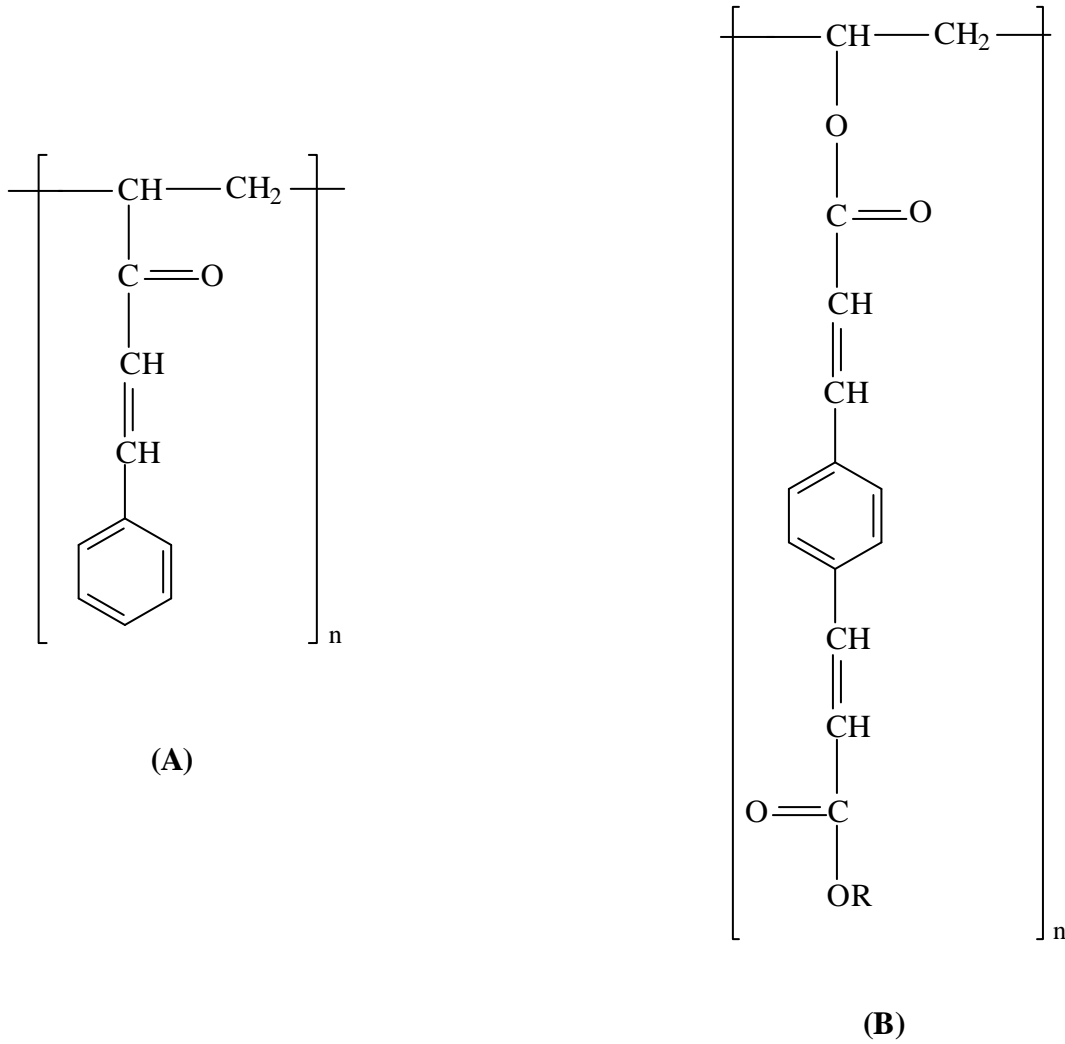
FIGURA 1.9 Desplazamiento espectral entre la absorción del cinamato de polivinilo y la emisión del arco de mercurio.

Pero esta dificultad puede ser superada por *sensibilización espectral* o por *reemplazo* del cinamoílo por un cromóforo que absorba a longitud de onda mayor. Así, se logran muy buenos resultados mediante sensibilización espectral del PVCN (Robertson et al., 1959). Por ejemplo, la adición de un 5% de la cetona de Michler aumenta 300 veces la rapidez fotográfica. Un ejemplo de la segunda estrategia es el estiril-acrilato.

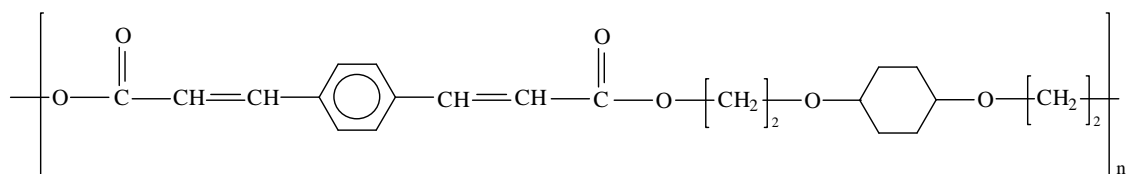


Este material fue introducido por Leubner y Unruh en 1966 (Leubner y Unruh, 1966), absorbe a 360 nm y su rapidez fotográfica es 200 veces mayor que la del PVCN no sensibilizado. Sólo el doble enlace adyacente al carbonilo es reactivo. La cicloadición es reversible por irradiación con la línea de emisión del mercurio a 254 nm (Reiser, 1989).

Otros cromóforos fotorreactivos de interés son las chalconas (A) (Unruh y Smith, 1960) y fenilén-diacrilatos (B) (Farbenfabriken Bayer AG., 1962), los cuales se muestran a continuación:



Estos grupos se pueden unir al polímero, por ejemplo por una unión éster al alcohol polivinílico, o formar parte de la estructura base de un poliéster (Delzenne, 1974). Particularmente usado es un poliéster del ácido *p*-fenilén-diacrílico (PPDA) junto a un glicol no demasiado flexible mostrado en la siguiente estructura (Farbenfabriken Bayer AG., 1962).



(Poliéster derivado de PPDA)

Como ejemplos de polímeros en cuya estructura ya están presentes los grupos foto-reactivos como monómeros constituyentes, cabe mencionar los policarbonatos y los poliésteres. Los policarbonatos son un ejemplo de cómo las propiedades físicas, tales como adhesión, solubilidad, resistencia a la temperatura, etc., de los polímeros formados pueden alterarse también por cambios en los componentes no fotosensibles (Arcesi y Rauner, 1972; Borden, 1974). Los policarbonatos se basan en la presencia en su estructura del bisfenol A. La introducción de este glicol rígido conduce a materiales resistentes al calor. La reacción se puede llevar a cabo con fosgeno, el cual formará la unión carbonato entre el $-OH$ del bisfenol A y el $-OH$ del diol que se desea polimerizar. Este diol puede ser el mismo grupo fotoentrecruzable o bien que posea una función a la cual posteriormente pueda unirse un grupo fotodimerizable. Un ejemplo de los reactivos que pueden emplearse en este proceso es mostrado en la Figura 1.10.

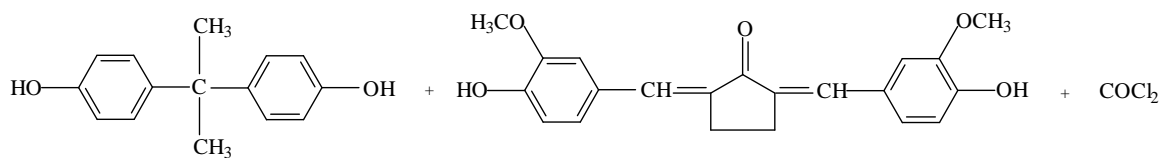


FIGURA 1.10 Formación de un policarbonato por reacción de fosgeno con bisfenol A y un diol.

La obtención de poliésteres puede realizarse por condensación de *p*-fenilén-bis(acrilato) con glicoles y coésteres, utilizando titanato de tetrabutilo como catalizador (Allan, 1969). La Figura 1.11 describe los productos iniciales de reacción.

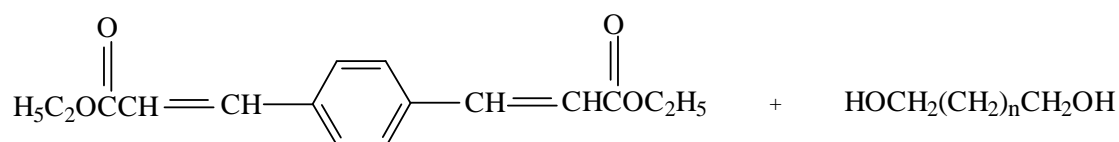
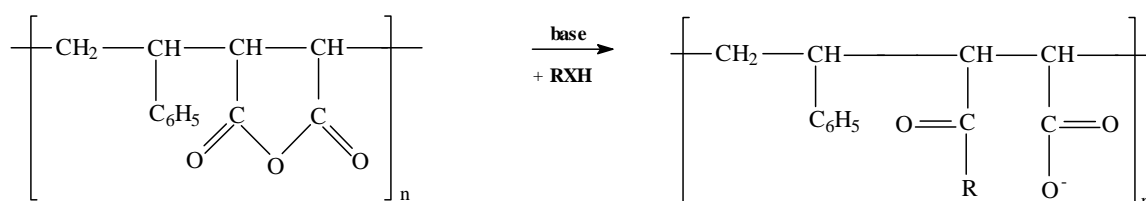


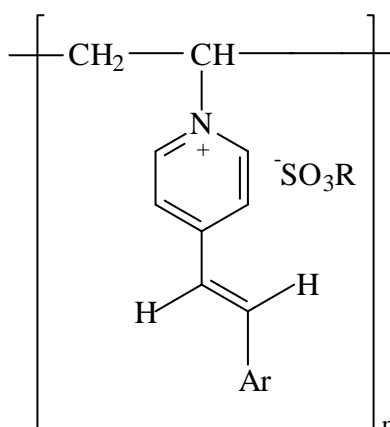
FIGURA 1.11 Preparación de poliésteres.

Las propiedades de estos poliésteres puede controlarse por modificación de los componentes de los dioles o bien por inclusión de unidades de coésteres.

En 1987, se describió un grupo de poliésteres basados en estirilpiridina, que son térmicamente estables por encima de 450°C (Montesinos, 1996). Además, consideraciones medioambientales han aumentado la demanda de resinas procesables con agua. Estas resinas pueden ser preparadas incorporando grupos iónicos o ionizables (ácidos o bases) en la estructura del polímero. Pueden encontrarse diferentes trabajos en la bibliografía que muestran la preparación de algunas de estas resinas procesables con agua. Así, una de estas resinas puede obtenerse durante la hidrólisis de un copolímero de estireno y anhídrido maleico en presencia de un grupo fotosensible capaz de insertarse en los grupos reactivos formados tras la hidrólisis (Williams, 1974).

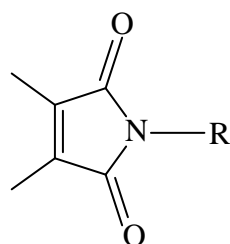


También se usan polímeros de sales de piridinio cuaternarias que por reacción con un aldehído se hacen sensibles a la luz (Ichimura y Watanabe, 1979a; Leubner et al., 1957).

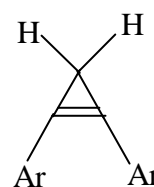


Diferentes trabajos desarrollaron el uso de piridinio u otras bases heteroaromáticas (Williams y Borden, 1964). También se han usado cadenas laterales de estirilpiridinio y estirilquinolinio como cromóforos fotorreactivos (Ichimura et al., 1986; Ichimura et al., 1988; Ichimura y Watanabe, 1979b).

Además deben ser mencionados aquí, dos cromóforos que conducen a la formación de dímeros policíclicos: dimetilmaleimida (A) (Wendell, 1983) y difenilciclopropeno (B) (DeBoer et al., 1973).

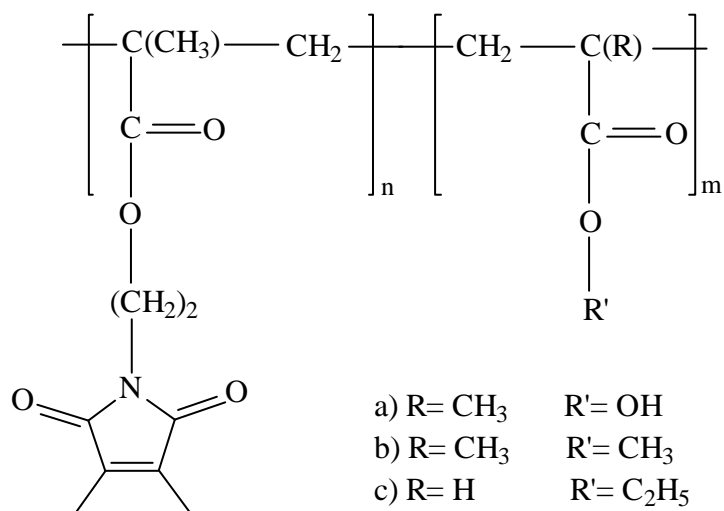


(A)



(B)

Monómeros bifuncionales (Baumann et al., 1978) que contienen dimetilmaleimida y, por ejemplo, un acrilato pueden polimerizarse sin afectar a la maleimida, pues el impedimento estérico de los grupos metilos protegen al doble enlace de la maleimida del ataque radical durante el proceso de polimerización térmica. Esto permite la síntesis de un gran número de polímeros y copolímeros diferentes. Así se ha incorporado dimetilmaleimida en varios copolímeros acrílicos (Reiser, 1989) y preparado resinas con la estructura general siguiente:



Un fotopolímero de interés se obtuvo al introducir difenilciclopropeno en alcohol polivinílico (DeBoer, 1973). Su estructura se muestra en la Figura 1.12.

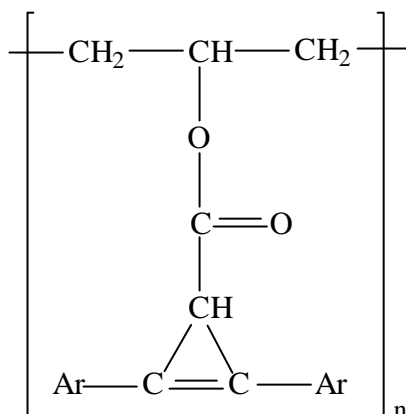


FIGURA 1.12 Alcohol polivinílico sustituido con difenilciclopropeno.

El tiempo de vida media del estado triplete excitado de difenilciclopropeno es superior que el de cualquier otro cromóforo que dimerice. Así, incluso en solución diluida reacciona con un rendimiento muy elevado ($\phi = 0,6$). La misma reacción de ciclación ocurre también en estado sólido. Las resinas obtenidas de este modo poseerán una elevada rapidez fotográfica.

1.1.3.2 Entrecruzamiento por especies reactivas fotogeneradas

Nitrenos

Son resinas basadas en la descomposición de azidas orgánicas, donde los productos primarios del proceso son nitrenos, especies deficientes en electrones análogas a los carbenos (Reiser y Leyshon, 1971; Reiser et al., 1966a y b). Las resinas basadas en nitrenos se preparan uniendo grupos azido a la cadena del polímero (Williams, 1974), como los indicados en la Figura 1.13. En lugar de enlazar grupos azido directamente al polímero, puede emplearse una bis-azida de bajo peso molecular para ser añadida a un sustrato no reactivo. De este modo, la bis-azida actuará como un añadido bifuncional, produciéndose el entrecruzamiento cuando ambos grupos azido reaccionen con diferentes cadenas de polímero (Reiser, 1980).

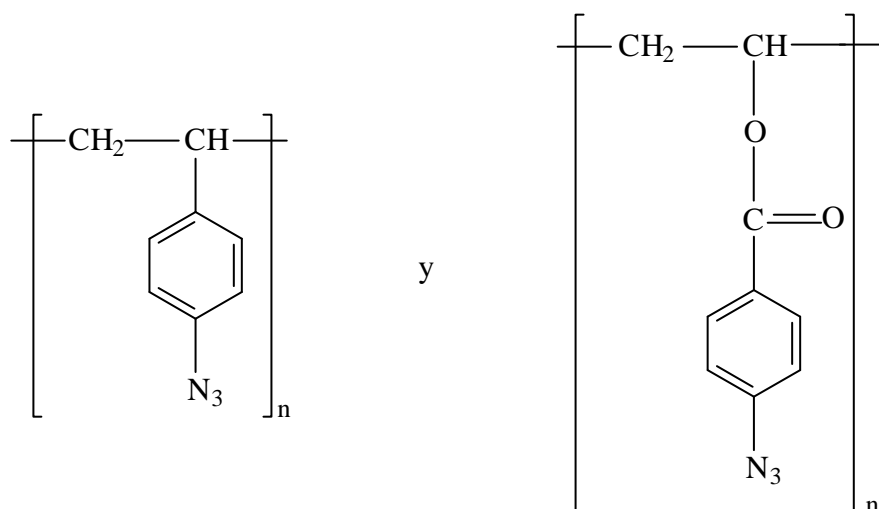


FIGURA 1.13 Azidas unidas a cadenas de polímero.

El principal esquema de preparación de este tipo de resinas, se basa, en general, en la reacción de las bis-azidas con los polidienos (Moliner, 1986). Investigaciones realizadas en fotorresinas formadas por poli(cis-isopreno) ciclado y bis(4-azidobenzal)-ciclohexanona, llevaron a la conclusión que los dos grupos de la bis-azida se anclan por absorción de un solo fotón. Como moléculas empleadas para ser entrecruzadas por este mecanismo cabe mencionar poli(cis-isopreno) ciclado, 1,2-polibutadieno, etc. El tipo de bis-azida que generalmente se usa se basa en productos de condensación de azidobenzaldehído y 4-alkilciclohexanonas. Como ejemplos cabe mencionar bis(4-azidobenzal)-ciclohexanona, 4-alkil-2,5-bis(*p*-azidobenzal)-ciclohexanona, etc. Como hipótesis se admite que el mecanismo es el resultado de la contribución de tres modalidades como se muestra en la Figura 1.14.

La clave es que los nitrenos tienen un estado fundamental triplete. En la primera etapa, que es la única fotorreactiva, el grupo azido pierde nitrógeno y se transforma en un nitreno singlete. Este último, se inserta rápidamente en un enlace C-H del sustrato polimérico y forma, en un solo paso (II), una amina secundaria que actúa como enlace entre un fragmento azida y el sustrato. El otro fragmento azida, en el caso de las bis-azidas, se insertará en otra cadena diferente de polímero, dando lugar de este modo al entrecruzamiento deseado. Más a menudo, el nitreno singlete decae al estado fundamental nitreno triplete antes de que la reacción anterior pueda ocurrir. El nitreno

triplete abstrae hidrógeno y forma un radical amino y un carbono radical, que tienen espines correlativos y pueden acoplarse sólo después de la inversión de espín, dando lugar a una amina secundaria (similar a la formada en la etapa II) que provoca el entrecruzamiento antes mencionado. El radical amino, sin embargo, puede también abstraer un segundo hidrógeno de otro lugar y producir una amina primaria (o hidrazina en el caso de la bis-azida) y un carbono radical el cual podrá acoplarse con otro carbón radical formado de la misma manera, dando lugar a la formación de un entrecruzamiento mediante la formación de un enlace C-C entre dos cadenas diferentes de polímero (I). Finalmente, otra posibilidad de entrecruzamiento puede tener lugar por ataque del nitreno a los dos carbonos de un doble enlace perteneciente a la cadena de polímero, dando lugar a la formación de anillos de tres miembros. En el caso de bis-azidas, el entrecruzamiento se completará por reacción del segundo grupo azida sobre los dos carbonos de un doble enlace de una cadena diferente de polímero (III). Desde el punto de vista de que el entrecruzamiento tenga lugar por la participación de los nitrenos formados por fotólisis de las azidas de partida, algunos autores consideran que el entrecruzamiento producido por formación de enlaces C-C intercatenarios suponen una pérdida en el rendimiento de la reacción de entrecruzamiento térmico esperada (Reiser, 1980; Reiser y Marley, 1968).

La bis-azida 2,6-bis(4-azidobenzal)-4-metilciclohexanona (ABC) se usa como fotorresina en el UV cercano. Su popularidad se debe, en parte, a la facilidad de su síntesis. Otras bis-azidas de uso comercial, tanto por su compatibilidad con los sustratos comunes como por su absorción espectral, son 4,4'-diazidobenzofenona, 4,4'-diazidobenzofenona y 4,4'-diazidobenzalacetona. El sustrato más comúnmente usado en este tipo de resinas es el antes mencionado poli(cis-isopreno), ciclado por tratamiento con ácido mineral (Reiser, 1989). Dicho sustrato ciclado, junto con ABC como agente de entrecruzamiento forma el resist bis-azida Kodak Thin Film Resist (KTFR) del cual derivan la mayoría de las resinas de este tipo, y desde 1957 hasta 1972 fue de vital importancia en la industria de semiconductores (Mateos et al., 1980).

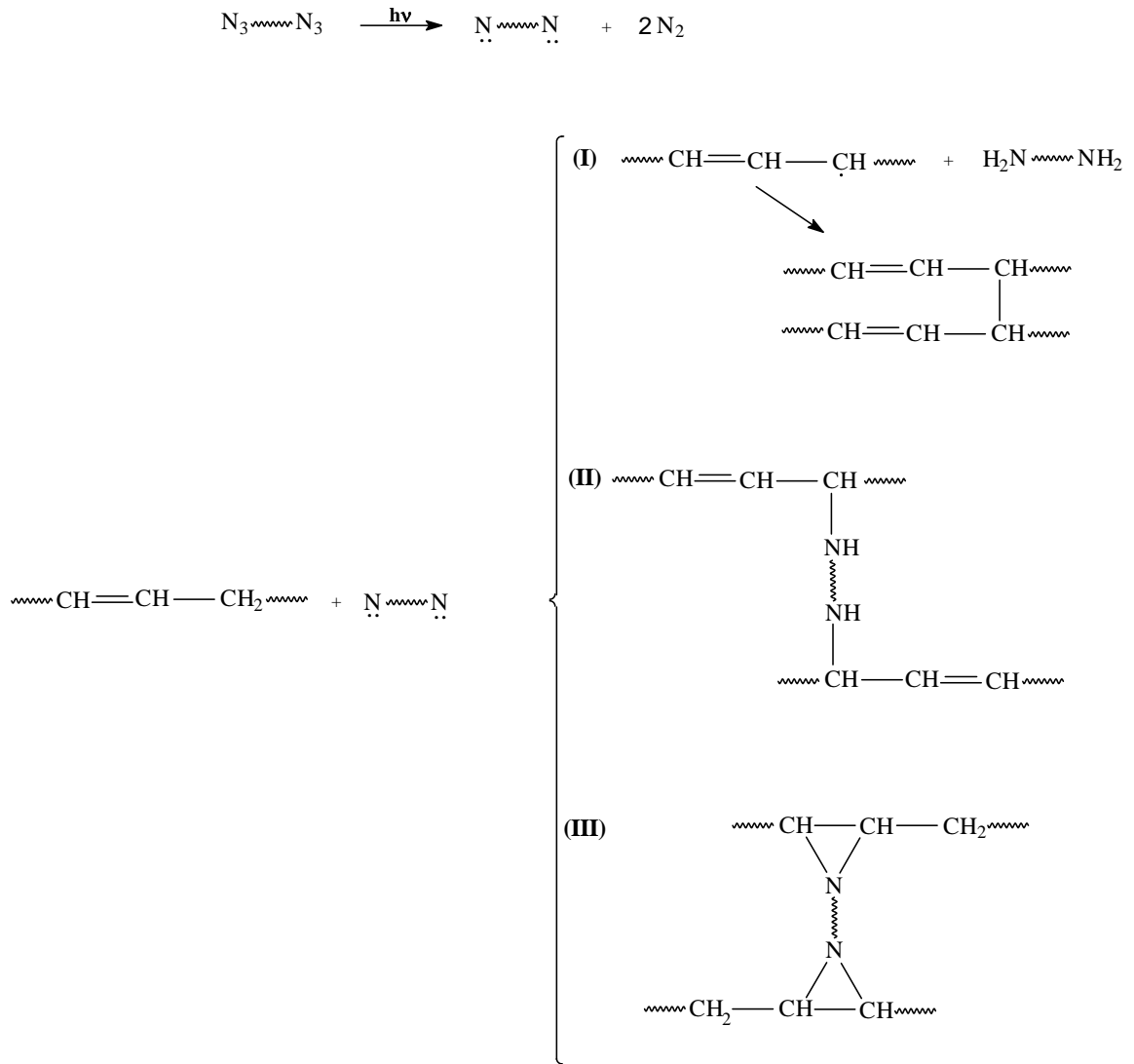
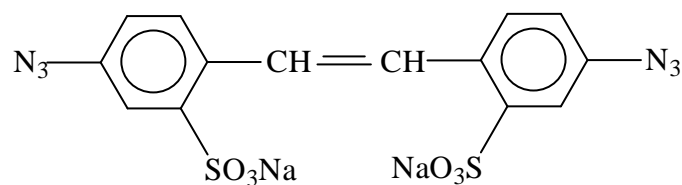


FIGURA 1.14 Hipótesis admitida para el fotoentrecruzamiento de bis-azidas.

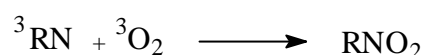
Un importante impulso en las resinas de azida surgió como resultado de la síntesis de resinas de este tipo procesables con agua basadas en poli(acrilamida) o polivinilpirrolidona, junto con bis-azidas solubles en agua tales como:



De mayor interés son algunas resinas de azida basadas en polivinilfenol como sustrato polimérico y varias monoazidas como componentes fotosensibles tales como, 4-azidochalcona y sus homólogos (Nonogaki et al., 1985; Koibuchi et al., 1985).

En resumen, los azidocompuestos se añaden a la resina en un 20% en peso. En la irradiación los nitrenos fotogenerados abstraen hidrógeno del polímero base y producen radicales carbono, cuya recombinación proporciona el mecanismo del fotoentrecruzamiento (Turro y Ramamurthy, 1977).

En estas resinas, una reacción que compite con la formación de entrecruzamientos es la reacción de nitrenos con el oxígeno (Reiser et al., 1966a). Esto se debe a que el oxígeno, como el nitreno, tiene un estado fundamental triplete, y actuará como un capturador de radicales libres.



Carbenos

Como en el caso de los nitrenos, pueden usarse como agentes de entrecruzamiento potenciales. Así, ha sido usada la fotoisomerización de acilsilanos a siloxicarbenos, para estudiar el mecanismo de entrecruzamiento (Brook y Duff, 1973). La reacción que tiene lugar se muestra en la Figura 1.15.

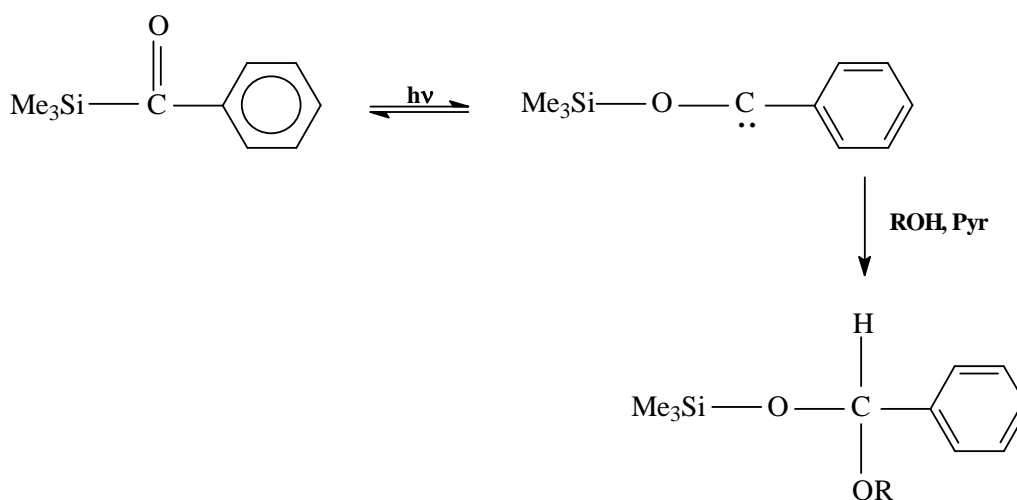
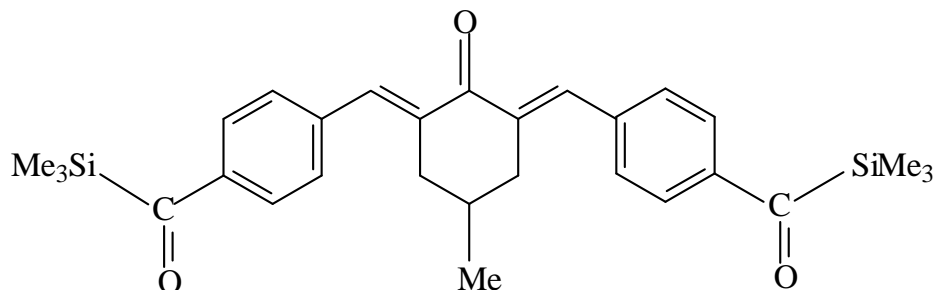


FIGURA 1.15 Fotoisomerización de acilsilanos a siloxicarbenos.

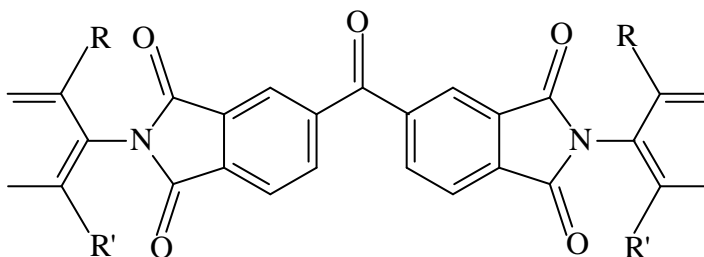
La reacción puede usarse para introducir grupos acilsilil en polímeros o para añadir acilsilanos bifuncionales, tales como



a alcohol polivinílico, polivinilpiridina o polímeros similares. Ambos métodos conducen a resinas eficientes con buena sensibilidad.

Radicales

La formación de radicales suele darse junto a las reacciones de polimerización, pero su acoplamiento puede usarse también para originar entrecruzamiento. La abstracción de hidrógenos por cetonas triplete excitado (ej. Benzofenona) y posterior acoplamiento radical es uno de los procesos clásicos. Se ha demostrado que también puede ocurrir en polímeros sólidos (Horie et al., 1987). Este proceso se ha utilizado para fotoentrecruzar copolímeros de vinilbenzofenona y 4-dimetilaminoestireno (Reiser, 1989). También se ha relatado una poliimida fotorreactiva donde el entrecruzamiento tiene lugar por medio de radicales fotogenerados. La Figura 1.16 ilustra la unidad que se repite en este tipo de resina.



R: $-\text{CH}_3$ o grupo alquilo

FIGURA 1.16 Resina de poliimida fotorreactiva.

Esta resina es de gran interés debido a las buenas propiedades mostradas como alta velocidad fotográfica, buen contraste, alta resolución, etc. Debe considerarse que, si bien en disolución la reacción es bastante efectiva, en estado sólido es reversible, afectando negativamente a la efectividad del producto de entrecruzamiento.

1.1.3.3 Resinas basadas en cambios de polaridad fotoinducida

Cambios en la polaridad de grupos funcionales enlazados a polímeros pueden afectar drásticamente a la solubilidad del polímero, de tal modo que puede pasar de ser soluble en disolventes orgánicos a disolverse en medio acuoso. Se ha utilizado esta idea para el diseño de electrorresinas pero también puede ser aplicada a fotopolímeros sensibles en el visible y UV próximo. Un ejemplo de este tipo de resinas es la fotodescomposición de diazoquinonas, moderadamente polar, en ácido indenocarboxílico, que es un compuesto ionizable, soluble en medio acuoso alcalino diluido (Reiser, 1989). Si la unidad de diazoquinona se enlaza a un polímero, por ejemplo a través de grupos laterales acrílicos, el polímero pasará de ser soluble en disolventes orgánicos antes de la irradiación, a disolverse en medio acuoso alcalino diluido tras la exposición. La Figura 1.17 describe la reacción que tiene lugar.

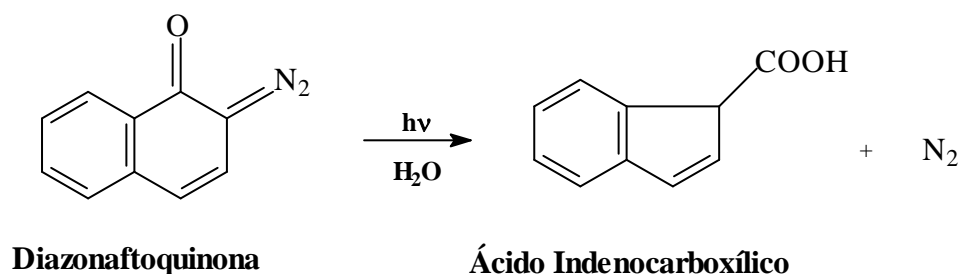
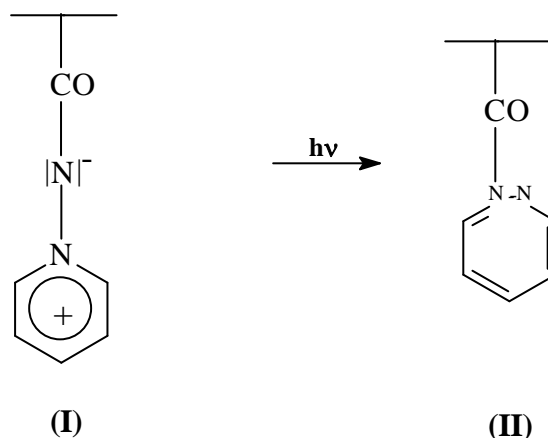


FIGURA 1.17 Fotodescomposición de diazoaftoquinona en ácido indenocarboxílico.

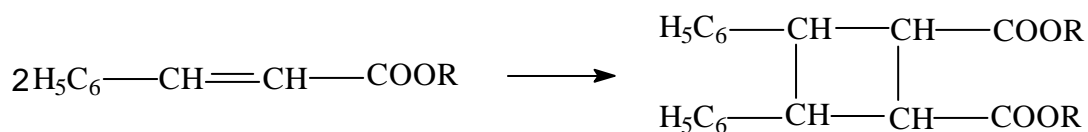
Del mismo modo se ha relatado la transformación fotoquímica de iluros de N-imino-piridinio (I), solubles en agua, a 1,2-diazepinas (II), hidrofóbicas. Estos iluros pueden también enlazarse a polímeros, los cuales, pasarán de ser solubles en agua a serlo en medio orgánico.



1.1.4 Mecanismos de fotoentrecruzamiento

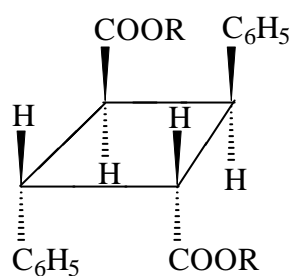
En este apartado se resumirán brevemente los principales mecanismos de fotoentrecruzamiento de los cinamatos de polivinilo. Hemos tomado este compuesto como representante de las olefinas debido al estudio exhaustivo al que ha sido sometido y por su gran aplicación comercial. El fotoentrecruzamiento del PVCN se ha considerado que ocurre como el resultado de las reacciones implicadas en la desaparición de los dobles enlaces. Diferentes trabajos han confirmado que la irradiación del PVCN con la luz UV causa la disminución del valor de absorción característico del grupo cinamato, acorde con el tiempo de irradiación.

La fotorreacción que tiene lugar se considera análoga a la dimerización de los ésteres de bajo peso molecular del ácido cinámico, para dar derivados de los ácidos truxílico y truxínico, como ya se indicó en el apartado 1.1.1 para el ácido cinámico.

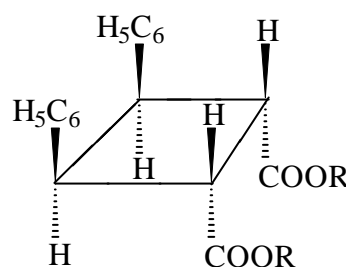


Se ha descrito (Tsuda, 1964) una relación entre el grado de esterificación del alcohol polivinílico con el cloruro de cinamoilo y la cantidad de luz necesaria para producir el entrecruzamiento. También se ha encontrado una relación entre el promedio del peso molecular y las sensibilidades relativas de los PVCN preparados.

El PVCN se irradió y posteriormente se analizaron los productos de hidrólisis del polímero entrecruzado, por cromatografía en papel (Bertoniere et al., 1971; Reiser, 1980). La presencia del ácido truxílico y no del ácido truxínico en el PVCN entrecruzado requería que hubiera alguna estereorregularidad intercadena. Se argumentó la necesidad de una ordenación por parte de los grupos cinamato para producir la formación del éster del ácido α -truxílico y no de otros isómeros tales como el ácido β -truxínico, de igual composición química pero diferente ordenación espacial de los grupos Ar- y -COOR.



Ácido α -Truxílico



Ácido β -Truxínico

Extrapolaciones de la exposición a tiempo cero indican un rendimiento cuántico de 0,34 (Moliner, 1986). Parece, por lo tanto, arriesgado basar conclusiones en observaciones de productos resultantes de largos tiempos de irradiación. Se realizó una comparación de la fotosensibilidad de PVCN con la fotodimerización del ácido cinámico en capas de alcohol polivinílico. Se encontró que tenía lugar tanto la fotoisomerización como fotodimerización. La absorción del espectro UV utilizado para seguir el curso de la reacción, mostraba un punto isobéptico junto a la intersección de una curva no isobéptica. Tales cambios complejos de curva indican que la fotoisomerización y por lo menos otra reacción, como la fotodimerización, estaban ocurriendo. Sin embargo, la curva de absorción UV correspondiente a la irradiación de PVCN muestra un punto no isobéptico, indicando que algo o nada de fotoisomerización tenía lugar. De hecho el

valor de longitud de onda de la $\lambda_{\text{máx}}$ cambiaba a longitud de onda más largas, así como el área total bajo la curva decrecía.

De las reacciones tipo dimerización podría esperarse el decrecimiento del área, pero no el cambio batocrómico de la longitud de onda. El mismo tipo de decrecimiento en absorción, acompañado del cambio de $\lambda_{\text{máx}}$, se observa cuando el 2-nitrofluoreno se utiliza como sensibilizador. Se estableció que el rendimiento cuántico del fotoentrecruzamiento decrecía en proporción al grado de desaparición de los dobles enlaces de los grupos cinamato. Además, se estudió el espectro ESR del PVCN irradiado a longitud de onda de 240-250 nm y a 77 K, observándose un ancho singlete y un cuartete. Estudios de la estabilidad de los compuestos, indican diferencias las cuales se atribuyen a la presencia de dos radicales, proponiendo el singlete ancho para el radical cinamoilo entrecruzado y el cuartete para el radical en la cadena, el cual se producía por abstracción de un hidrógeno de la cadena polimérica.

Se han postulado dos hipótesis para el mecanismo de fotoentrecruzamiento. Están basadas por un lado, en la fotociclodimerización de grupos cinámicos con formación de puentes ciclobutano entre las cadenas de polímeros, y por otro, en el entrecruzamiento resultante de los radicales libres formados durante la irradiación. Se han propuesto muchos argumentos por diferentes autores a favor de ambas hipótesis.

La formación fotoquímica de los dímeros tipo ciclobutano por los grupos cinamoilo, se ha descrito como la formación de un ciclo de cuatro miembros en un solo paso. Esta reacción relaciona la formación del ciclobutano a partir del etileno, desde el punto de vista de la conservación de la simetría orbital.

El mecanismo exacto del incipiente fotoentrecruzamiento no ha sido demostrado de una manera inequívoca. La participación simultánea de ambos mecanismos parece ser altamente probable.

La participación del estado excitado triplete del grupo cinámico en la reacción de fotoentrecruzamiento sí ha sido claramente demostrada, lo cual es de vital importancia para el estudio de la sensibilización. Este particular estado excitado puede producirse por una irradiación directa seguida de un cruce intersistema del singlete al triplete, o por transferencia de energía del triplete de una determinada sustancia (sensibilizador) al triplete del grupo cinámico. La presencia del oxígeno merma considerablemente el rendimiento de la reacción fotoquímica (Buettner, 1964). El papel competitivo del oxígeno, un eficiente bloqueador de tripletes, también se manifiesta en estas reacciones.

1.1.4.1 Química-Física del entrecruzamiento

En las secciones precedentes se ha presentado la química de este proceso, en este apartado se verán las consecuencias físicas del proceso químico.

En el entrecruzamiento las áreas irradiadas se hacen resistentes al disolvente por interconexión de cadenas de polímero formando una red.

Una descripción cualitativa (Montesinos, 1996) del proceso es la siguiente: Se da entrecruzamiento en las posiciones de los cromóforos individuales. En las primeras etapas esto conduce sólo a un pequeño aumento del peso molecular promedio del polímero pero cambia drásticamente la distribución de pesos moleculares en el sistema.

Como todos los cromóforos tienen a priori la misma probabilidad de excitación, en un sistema polidisperso, las moléculas grandes tendrán más probabilidad para reaccionar que las pequeñas. Por ello reaccionarán más fácilmente para dar una supermolécula muy ramificada, la cual forma una red continua tridimensional al seguir siendo irradiada. En dicha red el disolvente puede penetrar pero no dispersar las moléculas, por ello se forma, un residuo insoluble o gel.

Dicho gel constituye la imagen en fotografía polimérica. La formación de la imagen en una resina fotoentrecruzable es un proceso de gelificación fotoinducido.

El punto en el cual el gel aparece es el *punto de gel* del sistema (Reiser, 1980). En él sólo una pequeña fracción infinitesimal del material forma parte de la red. Si el entrecruzamiento continúa la mayoría de las moléculas se enlazan a la red y la fracción en peso de gel aumenta gradualmente.

La representación de la fracción en peso de gel formado, W , frente a la exposición que la causa, E , (dosis de radiación medida en fotones/cm²) da la *curva de gel* del fotopolímero, característica para cada material. Puede obtenerse también la curva de gel sustituyendo la fracción en peso de gel, W , por la densidad de entrecruzamiento, ρ , (unidades de monómero entrecruzadas/unidades de monómero totales del sistema).

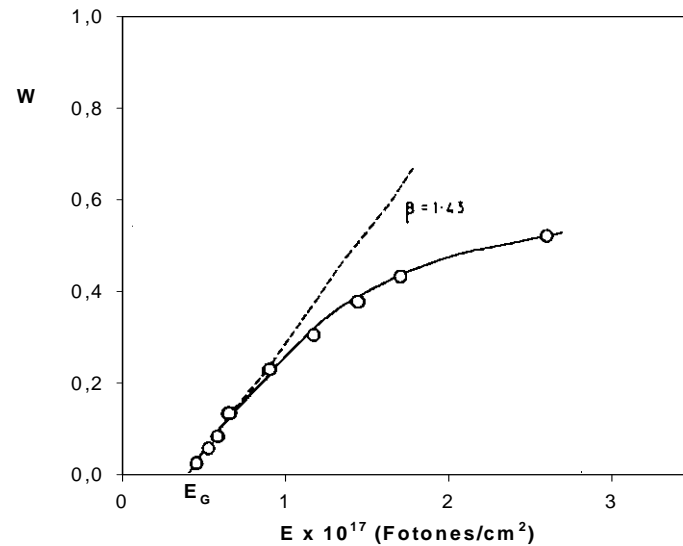


FIGURA 1.18

Curva de gel de un poliéster del ácido *p*-fenilén-diacrílico sensibilizado con 3% de la cetona de Michler e irradiado a 395 nm. β es la dispersividad en el peso molecular del polímero, W la fracción de gel, E la dosis de exposición en fotones/cm².

Como el gel constituye la imagen en fotorresinas entrecruzables, la curva de gel es también la curva de las características fotográficas de la fotorresina. El progreso del proceso de entrecruzamiento puede expresarse por la fracción en peso de gel o más comúnmente por el espesor relativo de la película que queda permanente en las áreas expuestas tras el revelado.

Sensibilidad y contraste fotográfico

En la Figura 1.18 la curva se origina bruscamente en el punto de gel, el cual marca la energía de exposición mínima requerida para la formación de la imagen incipiente (Reiser, 1980).

La exposición en el punto de gel o dosis de gel (E_G) es una medida de la sensibilidad fotográfica inherente al sistema sin referencia a una aplicación particular. La exposición para una aplicación específica es mayor de E_G y define un punto de trabajo en la curva de gel. En la Figura 1.18, el punto de trabajo podría ser alcanzado cuando la

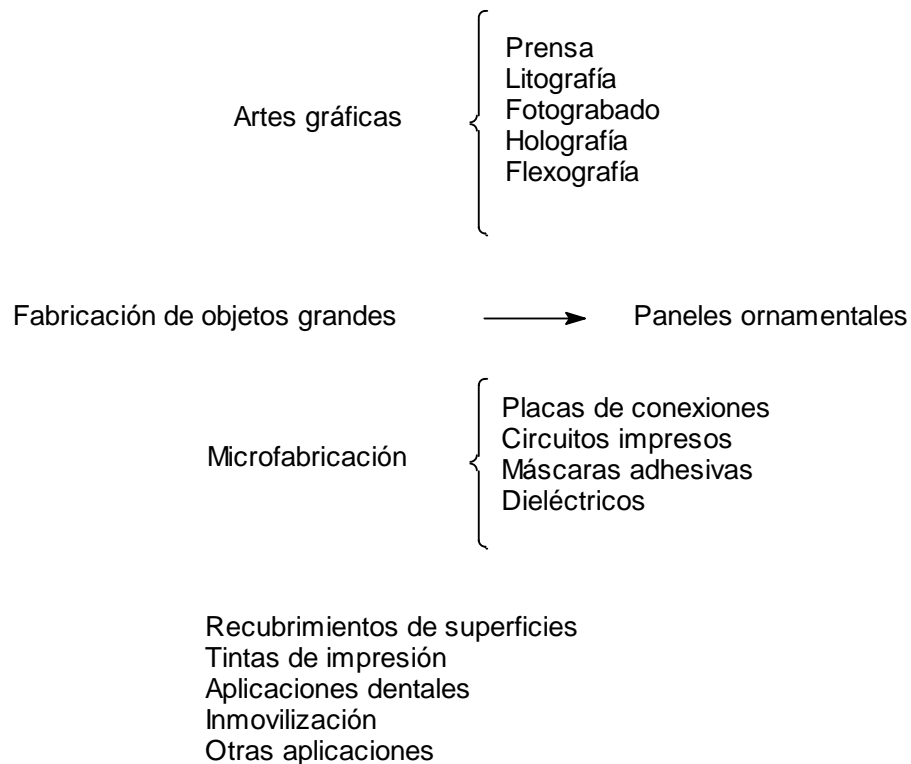
mitad de la resina en las áreas expuestas ha sido insolubilizada. Este punto de trabajo varía con la aplicación, mayor para máscaras de ataque ácido (o máscaras adhesivas) y menor en fotolitografía.

Como el punto de gel y el de trabajo difieren, la rapidez fotográfica de una resina depende no sólo de la posición de la curva de gel sino también de la pendiente inicial de la curva o más generalmente de su forma. La pendiente inicial de la curva de gel está relacionada con el contraste fotográfico de una resina. Los dos parámetros, dosis de gel y pendiente inicial de la curva de gel, proporcionan una adecuada caracterización del funcionamiento fotográfico de una fotorresina.

Una relación entre la dosis de gel E_G y las propiedades moleculares del fotopolímero pueden ser derivadas de la teoría de gelificación.

1.1.5 Aplicaciones

Entre las aplicaciones industriales y científicas más importantes que poseen los polímeros fotosensibles cabe mencionar los indicados en el esquema siguiente.



Las fases que se desarrollan durante el procesamiento (Montesinos, 1996) de una fotorresina que conducen al resultado final, tanto sea una placa de imprimir como un modelo de circuito integrado son las siguientes.

1. **Preparación del sustrato.** Se desengrasa y seca la superficie, e incluso algunas veces se trata con un promotor de adhesión.
2. **Capa de fotorresina.** Se distribuye la fotorresina sobre la superficie del sustrato con el espesor deseado. La película formada se dejará secar al aire.
3. **Pre-endurecido.** Tratamiento térmico para eliminar trazas de disolvente y liberar tensiones mecánicas en la película.
4. **Exposición.** Es la operación central del proceso de desarrollo de una imagen. El resultado final depende en gran medida de la radiación empleada, así como de la dosis irradiada de ésta.
5. **Revelado.** En una fotorresina negativa es el tratamiento de la lámina con un disolvente para eliminar las áreas no expuestas.
6. **Post-endurecido.** La placa se calienta para eliminar trazas de revelador y templar el polímero modelo, que ya puede ser usado como una máscara resistente al ataque ácido, para la realización del dibujo deseado sobre el metal, etc.
7. **Eliminación.** Una vez que se ha usado el modelo en una operación de manufactura, se quita de la superficie del sustrato lavando con un disolvente fuerte o por oxidación.

Esta es la secuencia general de operaciones, aunque de un sistema a otro existen variaciones dependiendo de las propiedades físicas y químicas que la resina deba tener. Sin embargo, el paso crítico será el del revelado.

Desde el punto de vista químico las aplicaciones difieren dependiendo de las propiedades del material que cambian por acción de la luz. Para ilustrar esto, puede considerarse el grado de entrecruzamiento de un monómero y considerar el grado de conversión como función de la dosis de radiación incidente. Así, al comienzo de la polimerización aumenta la densidad y por tanto se produce un aumento en el índice de refracción. Cuando la polimerización progresa, la temperatura de transición vítrea aumenta y el recubrimiento cambiará de un estado de goma a uno vítreo, aunque seguirá

siendo algo permeable al disolvente. Pero al aumentar la densidad de entrecruzamiento, el material se volverá resistente al disolvente (Reiser, 1989).

Estos cambios pueden controlarse (Delzenne, 1974; Brinkman et al., 1978; Trout et al., 1998; Narayanan y Scranton, 1997) y de acuerdo con la propiedad física que ha sido modulada por la radiación se obtienen sus distintas aplicaciones.

Así, las aplicaciones basadas en la *modulación de la solubilidad* son las más numerosas. Dentro de este apartado pueden considerarse las siguientes aplicaciones.

- 1. Artes gráficas.** Es una de las primeras y más extendida aplicación de las fotorresinas. Diferentes tipos de resinas han sido utilizadas para la elaboración de láminas de imprimir. Sin embargo la utilización de resinas capaces de ser polimerizadas por acción de la luz abrió el camino a la utilización de una gran variedad de nuevos productos, tanto para este fin como para otros usos.

Estos sistemas comprenden las placas litográficas (Toyama y Sakamoto, 1994), placas de texto impreso (Plambeck, 1956; Leekley y Sorensen, 1956; Koshimura et al., 1994) y placas flexográficas. Dentro de estos sistemas cabe destacar la microlitografía óptica empleada en microfabricación de elementos como circuitos integrados, etc., de gran importancia por la posibilidad de fabricar dispositivos cada vez más pequeños.

- 2. Recubrimiento de superficies.** Soluciones de poliésteres insaturados y estireno (Delzenne, 1974) se han usado desde 1960 para recubrir superficies de madera. La superficie se trata con el barniz y a continuación se irradia para formar una capa protectora (por copolimerización del éster con estireno). También se emplea para el tratamiento de las imperfecciones observadas en las planchas de mármol cortadas a partir de la roca caliza inicialmente obtenida.

Otro ejemplo lo constituye el recubrimiento de cubiertas de papel, de suelos vinílicos o el recubrimiento de fibras ópticas utilizadas ampliamente en telecomunicaciones. Los epoxiacrilatos (ésteres β -hidroxialquil acrílicos preparados por la acción del ácido acrílico sobre epoxi-resinas) se han mostrado válidos para esta aplicación y también de interés en otros usos.

- 3. Fotorresinas.** Se emplean en la elaboración de circuitos impresos, de modo que protejan a la lámina de cobre empleada del ataque ácido al que será sometida. De este modo el ácido atacará las partes no protegidas mientras

que aquellas en que la fotorresina estaba depositada no se verán afectadas. Posteriormente, la fotorresina será eliminada con un disolvente adecuado quedando la lámina de cobre con la imagen del circuito impreso deseada.

- 4. Otras aplicaciones.** Los polímeros fotosensibles, también se han usado para la elaboración de tintas de impresión UV, adhesivos, recubrimiento de fibras de vidrio (epoxiacrilatos) que de este modo quedarán reforzadas y empastes resistentes y cosméticamente atractivos (ésteres acrílicos).

Otras aplicaciones están basadas en la *modulación de la solubilidad y la adhesión* (Celeste, 1969). Dentro de estas aplicaciones deben mencionarse las “fotorresinas secas” que se usan en la fabricación de placas de conexiones, PWB (Imazu et al., 1994), y circuitos impresos, PCB (Fujitsu, 1986; Tanaka, 1995; Otawa, 1995; Buehler, 1993).

Otra aplicación muy importante de las fotorresinas secas es como máscaras adhesivas o de soldadura (Tsuji, 1994) en la fabricación de calculadoras y procesadores, para realizar las conexiones entre los diferentes componentes del circuito. A veces no se eliminan, sino que sirven como protector permanente del circuito (Fox, 1984).

Por su parte, las películas de fotograbado es una aplicación que se basa en la *modulación de la permeabilidad* (Gervay y Walker, 1973; 1974 y 1975) hacia, por ejemplo, medios ácidos acuosos de la película de polímero entrecruzado por efecto de la irradiación. Estas películas serán usadas como barreras frente al ataque de ácidos durante la preparación de placas o cilindros de fotograbado.

La *modulación del estado físico* de la fotorresina es la base de diversos sistemas de graduar color (Fan, 1977), en los que la imagen latente adhesiva fotogenerada se espolvorea con pigmentos, que luego se transformará en una imagen de color (Cohen y Fan, 1979).

Por último, se mencionará aquí la utilización de materiales holográficos, los cuales están basados en la *modulación del índice de refracción* (Chandross y Tomlinson, 1979; De Bagues, 1980; Colburn, 1997; Weber y Trout, 1994) de los fotopolímeros utilizados.

Además se destacará la utilización de estos materiales para la inmovilización de diferentes tipos de moléculas (aditivos, reactivos, etc.) y biomoléculas (enzimas, proteínas, células, etc.) que es la base del presente trabajo pues se centra en la inmovilización de enzimas. Esto será posible gracias a que los polímeros sintetizados tras la irradiación son muy insolubles en medio acuoso, que es el medio en que normalmente las enzimas se almacenan o reaccionan. Los polímeros sintetizados, serán portadores de

algún grupo reactivo adecuado (Fréchet, 1981) que reaccionará con otro grupo reactivo diana presente en las cadenas laterales de aminoácidos de las enzimas a inmovilizar.

1.1.6 Ventajas en la inmovilización

En el presente trabajo las reacciones de fotopolimerización se basan en la reacción de fotodimerización en estado sólido del ácido cinámico. Así, inicialmente el grupo cinamoilo será introducido en monómeros, convenientemente seleccionados, del modo indicado en la Figura 1.6, a través de grupos –OH libres presentes en el monómero mediante la formación de los ésteres del ácido cinámico correspondientes.

Las ventajas que ofrece la utilización de monómeros y/o polímeros fotoentrecruzables son numerosas y variadas. Algunas de ellas se enumeran a continuación:

- 1. Facilidad de preparación.** Para la obtención del sólido de inmovilización deseado, basta con la preparación de una disolución, en el disolvente adecuado, con la concentración previamente establecida del monómero, polímero o de los monómeros ya modificados que se deseen entrecruzar. Tras extender adecuadamente la disolución preparada y dejar evaporar el disolvente se procederá a su irradiación con la fuente luminosa adecuada. De esta manera se obtendrá el polímero final que se utilizará en la inmovilización.
- 2. Control de las características del polímero.** Eligiendo adecuadamente el o los monómeros de partida se podrá controlar las características hidrofóbicas y/o hidrofílicas del polímero final, grado de entrecruzamiento y por lo tanto capacidad adsorbente del sólido de inmovilización y limitaciones en la difusión de los sustratos y productos de reacción a través de éste. Además podrá decidirse de antemano la presencia de determinados grupos reactivos sobre el sólido de inmovilización dependiendo del mecanismo de inmovilización a utilizar. Todos estos parámetros podrán optimizarse y predeterminarse dependiendo de las características fisicoquímicas de la enzima a inmovilizar.
- 3. No utilización de disolventes orgánicos.** Una vez que la capa de sólido de inmovilización ha sido preparada tras la irradiación, ningún disolvente orgánico será requerido y sólo preparaciones acuosas son utilizadas. Esto facilita enormemente el trabajo a desarrollar con las enzimas, que no se verán afectadas por la presencia de compuestos orgánicos, que normalmente son desnaturizantes. Además, como el polímero final es más insoluble en

disolventes orgánicos que los monómeros de partida, en aquellos casos en que la enzima deba trabajar en medio orgánico, como ocurre en algunos casos con HRPc, los resultados no se verán afectados por la solubilización del sólido de inmovilización y por lo tanto eliminación de la enzima del lecho de reacción.

4. Elaboración de sistemas multicapa y/o sistemas multienzimáticos.

Aprovechando lo indicado en el punto 2 de este apartado, pueden prepararse capas superpuestas de diferentes sólidos de inmovilización por extensiones sucesivas de éstos. En cada capa puede haber determinados grupos reactivos que reaccionen con determinadas enzimas, de tal manera que si el grado de entrecruzamiento es el adecuado para la buena difusión de las enzimas a través de la red polimérica, cada una se inmovilizará en aquella capa que contiene el grupo reactivo apropiado. Así dispondremos de diferentes capas y en cada una, una determinada enzima. Esto permitirá, entre otras cosas, la realización de reacciones encadenadas en las cuales el producto de reacción de una enzima (capa de inmovilización) es sustrato de la enzima adyacente (capa siguiente de inmovilización).

1.2 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

1.2.1 Introducción

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos, frecuentemente en condiciones muy suaves, disolución acuosa neutra, en condiciones normales de temperatura y presión, y con una muy alta especificidad. Han sido utilizadas por los seres humanos desde tiempos ancestrales, mucho antes de que su naturaleza y mecanismos de acción fueran entendidos. Su utilización se ha ido extendiendo gradualmente a una variedad de campos diferentes como la fabricación de cerveza, producción de alimentos, medicina, mejora del medio ambiente, etc. El desarrollo producido en los últimos cincuenta años de la bioquímica ha permitido clarificar el mecanismo de las reacciones que catalizan, así como, el desarrollo de nuevas fuentes de enzimas. Esto, junto con el desarrollo de la microbiología aplicada ha extendido aún más el rango de aplicación de las enzimas. Sin embargo, las ventajas presentadas por las enzimas, en ocasiones pueden suponer serias desventajas. Así, generalmente son inestables, y no pueden emplearse en medios orgánicos o en condiciones no suaves como elevada temperatura y presión, valores de pH extremos, etc.

Convencionalmente, las reacciones enzimáticas han sido realizadas en un baño de mezcla completa, incubando una mezcla del sustrato con la correspondiente enzima soluble. Cuando la reacción ha finalizado, resulta difícil recuperar la enzima activa del medio de reacción, para poder ser utilizada nuevamente. Por ello, estas enzimas son generalmente eliminadas por desnaturalización mediante tratamiento térmico o pH extremos, siendo de este modo separadas del producto de la reacción por precipitación y posterior filtrado. Este tipo de procesos supone un doble problema. Por un lado, el económico derivado de la pérdida de enzima activa después de cada proceso, y por otro lado un problema medioambiental debido a la presencia, en los efluentes industriales, de enzima no eliminada en los procesos de desnaturalización y separación.

Para eliminar las desventajas que presentan tanto los catalizadores químicos ordinarios como las enzimas, y disponer de catalizadores con elevada actividad y estabilidad, así como de una apropiada especificidad, se han investigado dos posibilidades. Una posibilidad procede de las técnicas desarrolladas en síntesis orgánica y química de polímeros para sintetizar catalizadores que tienen actividad similar a la de las enzimas. Estos catalizadores en ocasiones se denominan *synzimas* (“enzimas sintéticos”). La segunda posibilidad es la modificación de enzimas producidas por organismos, y dentro de esta segunda opción, la inmovilización de enzimas es uno de los caminos estudiados. Si es posible inmovilizar enzimas, y que éstas mantengan su actividad y estabilidad, así como una apropiada especificidad por su sustrato, se eliminan la mayoría de las desventajas antes mencionadas. Además, como las enzimas actúan en condiciones muy suaves de presión y temperatura, su utilización en la industria química aporta una ventaja adicional puesto que reduce el consumo de energía. Como las enzimas inmovilizadas se consideran modificaciones de las enzimas, pueden ser también útiles para clarificar la relación entre la estructura de las proteínas y la actividad enzimática mostrada. Además, muchas proteínas están enlazadas a membranas celulares o partículas celulares en los organismos de procedencia. De este modo, las enzimas inmovilizadas son muy buenos modelos para el entendimiento del comportamiento de las enzimas en su entorno natural. Esto ha motivado el desarrollo de estudios de gran interés.

Ya desde principios del siglo pasado se puso de manifiesto que enzimas insolubilizadas por diferentes métodos, mantenían su actividad enzimática (Nelson y Griffin, 1916; Sumner, 1948). Sin embargo, los primeros intentos de inmovilizar una enzima con el fin de mejorar sus propiedades para una determinada aplicación no se realizaron hasta la segunda mitad del siglo pasado, con la inmovilización de

carboxipeptidasa, diastasa, pepsina y ribonucleasa (Grubhofer y Schleith, 1953). Posteriormente a los trabajos de Grubhofer y Schleith, muy pocos artículos fueron publicados sobre inmovilización de enzimas. Sin embargo, en la década de los años sesenta aparecieron muchos artículos, debiéndose destacar los trabajos del Profesor Katzir-Katchalski y colaboradores del Instituto de Ciencia de Weizmann en Israel. Realizaron estudios sobre nuevas técnicas de inmovilización, y propiedades físicas, químicas y enzimáticas de enzimas inmovilizadas. El objetivo de estos estudios era utilizar las enzimas inmovilizadas para la continua producción industrial. Así, en 1969 consiguieron la industrialización de un proceso continuo para la resolución óptica de DL-aminoácidos usando aminoacilasa inmovilizada. Esta fue la primera aplicación industrial de enzimas inmovilizadas.

Al final de la década de los sesenta el número de trabajos realizados sobre enzimas inmovilizadas tanto en Estados Unidos como en Europa aumentó de manera exponencial. Desde entonces, los estudios de enzimas inmovilizadas se han desarrollado a un paso rápido y, en la actualidad, Japón es uno de los principales países del mundo en este campo. Además de para la síntesis química, la inmovilización de sustancias fisiológicamente activas, incluyendo enzimas, ha sido desarrollada con éxito para obtener un proceso de aislamiento específico de sustancias biológicas, denominado cromatografía de afinidad. Deben destacarse, en este sentido, los trabajos del Profesor Porath en Suecia y de los Profesores Anfinsen y Cuatrecasas de Estados Unidos.

Aunque todos los organismos vivos producen enzimas, las de origen microbiano son más convenientes para los propósitos industriales por las siguientes razones: el coste de producción es bajo; las condiciones de producción no están restringidas por la situación o temporada; el tiempo necesario para la producción es corto y es posible la producción de masa, lo cual afecta de modo muy positivo al rendimiento del proceso. Las enzimas producidas por las células microbianas pueden clasificarse en dos grupos: enzimas extracelulares e intracelulares. Por un lado se encuentran las enzimas excretadas de las células en el medio de crecimiento, y por otro las enzimas retenidas en las células durante su cultivo. Para la utilización de las enzimas intracelulares, primero es necesario extraerlas de las células microbianas. Sin embargo, generalmente son inestables, y no son convenientes para su utilización posterior. Por ello cuando alguna enzima o sistema multienzimático de células microbianas es de especial interés puede ser utilizado "in vivo" en lugar de extraerlo y utilizarlo después. Para ello se condicionará a las células microbianas a la utilización de estas actividades enzimáticas mediante la aportación, en el medio de crecimiento, de determinados nutrientes. Así, para evitar la

necesidad de extraer enzimas de células microbianas o para utilizar sistemas multienzimáticos de las células, se han desarrollado técnicas para la inmovilización de células microbianas enteras.

Las enzimas inmovilizadas son definidas como “enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida de espacio con retención de su actividad catalítica y que puede ser usado repetidamente y de modo continuo” (Chibata, 1978). Por consiguiente, enzimas modificadas a una forma insoluble en agua satisfacen esta definición. También, cuando se realiza una reacción enzimática usando un sustrato de alto peso molecular en un reactor equipado con una membrana de ultrafiltración semipermeable, y se forma un producto de reacción de bajo peso molecular que puede eliminarse continuamente a través de la membrana sin fuga de la enzima del reactor, también puede considerarse como un tipo de enzima inmovilizada.

El término “enzima inmovilizada” fue recomendado en la primera Conferencia de Ingeniería Enzimática en 1971, puesto que con anterioridad a esta fecha otros muchos términos fueron empleados. Además fue propuesta una clasificación de enzimas inmovilizadas mostrada en la Figura 1.19. Las enzimas se clasifican en nativas y modificadas. Las enzimas inmovilizadas en su mayor parte pertenecen al tipo de enzimas modificadas que también incluye a enzimas solubles modificadas químicamente y biológicamente (genéticamente). Así, para su uso como catalizadores, las enzimas pueden utilizarse en las tres formas siguientes:

- a) Forma soluble.
- b) Forma soluble inmovilizada.
- c) Forma insoluble inmovilizada.

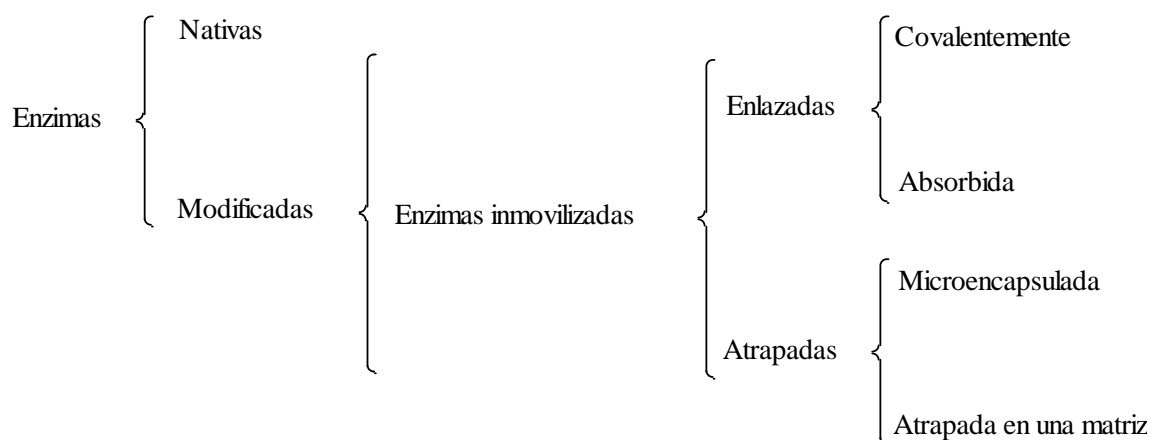


FIGURA 1.19 Clasificación de enzimas inmovilizadas.

Los métodos de inmovilización de enzimas se clasificarán del modo indicado en la Figura 1.20.

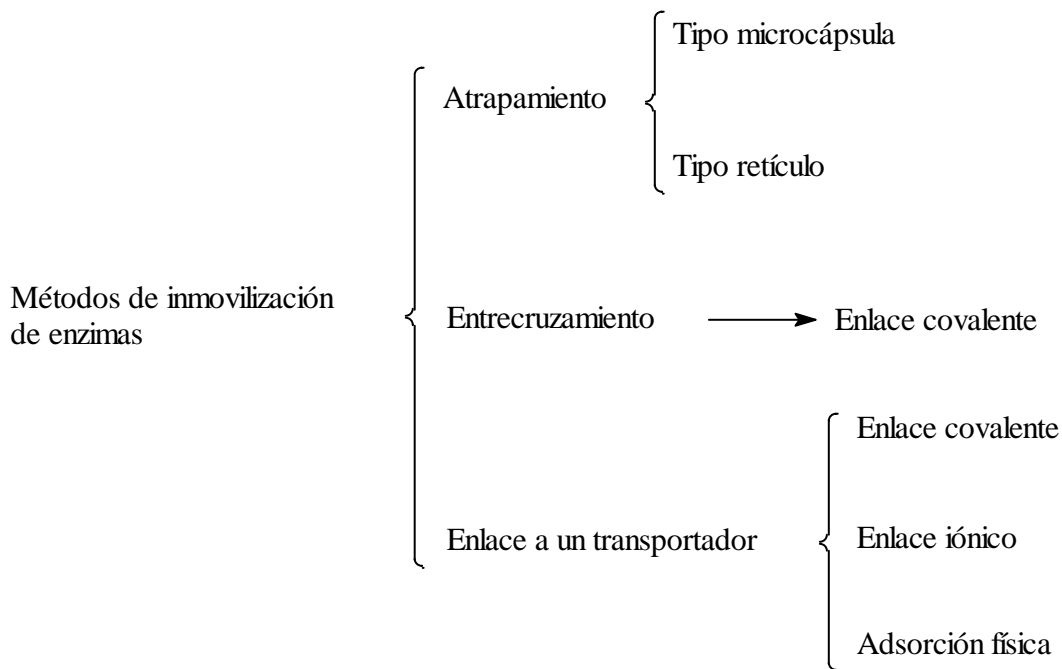


FIGURA 1.20 Clasificación de métodos de inmovilización de enzimas.

Excepto para el caso en que se usa una membrana de ultrafiltración, las enzimas inmovilizadas son insolubles en agua, y por lo tanto la reacción enzimática se realiza en un medio heterogéneo. Por ello se deberán establecer definiciones y expresiones de los parámetros cinéticos de enzimas inmovilizadas. La actividad de enzimas inmovilizadas debe expresarse como velocidad de reacción inicial ($\mu\text{mol}/\text{min}$) por mg de preparación de enzima inmovilizada seca. Cuando la enzima se enlaza a superficies de diferentes tipos de matrices (tubos, placas, membranas, perlas de vidrio poroso, etc.) la actividad debe expresarse como velocidad de reacción inicial ($\mu\text{mol}/\text{min}$) por unidad de área de la superficie utilizada. Para estas medidas, la temperatura de reacción, la velocidad de agitación, y otras condiciones de reacción deben establecerse y describirse claramente. También deben ser establecidos y descritos los siguientes aspectos:

- a) Condiciones de secado de la preparación de enzima inmovilizada.
- b) Contenido de proteína de la preparación seca.
- c) Actividad específica de la enzima usada para la inmovilización.

Además, las constantes cinéticas medidas con enzimas inmovilizadas no son verdaderas constantes cinéticas equivalentes a las obtenidas en un medio de reacción

homogéneo con las enzimas solubles. Se tratará de valores aparentes debido a los efectos de difusión y otros factores físicos que tengan lugar. Por lo tanto, hablaremos de velocidad máxima aparente ($V_{\text{máx}}^{\text{app}}$) y constante de Michaelis aparente (K_m^{app}). Cualquier otra constante cinética calculada también deberá expresarse como la correspondiente constante aparente.

En los estudios de estabilidad de enzimas inmovilizadas, deben detallarse las condiciones específicas usadas para las medidas de estabilidad. Del mismo modo cuando se desarrolla un nuevo “portador” o soporte para la inmovilización de enzimas, deberá describirse sus propiedades y características tales como número de grupos reactivos por unidad de peso, máxima cantidad de proteína enlazada a un peso especificado de “portador”, etc., así como aquellas propiedades que supongan alguna novedad y/o ventaja frente a los soportes de la misma naturaleza ya empleados para el mismo fin.

1.2.2 Métodos de inmovilización de enzimas

Para que las enzimas puedan llevar a cabo su proceso catalítico es esencial una conformación específica y un centro activo que interaccione con el sustrato. El centro activo está formado por el sitio reactivo o catalítico que participa en la acción catalítica, y por el sitio de enlace que controla la especificidad de la enzima por el sustrato. Estos sitios están compuestos de varios residuos de aminoácidos contenidos en una relación espacial específica. También es importante para la actividad catalítica la estructura terciaria y/o cuaternaria de la enzima. Por lo tanto, para retener la actividad catalítica de la enzima cuando es inmovilizada, es necesario retener su estructura nativa tanto como sea posible. Por ello, la inmovilización debe realizarse bajo condiciones suaves y controladas. Si los residuos de aminoácidos del centro activo, o la estructura terciaria y/o cuaternaria fuera alterada, la actividad catalítica podría disminuir y algunas propiedades enzimáticas, como especificidad por el sustrato, podrían cambiar.

Entre los grupos funcionales presentes en las enzimas y que pueden estar implicados en su inmovilización pueden considerarse grupos amino y carboxilo libres, grupos sulfhidrilo de cisteína, grupo imidazol de histidina, grupos fenólicos, y grupos hidroxilo de serina y treonina. En cualquier caso los residuos de aminoácidos presentes en el centro activo de la enzima así como aquellos especialmente implicados en el mantenimiento de la estructura terciaria y/o cuaternaria de la enzima no se verán involucrados en las reacciones que conducen a la inmovilización de la enzima. Por lo

tanto, reacciones a alta temperatura y valores de pH extremos, así como disolventes orgánicos o concentraciones salinas elevadas deberán ser descartadas para preservar la integridad estructural de las enzimas y evitar así su desnaturalización y pérdida de actividad.

A continuación se describen los métodos de inmovilización de enzimas indicados en la clasificación mostrada en el apartado anterior 1.2.1 (Arroyo, 1998; Tischer y Wedekind, 1999).

1.2.2.1 Método de enlace a un soporte

En este caso la enzima se enlaza a un soporte insoluble en agua. Este método es el más antiguo de los métodos de inmovilización de enzimas. Debe prestarse especial cuidado en la selección del soporte de inmovilización así como en las técnicas de enlace a emplear. Tanto la cantidad de enzima enlazada como su actividad después de la inmovilización, dependen marcadamente de la naturaleza del soporte elegido. Aunque la selección del soporte de inmovilización también depende de la naturaleza de la propia enzima a inmovilizar, deberán considerarse el tamaño de partícula, el área superficial, la relación molar de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos y la composición química. En general, un aumento en la relación de grupos hidrofílicos y en el área superficial conducen a un aumento en la cantidad de enzima enlazada por unidad de soporte, lo que resulta en una superior actividad de la enzima inmovilizada. Esto no siempre ocurre del modo aquí indicado, como se comprobará en el desarrollo del presente trabajo.

Para la inmovilización de enzimas suelen utilizarse como soportes los derivados de polisacáridos como celulosa, dextrano, agarosa y gel de poliacrilamida. Algunos son disponibles bajo nombres comerciales como Sephadex, Sepharosa, Bio-Gel, etc. También ha sido desarrollado para la inmovilización de enzimas un vidrio poroso de tamaño de poro controlado. Este último, al igual que otras matrices inorgánicas usadas para la inmovilización de enzimas, no estará sujeto al ataque microbiano, no cambia de configuración en un extenso rango de pH y en diferentes tipos de disolventes, y, con su gran rigidez, inmoviliza una gran cantidad de enzima.

Este método de inmovilización puede ser dividido, a su vez, en tres categorías según el tipo de enlace involucrado en el proceso de inmovilización:

Método de adsorción física

Este método está basado en la adsorción física de enzimas sobre la superficie de soportes insolubles en agua. Normalmente este método no provoca cambios conformacionales de la enzima o destrucción de su centro activo. Si se produce algún cambio, éste será muy pequeño. Por consiguiente, si se encuentra un soporte adecuado para una enzima particular, este método puede ser a la vez simple y efectivo. Sin embargo, este método tiene la desventaja que la enzima adsorbida puede escapar del soporte durante su utilización, puesto que las fuerzas de enlace entre la enzima y el soporte son relativamente débiles. Son muchas las enzimas inmovilizadas por este método y entre ellas destacaremos β -galactosidasa y peroxidasa que serán objeto del presente trabajo.

Como soportes, para este método, se han empleado materiales inorgánicos tales como carbón activado, vidrio poroso, arcilla ácida, arcilla de blanquear, caolinita, alúmina, gel de sílice, bentonita, hidroxiapatita, gel de fosfato cálcico, etc., así como polímeros naturales como almidón y gluten (Bódalo et al., 1991a; Bódalo et al., 1991b) o sintéticos (Li y Townshend, 1998). En algunos trabajos, se ha relatado que la adsorción de la enzima dependió del tratamiento mediante radiofrecuencias (Chen et al., 1993) o temperaturas elevadas (Bogdanovskaya et al., 1999) a que es sometido el soporte previo a la inmovilización.

También se ha descrito la inmovilización de enzimas mediante enlaces hidrofóbicos a soportes (Visser y Strating, 1975; Klint et al., 1995) como los que se dan en el presente trabajo para la enzima HRPc inmovilizada sobre derivados total o parcialmente cinamoilados de azúcares por la afinidad mostrada por esta enzima hacia los grupos cinamoilo presentes en nuestros soportes de inmovilización.

También, enzimas, como por ejemplo β -galactosidasa, pueden ser fácilmente inmovilizadas usando un adsorbente que contiene taninos como ligando (Tosa et al., 1977; Mori et al., 1977; Watanabe et al., 1977). El adsorbente es preparado por reacción del tanino previamente activado con CNBr o epíclorhidrina con aminohexil celulosa. El adsorbente, así preparado, puede usarse para la inmovilización de muchos tipos de enzimas mediante la implicación de fuerzas hidrofóbicas entre el soporte y la enzima.

La principal ventaja de este método es su gran simplicidad, puesto que el enlace se produce por simple exposición de la enzima al soporte de inmovilización en unas condiciones suaves. Pero su desventaja es que la enzima adsorbida depende de factores como pH del medio, temperatura, fuerza iónica y presencia del sustrato y/o producto, de

modo que puede liberarse fácilmente si cambia significativamente alguno de estos factores.

Método de enlace iónico

Este método se basa en el enlace iónico de enzimas a soportes insolubles en agua que contienen residuos intercambiadores de iones. En estos casos, se retiene parte de la enzima también por adsorción sobre el soporte de inmovilización empleado (Peralta-Zamora, 1998; Onda et al., 1996). Como soportes de inmovilización para este método, pueden usarse polisacáridos y polímeros sintéticos que contienen residuos intercambiadores de iones. Al igual que ocurre con el método de adsorción física, el enlace se realiza fácilmente y en condiciones suaves en comparación con el método de enlace covalente. Por lo tanto, este método no causa cambios de conformación y en el sitio activo de la enzima, o si los causa, éstos son pequeños, conduciendo a enzimas inmovilizadas que tienen alta actividad catalítica, en muchos casos. Como la fuerza de los enlaces entre la enzima y el soporte son menos fuertes que en el enlace covalente, podrá ocurrir pérdida de la enzima cuando la disolución de sustrato posea elevada fuerza iónica, o por variación del pH del medio.

El primer trabajo en el que este método de inmovilización fue utilizado, consistió en la inmovilización de catalasa sobre DEAE-celulosa (Mitz, 1956). También, se ha descrito la inmovilización, por este método, de enzimas previamente modificadas químicamente, mediante la formación de enlaces covalentes, para aumentar la carga presente en la enzima (Solomon y Levin, 1974; Chaga, 1994). De este modo la enzima modificada se enlazó más fuertemente a un soporte con grupos intercambiadores de iones que la enzima no modificada, y fue, además, mucho más estable.

Método de enlace covalente

Este método está basado en el enlace de enzimas a soportes insolubles en agua mediante la formación de enlaces covalentes. Entre los grupos funcionales presentes en las enzimas, aquellos que participan en la formación del enlace covalente con el soporte de inmovilización son grupos α - o ϵ -amino, grupos α -, β - o γ -carboxilo, grupos sulfhidrilos, grupos hidroxilo, grupos imidazol y grupos fenólicos. Estos grupos reaccionarán con soportes que contengan grupos reactivos apropiados tales como diazonio, azida de ácido, isocianato y haluros.

En este tipo de inmovilización, la selección de las condiciones para la inmovilización es más difícil que en los dos casos anteriores. Son condiciones

relativamente complicadas y no suaves. Por ello, en algunos casos, el enlace covalente altera la estructura conformacional y el centro activo de la enzima, conduciendo a una mayor pérdida de la actividad catalítica y/o cambios en la especificidad hacia el sustrato, sobre todo si en el proceso de inmovilización se ha implicado algún residuo de aminoácido, esencial para la actividad catalítica. Sin embargo, la fuerza de los enlaces formados entre la enzima y el soporte de inmovilización es fuerte, y no se producirá pérdida de la enzima en presencia del sustrato, disoluciones salinas de elevada fuerza iónica o por cambio en el pH del medio de reacción.

A continuación se citan algunos de los tipos de inmovilización covalente más frecuentemente empleados:

a. Formación de enlaces diazo. Este método está basado en el enlace de enzimas a soportes insolubles en agua que contienen grupos diazonio. Es decir, los soportes que contienen grupos amino aromáticos se diazotan con ácido nitroso, y luego el derivado de diazonio formado se hace reaccionar con grupos apropiados de la enzima del modo indicado en la Figura 1.21.

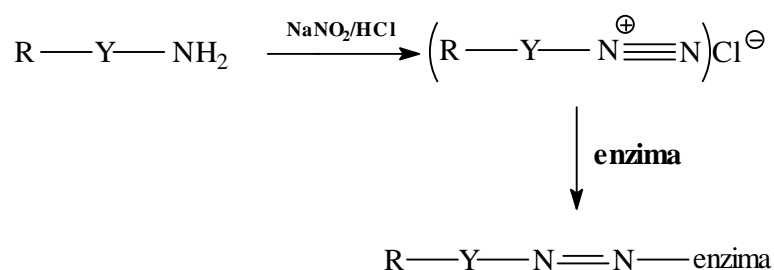


FIGURA 1.21 Acoplamiento diazo.

Los grupos funcionales presentes en las enzimas que participan en el enlace diazo son grupos amino libres, el grupo imidazol de histidina y el grupo fenólico de tirosina. Son muchas las enzimas que han sido inmovilizadas por este método. Entre ellas volveremos a mencionar β -galactosidasa (Woychik y Wondolowski, 1972; Wierzbicki et al., 1974; Manjón et al., 1985) ya que es una de las enzimas que será inmovilizada en este trabajo.

Los soportes comúnmente empleados para este método de inmovilización se enumeran a continuación.

a.1. *Derivados de polisacáridos.* Entre los derivados de polisacáridos que contienen grupos amino aromáticos pueden mencionarse: *p*-aminobencil celulosa, *m*-aminoanisol celulosa, *m*-aminobencil-oximetil celulosa, *p*-aminobenzoil celulosa, 3-(*p*-aminofenoxi)-2-hidroxiopropionil celulosa, 3-(*p*-amino-*m*-metilnilino)-5-cloro-triazinil celulosa, Sephadex-antraniléster, almidón-metilén dianilina compuesto, etc. Las estructuras de algunos de estos derivados se representan en la Figura 1.22. De todos ellos los más utilizados son los derivados de celulosa, y de éstos el más comúnmente usado es el *p*-aminobencil celulosa. El derivado de diazonio de este soporte fue primero utilizado para inmovilizar albúmina de suero bovina (Campbell et al., 1951), y después se empleó para el aislamiento de anticuerpos específicos de suero de conejo. Posteriormente, este soporte fue utilizado para la inmovilización de muchas enzimas.

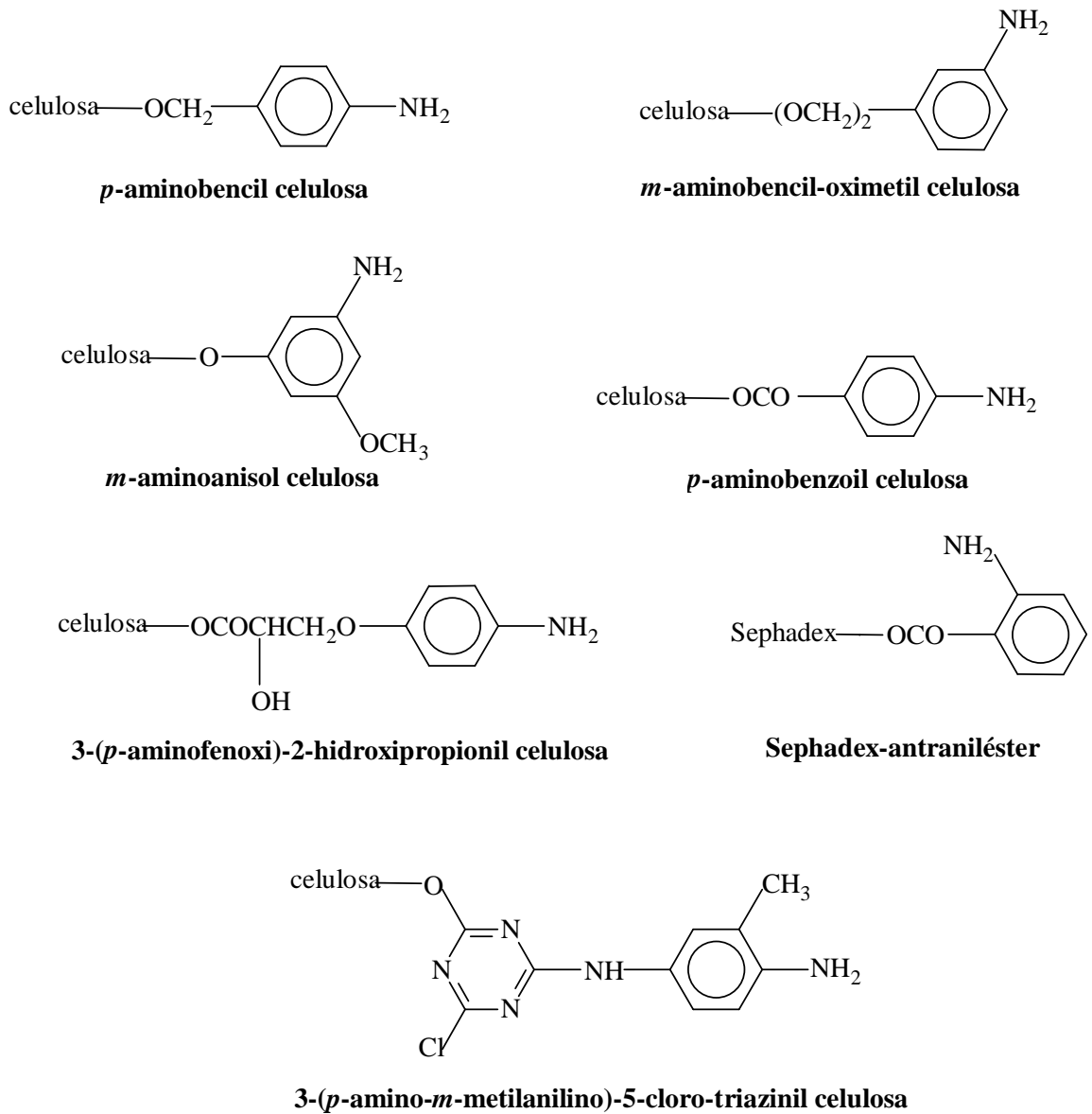


FIGURA 1.22

a.2. *Copolímeros de aminoácidos.* Los copolímeros de aminoácidos aquí mencionados se preparan por condensación de anhídridos de N-carboxi-aminoácidos. La Figura 1.23 muestra el esquema de esta condensación.

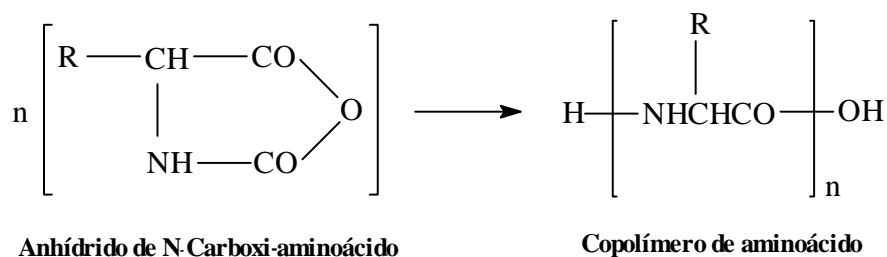


FIGURA 1.23 Síntesis de copolímeros de aminoácidos.

Las condiciones en que se inmovilizan las enzimas sobre los derivados de diazonio citados son más bien suaves. Así, la enzima ureasa ha sido inmovilizada por agitación de una mezcla de disolución de enzima con un copolímero diazotado a 4°C durante 20 h, obteniendo un producto de inmovilización con elevada actividad catalítica.

a.3. *Derivados de poliacrilamida.* Estos derivados están disponibles comercialmente como Bio-Gel o Enzacryl. Así, Enzacryl AA, tras ser diazotado puede utilizarse para la inmovilización de diferentes enzimas, según el esquema propuesto en la Figura 1.24.

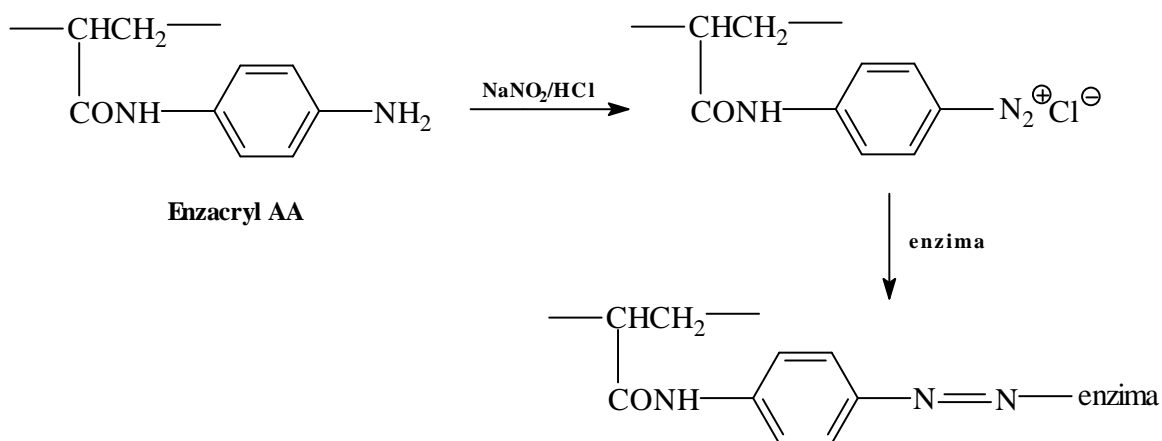


FIGURA 1.24 Enlace diazo a derivados de poliacrilamida.

El inconveniente es que estos soportes son relativamente caros y por ello han sido poco utilizados para la inmovilización de enzimas.

a.4. *Resinas de estireno.* Para la elaboración de resinas de este tipo se ha empleado poliaminopoliestireno (A) y un copolímero de metacrilato-*m*-aminoestireno (B), cuyas estructuras se muestran en la Figura 1.25.

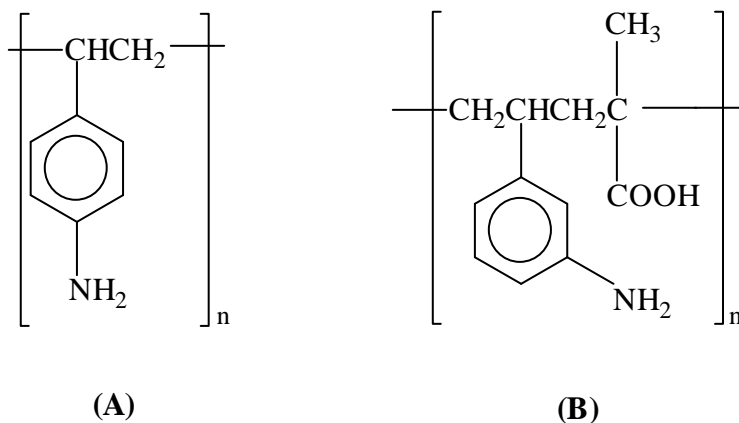


FIGURA 1.25 Resinas de estireno.

Del mismo modo que ocurre con los soportes vistos con anterioridad, las resinas de estireno pueden utilizarse para la inmovilización de enzimas tras la diazotación del modo indicado en la Figura 1.21. La preparación con la enzima inmovilizada se empaqueta en una columna y es utilizada para la reacción enzimática, haciendo recircular de modo continuo la disolución de sustrato.

a.5. *Copolímeros de etileno y ácido maleico.* Para la inmovilización de enzimas por el método diazo se ha empleado el derivado diaminodifenilmetano de este copolímero. Su estructura es la de la Figura 1.26.

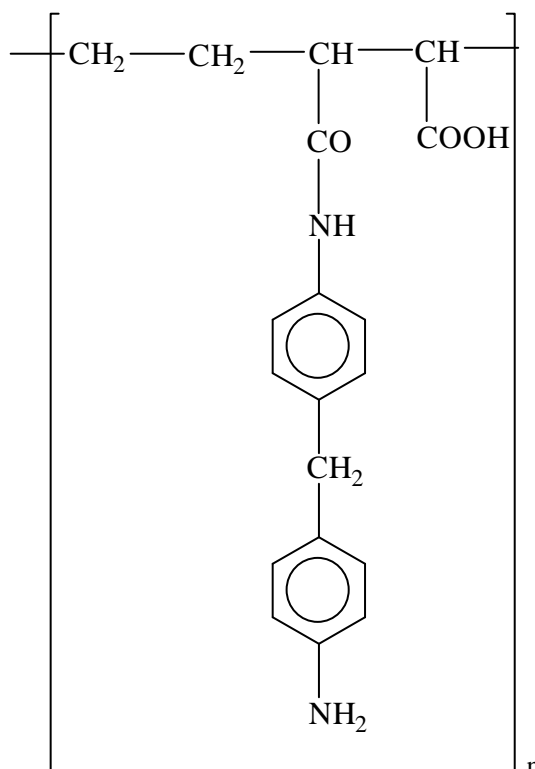


FIGURA 1.26 Derivado diaminodifenilmetano de un copolímero de etileno y ácido maleico.

a.6. Derivados aminosilano de vidrio poroso. Estos soportes fueron desarrollados para la inmovilización de enzimas por el Profesor Weetall y sus colaboradores (Corning Glass Works), y han sido utilizados para la inmovilización de un gran número de enzimas. Los grupos aminoalquilo se incorporan al vidrio poroso por reflujo de este último con γ -aminopropiltriétoxosilano en tolueno. El producto resultante se hace reaccionar con cloruro de *p*-nitrobenzoílo para producir un *p*-nitrobenzoil derivado que por reducción dará lugar a la amina primaria correspondiente. Esta última será diazotada para producir la sal de diazonio que será finalmente enlazada a la enzima del modo indicado en la Figura 1.21 (Weetall, 1969; Bódalo et al., 1991a). La estructura del derivado final, preparado para la inmovilización se muestra en la Figura 1.27.

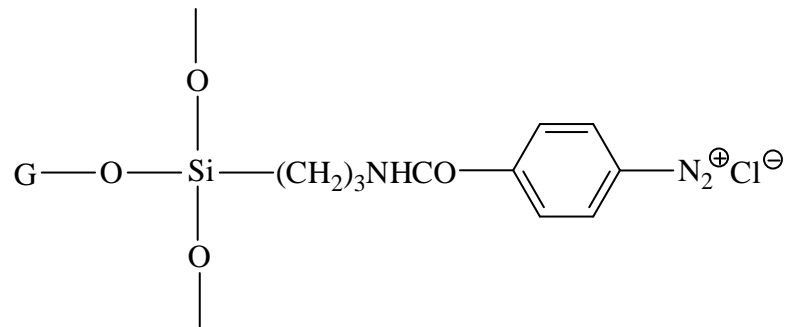


FIGURA 1.27 Derivado aminosilano de vidrio poroso.

b. Formación de enlaces peptídicos. Este método es una aplicación de la tecnología de síntesis de proteínas, y está basado en la formación de enlaces peptídicos entre la enzima y un soporte insoluble en agua. Tanto β -galactosidasa (Mattiasson y Mosbach, 1971; Gregor y Rauf, 1975) como HRPc (Henry et al., 1974; Weliky et al., 1969; Brown et al., 1974) han sido inmovilizadas, en numerosas ocasiones, empleando diferentes procedimientos clasificados dentro de este método de inmovilización. También se han inmovilizado otras muchas enzimas por este método, empleando para ello una gran variedad de soportes.

Los soportes empleados para la inmovilización de enzimas mediante el método aquí mencionado se describen a continuación:

b.1. Derivados de azida de ácido. Carboximetil celulosa (CM-celulosa) se convierte en su metiléster correspondiente por esterificación con metanol en medio ácido. Este último dará lugar a un derivado hidrazida por reacción con hidrazina, que a su vez reaccionará con ácido nitroso para formar el correspondiente derivado de azida que será capaz de inmovilizar enzimas por reacción a baja temperatura (Mitz y Summaria, 1961). La secuencia de reacciones que tiene lugar se esquematiza en la Figura 1.28.

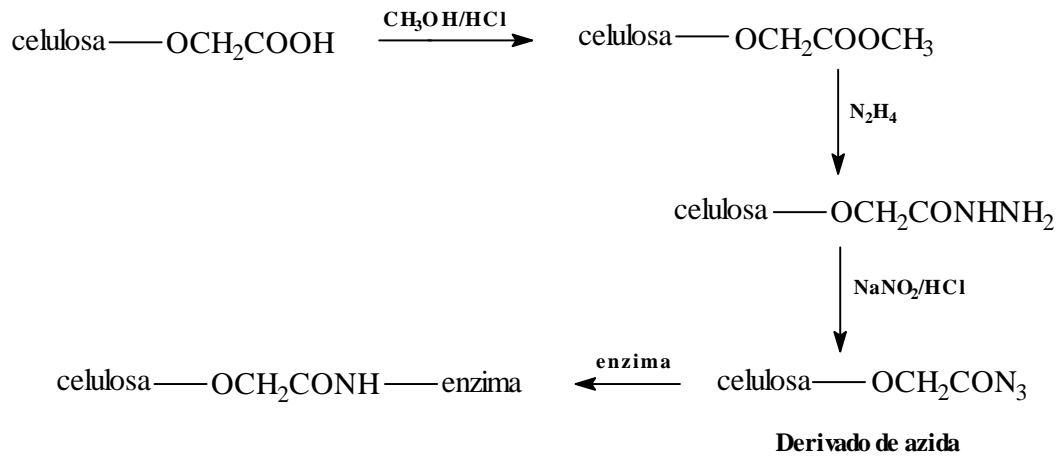


FIGURA 1.28 Derivados de azida de ácido.

Enzacryl AH es un derivado de hidrazida de poliacrilamida que puede ser convertido a su derivado de azida del modo indicado arriba y usado para la inmovilización de enzimas, del modo indicado en la Figura 1.29.

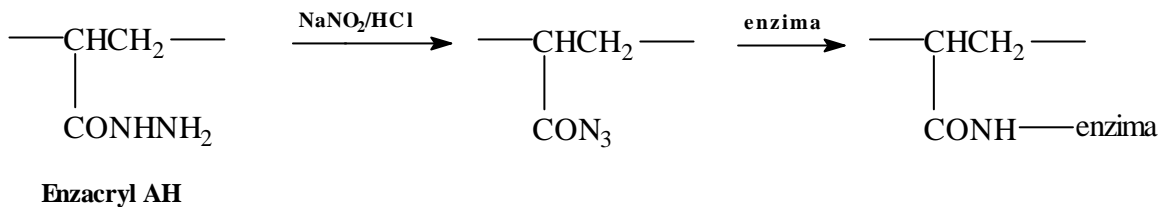


FIGURA 1.29 Inmovilización de enzimas con Enzacryl AH.

b.2. Resinas de cloruro de carboxilo. Estas resinas se preparan por reacción de cloruro de tionilo sobre resinas que contienen residuos de ácidos carboxílicos (A). Estas resinas contienen residuos de cloruro de ácido (B), muy reactivos, que reaccionarán a baja temperatura con grupos amino libres presentes en la enzima a inmovilizar (Kinoshita et al., 1966). El esquema de la reacción que tiene lugar se muestra en la Figura 1.30.

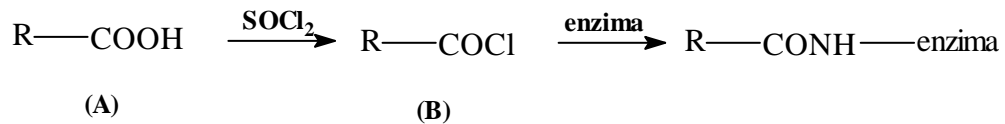


FIGURA 1.30 Resinas de cloruro de carboxilo.

Como resinas que contienen restos de ácidos carboxílicos y que pueden emplearse para la inmovilización de enzimas por el método aquí descrito, pueden citarse, Amberlita XE-64, Amberlita-IRC-50, etc.

b.3. Derivados de anhídrido maleico. En este apartado se considerarán copolímeros de anhídrido maleico con etileno, estireno, butanodioldiviniléter, metil vinilo, isobutil vinil éster etc., como soportes para la inmovilización de gran cantidad de enzimas (Levin et al., 1964; Goldstein et al., 1964). La reacción puede realizarse en presencia de hexametilén diamina que provocará un entrecruzamiento entre cadenas de copolímero, pudiendo dar lugar a redes tridimensionales en cuyo interior se encontrará la enzima inmovilizada mediante la formación de enlaces peptídicos entre grupos amino libres de la enzima y los restos de anhídrido maleico presentes en el copolímero.

b.4. Derivados de isocianato. Los derivados de isocianato pueden obtenerse por reacción de un soporte que contiene grupos amino aromáticos con fosgeno a pH alcalino, o bien calentando un derivado de azida de ácido con ácido clorhídrico. Estos derivados de isocianato, posteriormente, podrán utilizarse para la inmovilización de enzimas como se indica en la Figura 1.31.

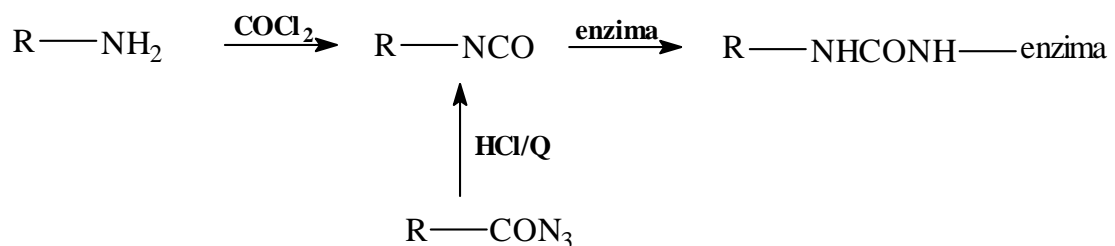


FIGURA 1.31 Derivados de isocianato.

Como soportes insolubles en agua para este método, puede emplearse polisacáridos como CM-celulosa y Sephadex, y poliaminoestireno, todos ellos descritos en apartados anteriores. La Figura 1.32 describe la secuencia de reacciones que tendrán lugar para la utilización de poliaminoestireno por este método de inmovilización.

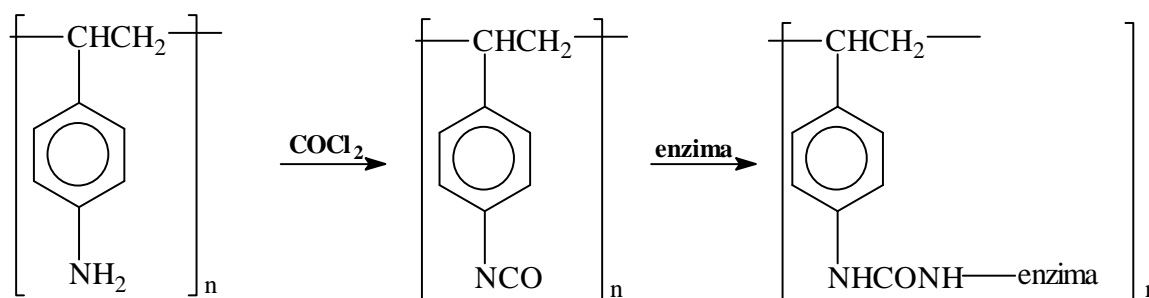


FIGURA 1.32 Derivado de isocianato de poliaminoestireno.

b.5. Polisacáridos activados con CNBr. Este método supone la activación de polisacáridos con bromuro de cianógeno para dar un carbamato inerte y un imidocarbonato reactivo a través de un intermedio ciano-derivado. Posteriormente, el imidocarbonato reactivo, reaccionará con la enzima. Las estructuras de las diferentes especies químicas y posterior reacción del imidocarbonato con la enzima se muestran en la Figura 1.33. La reacción de imidocarbonatos con los grupos amino libres presentes en las enzimas dará lugar a estructuras del tipo isoureas N-sustituidas, imidocarbonatos N-sustituidos y carbamatos N-sustituidos como se indica en la Figura 1.33. Sin embargo, de las tres estructuras posibles, la que tiene mayor probabilidad de que se produzca o que se producirá en mayor cantidad será la estructura del tipo isourea (Svensson, 1973; Jost et al., 1974).

Este método de inmovilización es simple y se realiza en condiciones suaves. La reacción de acoplamiento transcurre mejor a pH 9,0 aunque, normalmente, se prefiere usar un pH más neutro. Por ello es una técnica muy aplicable y ha sido empleada para la inmovilización de muchas enzimas (Axén et al., 1967; Asther y Meunier, 1993; Husain et al., 1996).

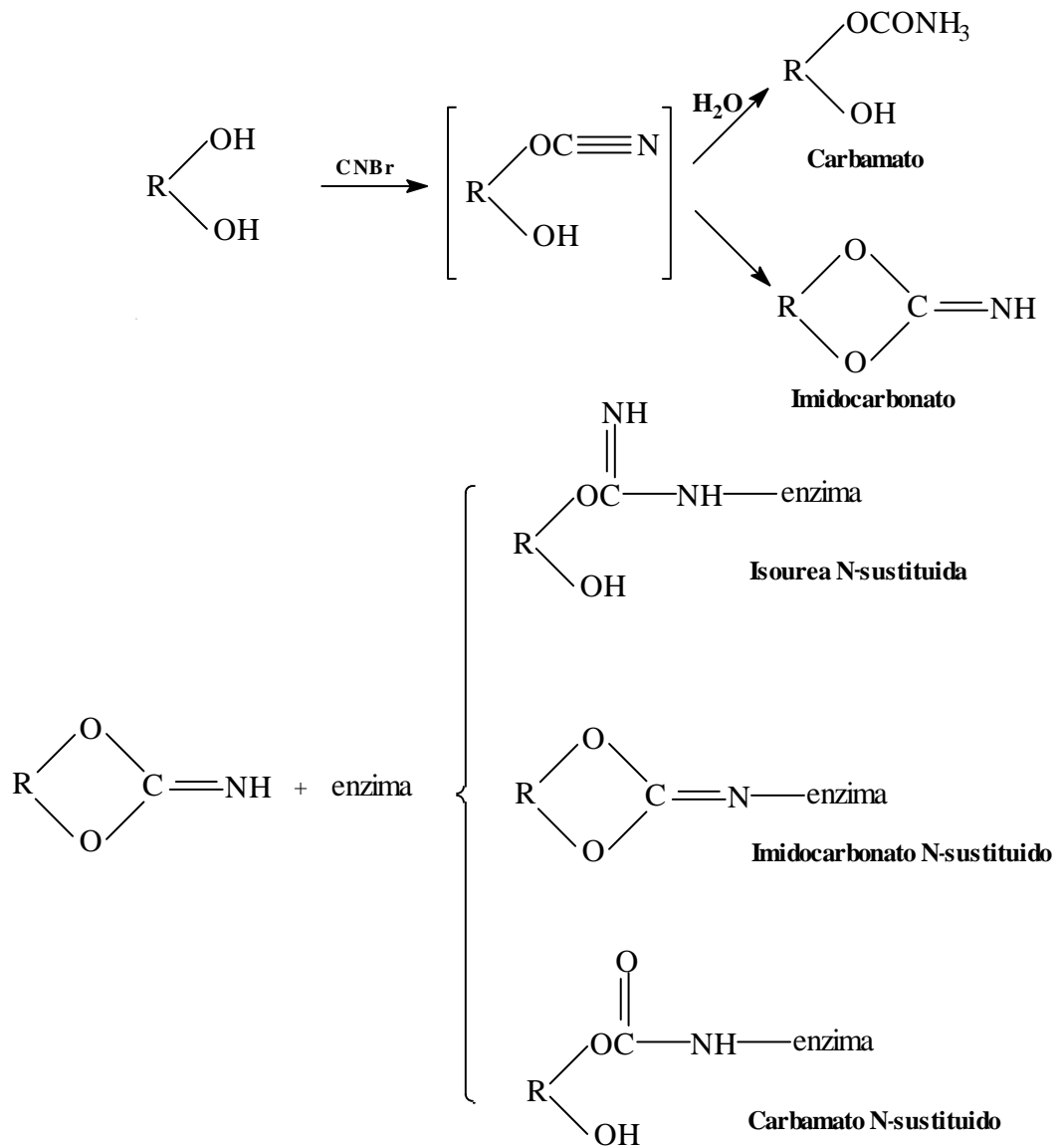


FIGURA 1.33 Polisacáridos activados con CNBr.

b.6. *Carbonatos de celulosa.* A partir de celulosa, se ha preparado celulosa-trans-2,3-carbonato (Barker et al., 1971) por tratamiento con cloroformiato de etilo. Posteriormente, el derivado formado se utilizó para la inmovilización de enzimas a través de grupos amino libres presentes en éstas. Las estructuras de las diferentes especies químicas y posterior reacción del carbonato de celulosa con la enzima se muestran en la Figura 1.34.

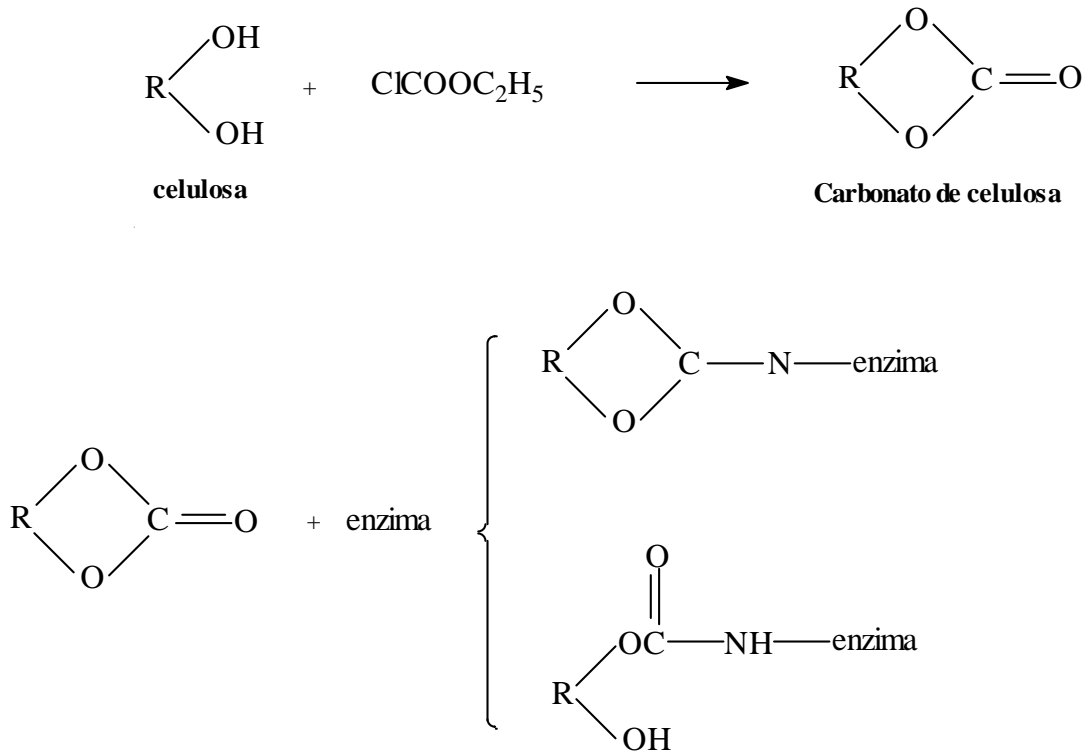


FIGURA 1.34 Carbonatos de celulosa.

Al igual que ocurre con el método visto en el apartado anterior, este método es simple y se realiza en condiciones muy suaves. Además, la enzima se inmoviliza al soporte mediante la formación de varios tipos de enlaces.

b.7. *Enlace tioamida.* El principio de este método es similar al del método que usa los derivados de isocianato, y está basado en la formación de enlaces tioamida entre grupos amino libres de la enzima y grupos isotiocianato del soporte. Inicialmente, el soporte que contiene grupos amino libres es “activado” por reacción con tiofosgeno para dar el

derivado isotiocianato correspondiente, que será el que posteriormente reaccione con los grupos amino libres de la enzima a inmovilizar, tal y como se indica en la Figura 1.35.

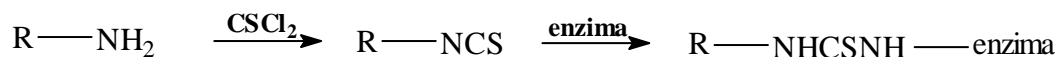


FIGURA 1.35 Enlace tioamida.

Como soportes se han empleado copolímeros de ácido acrílico-*m*-aminoestireno y ácido metacrílico-*m*-aminoestireno, así como derivados aminosilanzados de vidrio poroso, hidroxilapatita, níquel-alúmina y sílice. Se han inmovilizado diversas enzimas por este método, pero no tantas como por los otros métodos anteriormente vistos.

b.8. Reactivos condensantes. Constituye el segundo de los procedimientos disponibles para la inmovilización de enzimas por el método del enlace peptídico. Como reactivos condensantes se emplean carbodiimidas, el reactivo K de Woodward, N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina, etc. Algunas de sus estructuras son mostradas en la Figura 1.36.

Cuando se desea inmovilizar, por este método, a enzimas a través de grupos amino libres presentes en éstas, se emplean carbodiimidas, que reaccionan con soportes que contienen grupos carboxilos para dar derivados O-acilisoureas que a su vez reaccionarán con grupos amino libres de la enzima para producir su inmovilización. El mecanismo de acción de los reactivos condensantes aquí mencionados es similar, aportando al soporte de inmovilización un buen grupo saliente para la posterior entrada de la enzima mediante la formación de un enlace peptídico. La Figura 1.37 esquematiza el mecanismo de acción. Como soportes que contienen grupos carboxilos se han utilizado, entre otros, CM-celulosa, CM-Sephadex, Bio-gel CM-100, ácido poliaspártico, ácido poligalacturónico, polimetilmetacrilato y vidrio poroso succinizado.

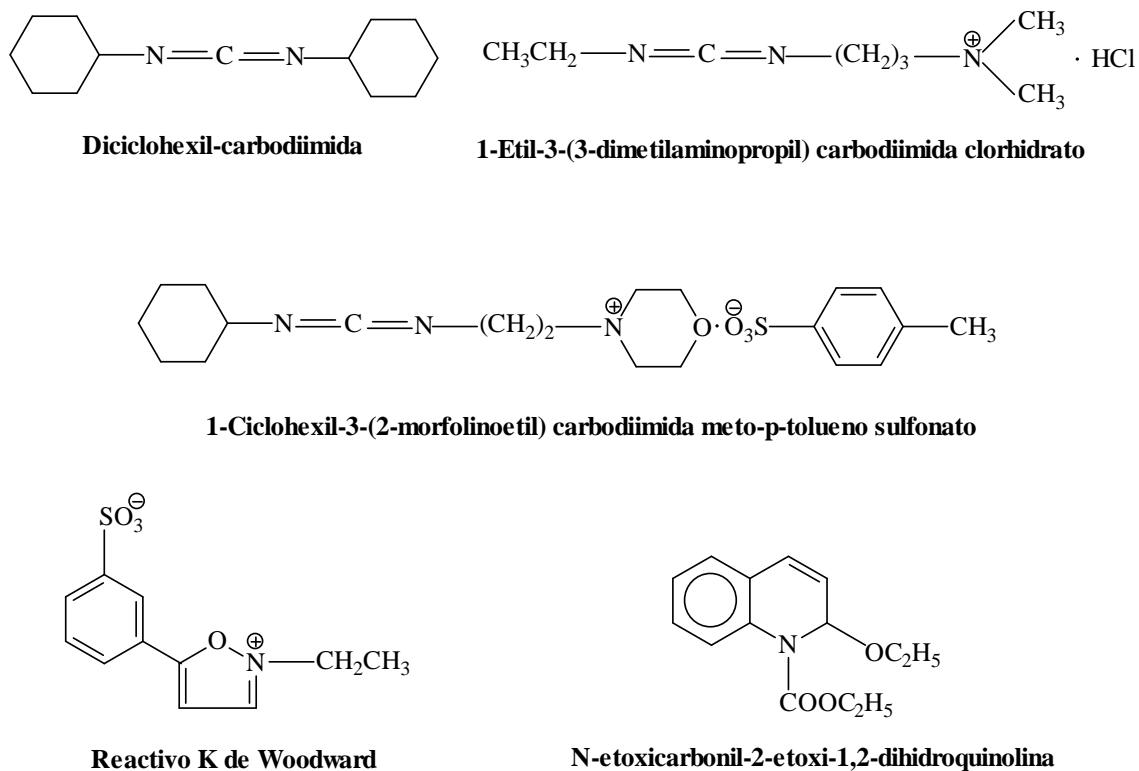


FIGURA 1.36 Reactivos condensantes.

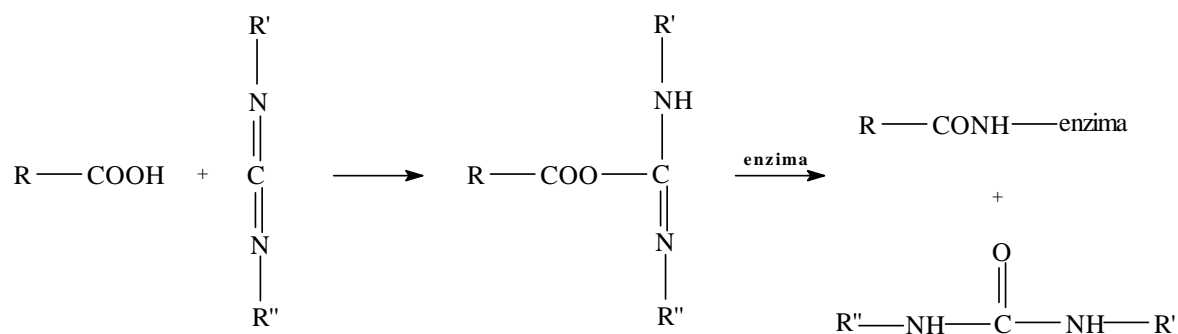


FIGURA 1.37 Inmovilización con agentes condensantes.

Cuando se desea utilizar grupos carboxilos libres presentes en las enzimas, entonces se emplean soportes de inmovilización que contengan grupos amino y uno de los reactivos condensantes antes mencionados. De este modo el enlace peptídico se producirá entre los grupos amino del soporte y grupos carboxilo libres de la enzima, que

quedará inmovilizada (Manjón et al., 1985; Narasaiah, 1994; Vijayakumar et al., 1996). Como soportes que contienen grupos amino se han empleado, entre otros, AE-celulosa y vidrio poroso amino-silanizado.

c. Método de alquilación. Este método se basa en la alquilación de grupos amino, fenólicos o sulfhidrilos de una enzima con un grupo reactivo como un haluro presente en un soporte insoluble en agua. Se han usado derivados como halogenoacetilos, triazinil o halogenometacrilatos como soportes para la inmovilización por este método. Dentro del primer tipo de derivados se incluye cloroacetil celulosa, bromoacetil celulosa, idoacetil celulosa (Sato et al., 1971; Patchornik, 1965) polietilenglicol iodoacetil celulosa (Katchalski y Bar-Eli, 1960a), etc. Entre el segundo tipo de derivados puede mencionarse los triazinil derivados de celulosa, Sephadex, Sepharosa, vidrio poroso y bentonita. Así, dicloro-s-triazinil celulosa se ha utilizado, entre otras, para la inmovilización de β -galactosidasa (Kay et al., 1968). La secuencia general de reacciones que tiene lugar con este soporte se muestra en la Figura 1.38. Por último, también se han empleado como soportes, copolímeros de metacrilato y 4-fluoroestireno, metacrilato y metacrilato-*m*-fluorodinitroanilina, metacrilato y metacrilato-4-yodo-*n*-butiléster o el homopolímero de metacrilato-4-yodo-*n*-butiléster (Brown et al., 1970).

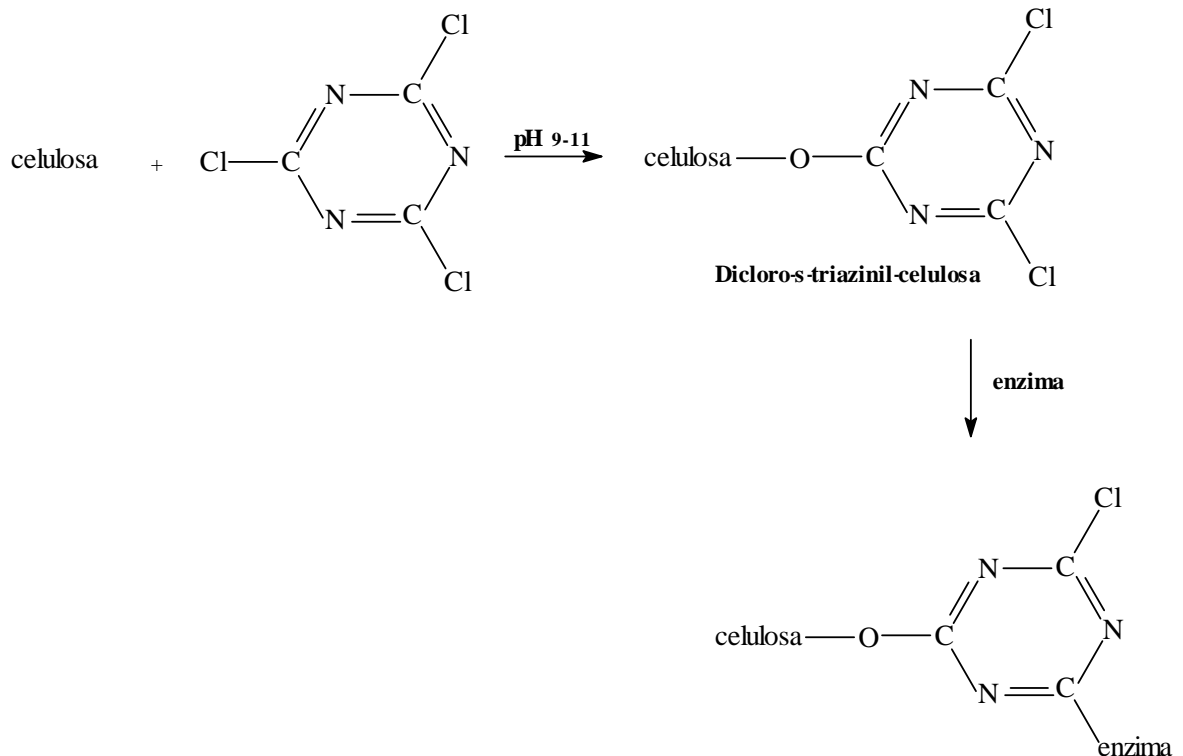


FIGURA 1.38 Método de alquilación.

d. Empleo de reactivos bifuncionales. Este método está basado en la formación de entrecruzamientos entre los grupos amino del soporte y grupos amino libres presentes en la enzima a inmovilizar, por acción de reactivos bi- o multifuncionales que actuarán de puente de unión entre ambos. El reactivo bifuncional, más comúnmente usado es glutaraldehído que provoca la formación de bases de Schiff entre los grupos amino del soporte de inmovilización o enzima y sus grupos aldehído. Se han inmovilizado muchas enzimas mediante este método, y entre ellas volveremos a mencionar β -galactosidasa, empleando como soporte los grupos amino de AE-celulosa (Regan et al., 1974), quitosano (Stanley et al., 1975), tubos de nylon (Ngo et al., 1976) y vidrio poroso aminoalquilado o aminosilanizado (Bódalo et al., 1991a; Bódalo et al., 1992), así como la inmovilización de HRPc (Husain y Jafri, 1995; Weng et al., 1991).

Como soportes que poseen grupos amino, se han empleado AE-celulosa, DEAE-celulosa, amino derivados de Sepharosa, albúmina inactivada, quitosano, AE-poliacrilamida, derivados aminosilano de vidrio poroso, etc. El esquema de la reacción que tiene lugar se da en la Figura 1.39.

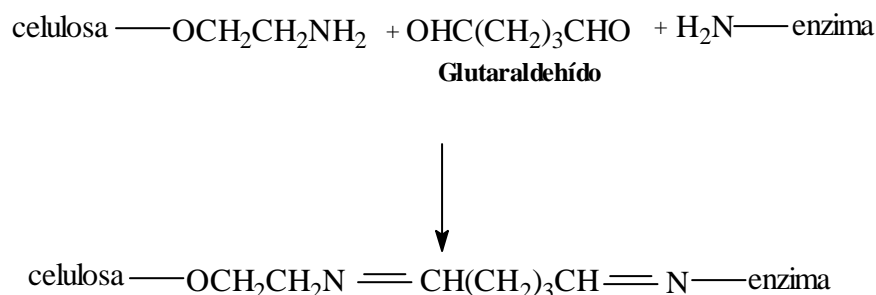


FIGURA 1.39 Reactivos bifuncionales.

El inconveniente de glutaraldehído es que es muy reactivo lo cual, en condiciones de reacción no bien controladas, puede dar lugar a un exceso de entrecruzamientos que puede ocasionar una disminución de la actividad catalítica de la preparación final. Del mismo modo el reactivo puede dar lugar a entrecruzamientos entre distintos puntos de la propia proteína dando lugar a modificaciones estructurales conducentes, claro está, a pérdida o al menos reducción de su actividad enzimática.

También se ha empleado como reactivo bifuncional para la inmovilización de enzimas hexametilendiisocianato (Figura 1.40), así como otros reactivos entrecruzantes heterobifuncionales (Pegg y Saunders, 1995).

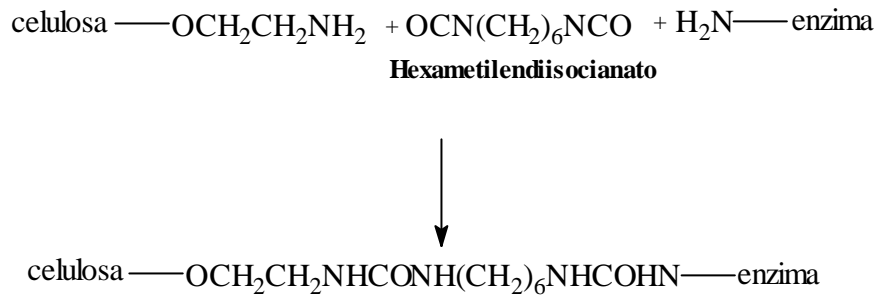


FIGURA 1.40 Hexametilendiisocianato como reactivo bifuncional.

e. Empleo de la reacción de Ugi. Este método está basado en la reacción descrita por Ugi y colaboradores, en la cual carboxilatos, aminas, aldehídos o cetonas reaccionan con isocianuros para dar lugar a la formación de una amida N-sustituida. Así, el enlace puede tener lugar entre grupos amino de la enzima con grupos carboxilo del soporte o bien entre grupos carboxilo de la enzima con grupos amino del soporte. El esquema de la reacción que tiene lugar es mostrado en la Figura 1.41. Como soportes empleados para este método pueden citarse CM-Sephadex, CM-Sepharosa, amino derivados de Sepharosa, AE-poliacrilamida, nylon poliisonitrilo, Enzacryl AA y Enzacryl poliacetal.

Se han inmovilizado pocas enzimas, en comparación con los otros métodos estudiados, empleando este procedimiento. En general se trata de enzimas hidrolíticas capaces de soportar las condiciones poco suaves en que la inmovilización tiene lugar.

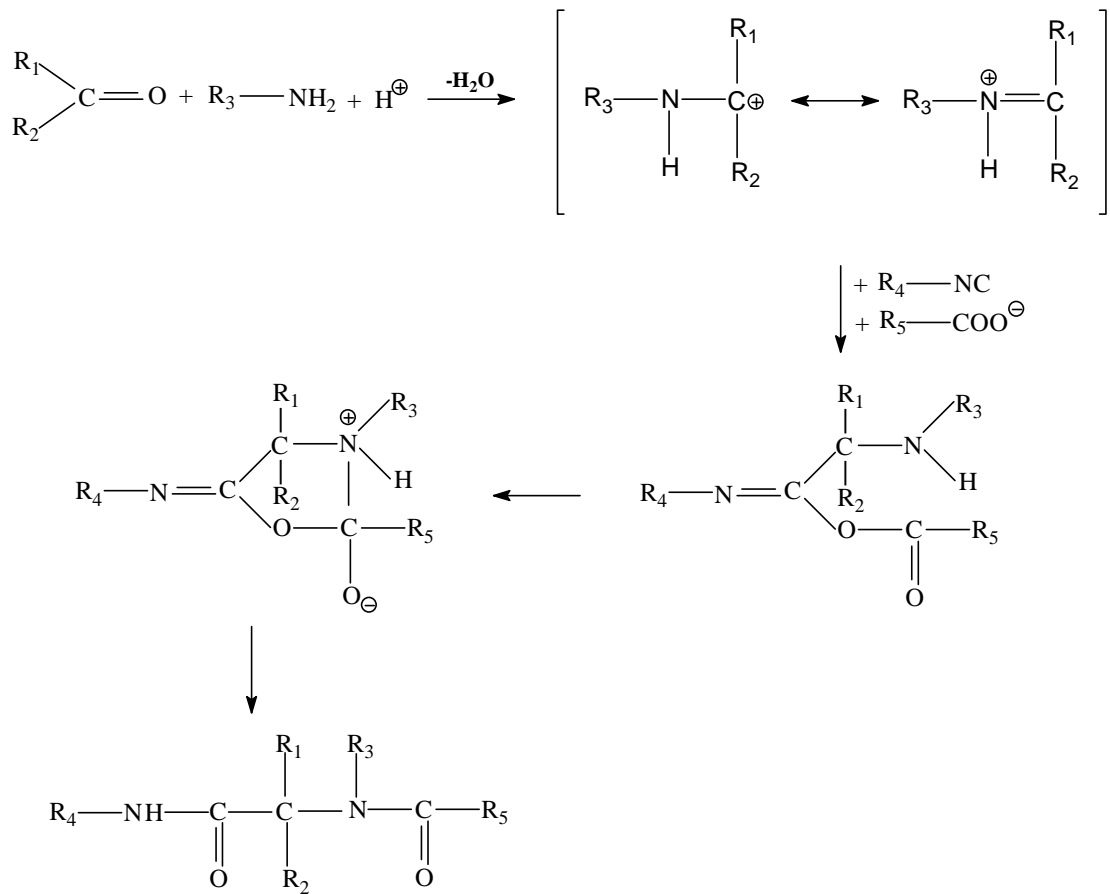


FIGURA 1.41

f. Intercambio tiol-disulfuro. El intercambio tiol-disulfuro se produce entre grupos tiol presentes en la enzima y residuos disulfuro mixtos del soporte. El derivado del soporte de inmovilización se prepara tratando el soporte que contiene grupos tiol con 2,2'-dipiridildisulfuro. Posteriormente, el enlace de la enzima por medio de sus grupos tiol irá acompañado de la liberación de 2-tiopiridona. El esquema de reacción que tiene lugar es el de la Figura 1.42.

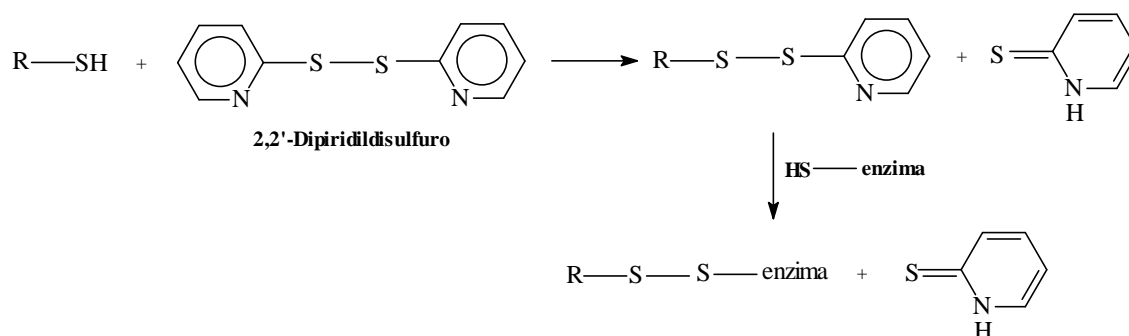


FIGURA 1.42 Intercambio tiol-disulfuro.

Como soportes para este método de inmovilización se ha empleado agarosa-glutation-2-piridil disulfuro (llamado comercialmente Sepharosa tiol-activada), agarosa-mercaptotripropiléter-2-piridil disulfuro y agarosa-ácido adípico hidrazida-N-acetil-homocisteína-2-piridil disulfuro. Sólo ureasa se ha inmovilizado mediante este método.

Por otro lado, a enzimas que no contienen grupos tiol se les puede introducir estos grupos usando metil-3-mercaptopropioimidato bajo condiciones ligeramente alcalinas. Posteriormente, la enzima es inmovilizada sobre los soportes activados aquí citados mediante la formación de enlaces disulfuro. La Figura 1.43 muestra la secuencia de reacciones que tiene lugar.

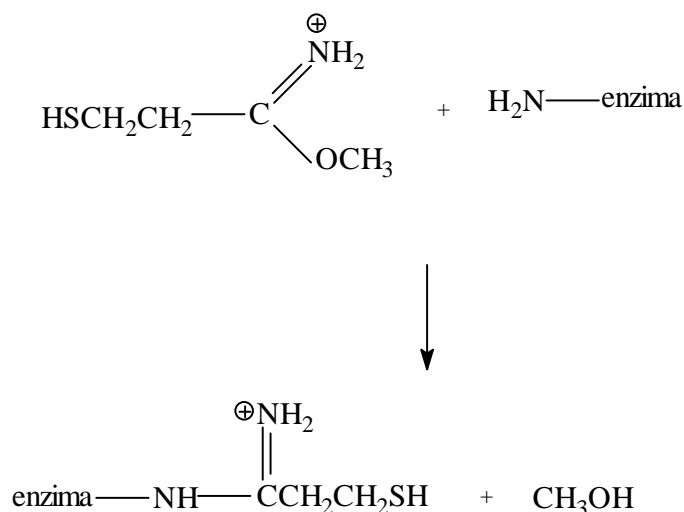


FIGURA 1.43 Introducción de grupos tiol a una enzima y posterior inmovilización por intercambio tiol-disulfuro.

g. Otros métodos de enlace covalente a un soporte. Se ha inmovilizado enzimas mediante la formación de bases de Schiff entre grupos amino libres de la enzima y grupos aldehído introducidos en el soporte de inmovilización por oxidación con ácido periódico (Weakley y Mehlretter, 1973; Brown y Racois, 1974; González-Siso et al., 1994; Manjón et al., 1985). Entre estos soportes, ha sido extensamente utilizado almidón dialdehído.

También, poliacrilonitrilo puede reaccionar con etanol absoluto, haciendo burbujear HCl seco, para producir el correspondiente imidoéster, el cual puede utilizarse para la inmovilización de enzimas. Se ilustra la secuencia de reacciones que tiene lugar en la Figura 1.44.

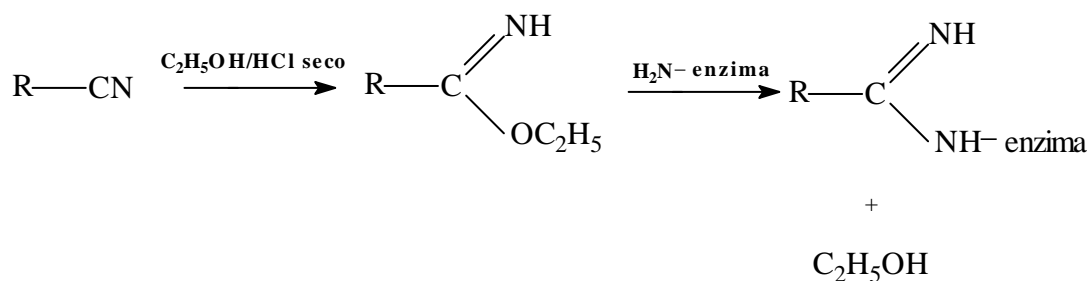


FIGURA 1.44 Inmovilización de una enzima sobre un imidoéster.

También pueden activarse los soportes que contienen grupos amino con CNBr, y el derivado formado reaccionará con grupos amino de la enzima, que quedará inmovilizada por formación de enlaces guanidina entre los grupos amino de la enzima y soporte. La secuencia de reacciones que tiene lugar es la de la Figura 1.45.

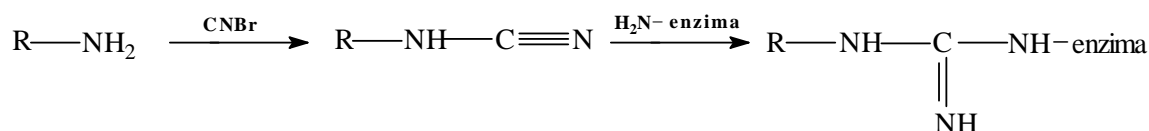


FIGURA 1.45 Formación de enlaces guanidina.

Por último, otro interesante método de inmovilización es la inmovilización de enzimas que requieren de alguna coenzima para la realización de su actividad catalítica por unión de la apoenzima al cofactor previamente inmovilizado sobre algún soporte.

1.2.2.2 Método de entrecruzamiento

En este método de inmovilización no se emplea soporte alguno, a diferencia de los anteriores métodos estudiados. La inmovilización se realiza por formación de enlaces intermoleculares (entrecruzamientos) entre diferentes moléculas de enzima, por medio de reactivos bi- o multifuncionales. Pueden emplearse como reactivos entrecruzantes, glutaraldehído (bases de Schiff), isocianatos (enlaces peptídicos) (Ozawa, 1967a), bisdiazobenzidina (acoplamiento diazo) (Silman et al., 1966), N,N'-polimetilén bisiodoacetoamida (alquilación), N,N'-etilén bismaleimida (enlace peptídico) (Ozawa, 1967b) y otros reactivos entrecruzantes homobifuncionales (Miland et al., 1996). De todos ellos el más comúnmente utilizado ha sido glutaraldehído.

Como grupos presentes en las enzimas que pueden participar en este tipo de reacciones se puede mencionar, el grupo α -amino del aminoácido terminal, ϵ -amino de lisina, fenólico de tirosina, sulfhidrilo de cisteína y el imidazol de histidina. Como inconvenientes a este método podemos citar que las reacciones se realizan en condiciones relativamente severas, con lo que la conformación del centro activo de la enzima puede ser afectada durante la reacción, provocando una importante pérdida de actividad. Además, si no se controlan bien las condiciones, la extensión de los entrecruzamientos puede ser muy elevada lo que reducirá también la actividad catalítica

de la preparación final. También, deberemos mencionar que los reactivos entrecruzantes no distinguirán si los grupos a unir pertenecen a moléculas diferentes de enzima o a una misma molécula. Así, podrán formarse entrecruzamientos intramoleculares que conducirán, no a una inmovilización de la enzima sino más bien a un cambio estructural drástico de ésta, con la consiguiente pérdida de actividad enzimática. Sin embargo, tiene la ventaja de su simplicidad, y la posibilidad de controlar el tamaño de partícula y las propiedades del producto final.

Entre las enzimas que han sido inmovilizadas por este método mencionaremos peroxidasa (Cook et al., 1993; Lei y Deng, 1996) y β -galactosidasa (Khare y Gupta, 1990) en las que se empleó glutaraldehído como reactivo bifuncional. Un esquema de la estructura que presentan estas preparaciones con enzima inmovilizada es mostrado en la Figura 1.46 en que se empleó glutaraldehído como reactivo bifuncional.

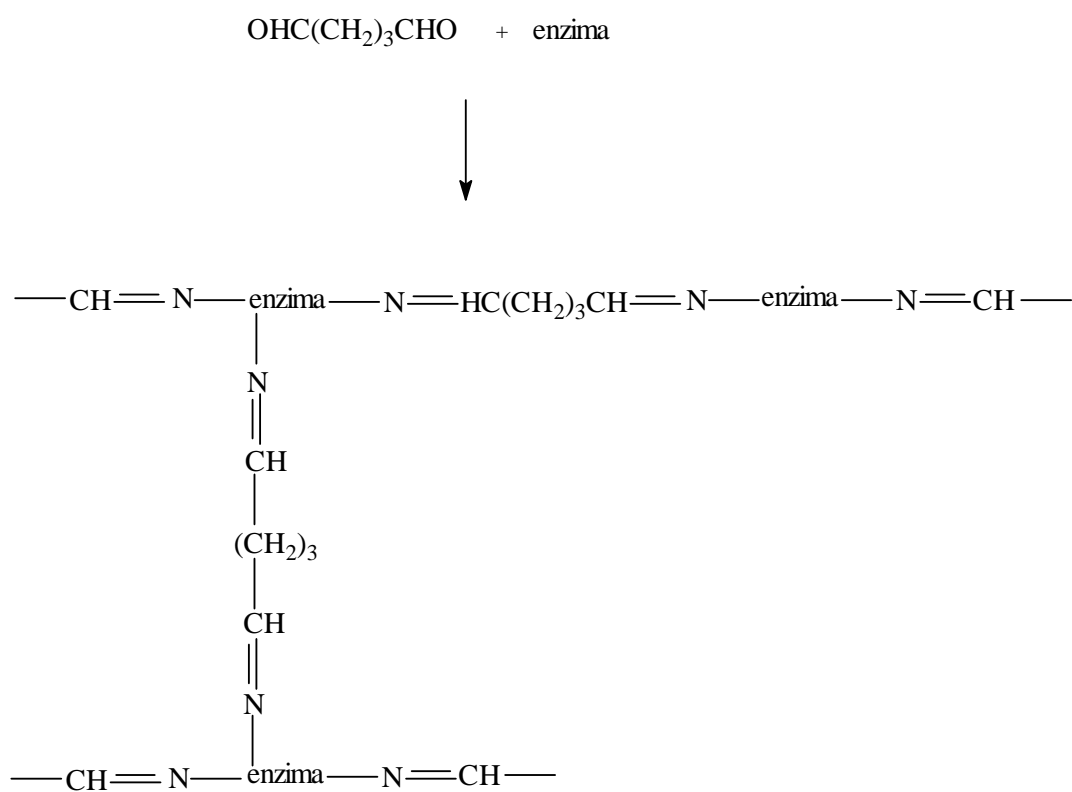


FIGURA 1.46 Método de entrecruzamiento con glutaraldehído.

1.2.2.3 Método de atrapamiento

Este método está basado en confinar enzimas en el retículo de una matriz polimérica o encerrar enzimas en membranas semipermeables y se caracteriza por la rapidez y facilidad para su preparación. El método difiere del método de enlace covalente y de entrecruzamiento en que la enzima no se enlaza a la matriz o membrana. Sin embargo, si para el atrapamiento es necesaria la realización de una polimerización química, como las condiciones de reacción serán severas, entonces podrá ocurrir, en determinados casos, pérdida de actividad enzimática. Por ello, es necesario seleccionar las condiciones más convenientes para la inmovilización de las enzimas deseadas.

Otra diferencia entre la enzima atrapada y la enlazada a un soporte de inmovilización es que las primeras estarán aisladas de grandes moléculas que no podrán difundir al interior de la matriz, mientras que las segundas pueden estar expuestas a moléculas de cualquier tamaño. Por lo tanto los dos tipos de enzimas inmovilizadas se diferenciarán en la forma de las cinéticas observadas y en el tipo de interferencias que presentarán. Este método puede clasificarse en tipo retículo y tipo microcápsula, que a continuación se comentan.

Tipo retículo

Este método implica el atrapamiento de enzimas dentro del espacio intersticial de un polímero insoluble en agua entrecruzado. Se han usado para la inmovilización de enzimas por este método varios polímeros sintéticos como poliacrilamida, alcohol polivinílico, etc. (Maeda et al., 1973a), y polímeros naturales como almidón (Bouman y Goodson, 1965; Goodson y Jacobs, 1973), κ -carragenina, goma de silicona y polvo de "konjak". También se han empleado resinas fotoentrecruzables como polietilenglicol dimetacrilato (Fukui et al., 1976) y otros derivados polihidroxílicos de metacrilato (Arica et al., 1999) para el atrapamiento de enzimas. En la línea de estos últimos, los derivados cinamoilados preparados en el presente trabajo también podrían ser adecuados para la inmovilización, por este método, de las enzimas estudiadas.

Se han inmovilizado diversas enzimas por este método, pero nos limitaremos a mencionar aquí, como en otros apartados de este trabajo, a β -galactosidasa, para cuyo atrapamiento se empleó gel de poliacrilamida (Maeda et al., 1973b; Bunting y Laidler, 1972; Dahlqvist et al., 1973), ácido poliacrílico (Maeda et al., 1975), polivinil pirrolidona (Maeda et al., 1974) y κ -carragenina o alginato cálcico (Bódalo et al., 1991a). También

mencionaremos el atrapamiento de peroxidasa utilizando una membrana de nitrocelulosa (Leuschner, 1966).

De los polímeros entrecruzables anteriormente mencionados, la polimerización de la goma de silicona es demasiado violenta, y cuando se emplea gel de almidón, la enzima queda débilmente atrapada. Por lo tanto, en ambos casos se produce pérdida de actividad enzimática, en el primer caso por destrucción de la enzima y en el segundo por salida de ésta del retículo formado (Guilbault, 1984). El polímero más comúnmente empleado para el atrapamiento de enzimas ha sido gel de poli(acrilamida), preparado de modo análogo que cuando se usa para electroforesis. El atrapamiento se realiza polimerizando una disolución acuosa que contiene acrilamida y la enzima en presencia de N,N'-metilbis(acrilamida) (BIS) como reactivo entrecruzante. La polimerización se inicia por persulfato potásico ($K_2S_2O_8$), persulfato amónico ($(NH_4)_2S_2O_8$) o riboflavina y se acelera con β -dimetilaminopropionitrilo (DMAPN), N,N,N',N'-tetrametililén diamina (TEMED) o alumbre. Como agente entrecruzante, además de BIS se han empleado otros de estructuras similares a éste como N,N'-propilbis(acrilamida), diacrilamida dimetil éter, 1,2-diacrilamida etilenglicol, etc. Sin embargo, BIS es preferido para aplicaciones industriales pues es disponible comercialmente en grandes cantidades y a bajo coste (Chibata, 1978).

Este método se utilizó para el atrapamiento de tripsina, papaína, ribonucleasa, etc. (Bernfeld y Wan, 1963). Para la optimización de este método de inmovilización deberá investigarse las condiciones más convenientes para obtener preparaciones con elevada actividad, estables y mecánicamente fuertes. Si el tamaño de poro es el adecuado la enzima no podrá escapar del retículo formado. Sin embargo, tanto el sustrato de la enzima como los productos de la reacción formados presentarán problemas de difusión a lo largo del entramado, en cuyo interior sólo podrán difundirse sin excesivas limitaciones las moléculas pequeñas.

La polimerización del monómero de acrilamida también puede realizarse mediante rayos-X o rayos- γ (Maeda et al., 1973b). La ventaja que presenta este tipo de polimerización es que puede realizarse en estado congelado, y por lo tanto tendrá lugar menor inactivación de la enzima. Sin embargo, las actividades obtenidas hasta ahora no son significativamente superiores a las obtenidas con catalizadores químicos. Además hay que tener en cuenta el mayor coste del equipamiento necesario para su realización.

Las preparaciones de enzimas inmovilizadas con gel de poli(acrilamida) pueden prepararse con diversas formas finales (perlas esféricas, etc.) o bien con un tamaño de

partícula de grano adecuado, dependiendo de la posterior utilización que se vaya a hacer. Pueden liofilizarse los geles de poliacrilamida con enzima inmovilizada conservando una gran estabilidad frente a largos períodos de almacenamiento. Sin embargo, en algunos casos, esta estabilidad se pierde drásticamente al hidratar los geles. También en algunos casos estas preparaciones presentan una estabilidad térmica muy buena (Hicks y Updike, 1966).

En determinadas ocasiones, el uso de riboflavina, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ o $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ como catalizadores para la polimerización, puede representar una cierta desventaja del método de inmovilización. Así, como riboflavina es fluorescente, puede interferir si se emplea alguna medida fluorométrica para determinar la actividad enzimática. Del mismo modo, no debe usarse $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ si se emplea un método de determinación potenciométrica (Guilbault, 1984).

La utilización de κ -carragenina como agente de atrapamiento permite, también, la obtención final de un gel duro que puede granularse a un tamaño de partícula adecuado dependiendo de la utilización posterior. Su utilización tiene la ventaja de que el método es muy simple y se realiza en condiciones suaves. Por ello este método es aplicable para la inmovilización de muchas enzimas.

Tipo microcápsula

Este método implica encerrar las enzimas con membranas semipermeables de polímeros. Las microcápsulas formadas generalmente tienen un diámetro de 1-100 μm . Estas microcápsulas se han utilizado en diferentes campos como en medicina, alimentos, cosméticos, colorantes, etc. Para la microencapsulación de enzimas, las condiciones deben controlarse escrupulosamente, en comparación con otras sustancias químicas. El proceso de microencapsulación de enzimas puede clasificarse en las cuatro categorías, que se describen, brevemente, a continuación:

a. Método de Polimerización Interfacial. Está basado en el hecho que monómeros hidrofóbicos e hidrofílicos polimerizan en la interfase de las disoluciones correspondientes. Así, una disolución acuosa de la enzima y un monómero hidrofílico se emulsiona en un disolvente orgánico inmiscible en agua. A la emulsión se añade un monómero hidrofóbico disuelto en el mismo disolvente orgánico empleado para la emulsión anterior, y el medio de reacción se agita. Ambos monómeros polimerizarán en la interfase entre la fase acuosa y orgánica de la emulsión. De este modo la enzima queda en la fase acuosa y será encerrada por una membrana de polímero resultante.

Se han utilizado para su polimerización diferentes monómeros hidrofóbicos e hidrofílicos. Así, un monómero hidrofílico como poliamina puede ser polimerizado con monómeros hidrofóbicos como poliisocianato, bishaloformiato o un cloruro de ácido polibásico para dar poliurea, poliuretano o poliamida, respectivamente. Del mismo modo, glicol o polifenol puede reaccionar con poliisocianato o cloruro de ácido polibásico para originar poliurea o un poliéster (Chibata, 1978).

Como ejemplo de enzimas inmovilizadas por este método mencionaremos β -galactosidasa, para cuyo atrapamiento se empleó nylon (Ostergaard y Martiny, 1973). Entre las ventajas de este método, cabe mencionar que puede ajustarse, según las necesidades, el tamaño de las cápsulas y que el tiempo requerido para la microencapsulación es muy corto. Como inconvenientes, citaremos que algunas enzimas son inestables a los monómeros utilizados por lo que se inactivan durante el proceso. Por lo tanto, la elección de los monómeros a polimerizar deberá hacerse en base a las propiedades de la enzima a inmovilizar y a la aplicación posterior de la preparación final.

b. Método del Líquido Secante. Este método está basado en encerrar enzimas por dispersión de éstas en un polímero disuelto en un disolvente orgánico inmiscible en agua, seguido por una segunda dispersión en una solución acuosa y secante. Para ello, el polímero se disuelve en un disolvente orgánico con un punto de ebullición menor que el del agua. Una disolución acuosa de la enzima se dispersa en la fase orgánica anterior para formar una primera emulsión del tipo agua en aceite. En este caso, puede ser efectivo el uso de un surfactante soluble en aceite como agente emulsificante. Esta primera emulsión que contiene microgotas acuosas se emulsiona luego en una fase acuosa que contiene sustancias coloidales protectoras como gelatina, alcohol polivinílico y surfactantes. Se agita esta segunda emulsión y se elimina el disolvente orgánico calentando a vacío, quedando una membrana de polímero que forma las microcápsulas con la enzima, en medio acuoso, encerrada en su interior.

Como polímeros se han utilizado, etil celulosa, poliestireno, etc., y como disolventes orgánicos se ha empleado benceno, ciclohexano y cloroformo.

El tamaño de partícula puede ajustarse variando la concentración de polímero, velocidad del emulsionador mecánico o el tipo de sustancia coloidal protectora. Este método no es adecuado para la preparación de microcápsulas de diámetro inferior a 30 μm . A diferencia del método de polimerización interfacial, aquí se usan polímeros ya formados por lo que no son necesarios agentes reactivos. Por ello, tendrá lugar poca o ninguna inactivación de la enzima durante el proceso.

Como desventajas mencionaremos que, en ocasiones, la segunda emulsión no se forma con lo que la producción de microcápsulas es baja. Además es necesario mucho tiempo para eliminar el disolvente orgánico completamente (lo que es necesario para la formación de la membrana sólida).

c. Método de Separación de Fase. Este método está basado en el fenómeno denominado “coacervación” consistente en que una disolución de polímero en un disolvente orgánico puede separarse en dos fases que contienen, respectivamente, baja y alta concentración del polímero, por adición de otro disolvente orgánico miscible con el primero pero en el cual el polímero es insoluble. Para ello, una disolución acuosa de la enzima se dispersa en un disolvente orgánico, inmisible en agua, que contiene al polímero. A este medio, se le añade lentamente y con agitación, otro disolvente orgánico miscible con el primero, pero en el que el polímero es insoluble. Así, el polímero se concentra en el disolvente orgánico inicial y se forman las membranas alrededor de las microgotas acuosas que contienen a la enzima. Deberá ponerse especial cuidado en conseguir una disolución lo más concentrada posible del polímero, pero sin provocar su precipitación puesto que si esto último ocurre, la enzima no será microencapsulada.

Este método es realizado en condiciones relativamente suaves como el método anterior descrito. Sin embargo tiene la desventaja que es difícil de conseguir la eliminación completa de los disolventes orgánicos. Se han utilizado diferentes combinaciones de polímeros y disolventes orgánicos, ambos inmiscibles en agua, para la inmovilización de enzimas por este método. Aquí mencionaremos la inmovilización de β -galactosidasa empleando como polímero nitrocelulosa y como disolventes orgánicos éter y benzoato de butilo (Wadiak y Carbonell, 1975).

d. Método de Membrana Líquida (liposomas). En este caso, no se utilizan membranas semipermeables insolubles en agua, como en los casos anteriores. El método es similar al de separación de fase, y consiste en la encapsulación de enzimas dentro de una membrana anfipática (liposoma) formada de surfactantes y lecitina (Gregoriadis et al., 1971; Dapergolas et al., 1976; Steger y Desnick, 1977).

Aquí, la permeabilidad de sustratos y/o productos a través de los liposomas es independiente del tamaño de poro de la membrana, pero sí depende de la solubilidad de éstos en los componentes de la membrana.

1.2.2.4 Otros métodos de inmovilización

Enzimas como aminoacilasa, α -quimotripsina y tripsina han sido inmovilizadas por copolimerización con anhídridos de N-carboxi-aminoácidos a través de grupos amino libres presentes en la enzima (Kirimura y Yoshida, 1964). El esquema de las reacciones que tiene lugar es el de la Figura 1.47.

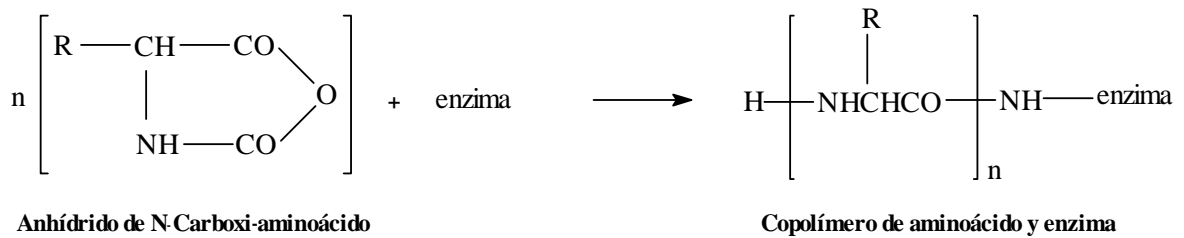


FIGURA 1.47 Inmovilización por formación de copolímeros entre la enzima y anhídridos de N-carboxi-aminoácidos.

Este método es similar al descrito en el método diazo de enlace covalente para copolímeros de aminoácidos. En aquel caso, se formaba un derivado del copolímero formado para a continuación inmovilizar la enzima. Aquí, la formación del copolímero ya supone la inmovilización de la enzima. También, se han usado derivados de N-carbonilimidazol para inmovilizar lisozima (Bartling et al., 1973). En este último caso, el grupo imidazol actúa como grupo saliente en la reacción de transacilación del grupo amida formado y los grupos amino libres presentes en la enzima. La Figura 1.48 da un ejemplo de derivado de N-carbonilimidazol y de reacción con una enzima.

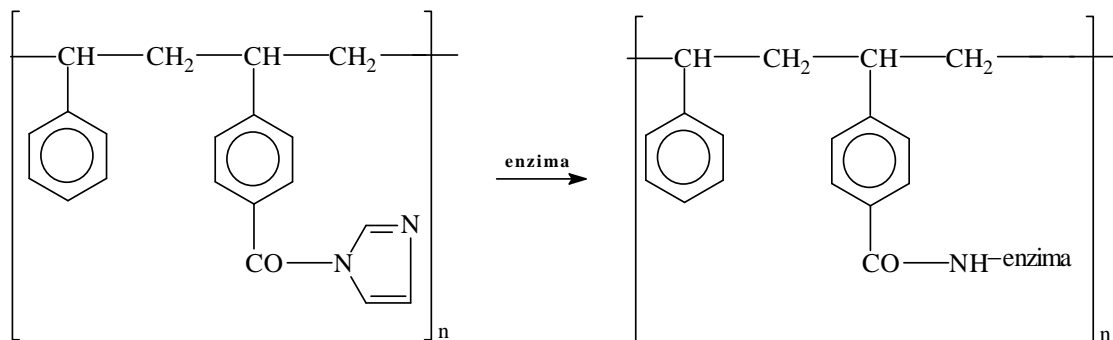


FIGURA 1.48 Inmovilización de enzimas sobre derivados de N-carbonilimidazol.

Además, mencionaremos que se ha inmovilizado invertasa soluble por formación de complejos con ácido tánico (que también se emplea para la precipitación de proteínas). También se ha descrito la inmovilización de glicoenzimas, tales como HRPc, mediante la activación previa de restos carbonados presentes en la proteína, por oxidación con ácido periódico (H_5IO_6) y posterior acoplamiento covalente de los grupos aldehído formados sobre la estructura de la proteína con grupos amino libres presentes en un soporte insoluble en agua, mediante la formación de bases de Schiff (Zaborsky, 1976). Este acoplamiento puede realizarse en un relativamente amplio rango de pH (5 a 9). Como el enlace formado es reversible, se han realizado diversos trabajos con agentes reductores como $NaBH_4$ o $NaBH_3CN$ (Uemura y Kuzuhara, 1996), para reducirlo y formar la correspondiente amina, irreversible. De este modo se evitaría la liberación de la enzima al medio de reacción durante su uso.

Debe establecerse inicialmente qué papel juegan los restos a oxidar en la actividad catalítica de la enzima para poder prever, si la modificación a introducir en ellos modificará o no dicha actividad. Además debe tenerse presente que pueden oxidarse algunos aminoácidos, tales como cisteína, tirosina, triptófano y metionina, por lo que será deseable que estos aminoácidos no estén implicados de manera decisiva en la actividad catalítica. La principal ventaja de este método es que el acoplamiento tiene lugar a través de residuos no esenciales para la actividad catalítica. Así, para enzimas como glucosa oxidasa, la actividad enzimática y otras propiedades no se alteran por la inmovilización, aunque en otros casos, como para HRPc se pierde parte de su actividad (Husain y Jafri, 1995; Husain et al., 1996).

También citaremos la inmovilización de enzimas sobre soportes magnéticos. Se han realizado diferentes trabajos que utilizan estos soportes en lugar de los tradicionales soportes insolubles en agua (García-III et al., 1989; Tatsumi et al., 1996; Gellf y Boudrant, 1974). Aunque puede utilizarse cualquier soporte magnético, sólo se ha utilizado magnetita (Fe_3O_4). La ventaja de estas preparaciones es la facilidad de separar del resto del medio de reacción aprovechando las propiedades magnéticas del soporte.

Por último haremos mención a la inmovilización de enzimas en soportes electropolimerizados a partir de monómeros que inicialmente retuvieron a la enzima mediante adsorción física (Coche-Guerente et al., 1995).

1.2.2.5 Conclusión

En la Tabla 1.1 se da un cuadro resumen de las características y propiedades de los diferentes métodos de inmovilización comentados.

En muchos casos, la actividad de una enzima tras ser inmovilizada es inferior a la que muestra la enzima nativa soluble. Así, por ejemplo, β -galactosidasa inmovilizada sobre vidrio poroso aminosilanzado a través del método diazo de enlace covalente muestra un 75% de la actividad mostrada por la enzima nativa utilizando ONPG como sustrato (Woychik y Wondolowski, 1972). Sin embargo, en algunos casos se ha observado que no se produce cambio alguno en la actividad enzimática e incluso se han dado casos en que la enzima inmovilizada muestra superior actividad que la forma soluble.

TABLA 1.1
Cuadro resumen de las características de las preparaciones con enzimas inmovilizadas.

Característica	Método de enlace a un soporte			Método de entrecruzamiento	Método de atrapamiento
	Adsorción	Enlace iónico	Enlace covalente		
Preparación	Fácil	Fácil	Difícil	Difícil	Difícil
Actividad enzimática	Baja	Alta	Alta	Moderada	Alta
Especificidad por el sustrato	No cambia	No cambia	Cambia	Cambia	No cambia
Fuerza de enlace	Débil	Moderada	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Regeneración	Posible	Posible	Imposible	Imposible	Imposible
Aplicabilidad	Baja	Moderada	Moderada	Baja	Alta
Coste	Bajo	Bajo	Alto	Moderado	Bajo

La disminución de la actividad de una enzima cuando es enlazada a un soporte puede deberse a los siguientes factores.

1. Que grupos funcionales pertenecientes a aminoácidos esenciales en el centro activo de la enzima, estén involucrados en el enlace de ésta al soporte

insoluble en agua, provocando, así, una parcial destrucción del centro activo de la enzima.

2. Que se haya producido un cambio conformacional cuando la enzima se ha enlazado al soporte.
3. Que la pérdida de actividad “aparente”, sea debida a que la interacción del sustrato con la enzima se vea afectada por impedimentos estéricos, de tal modo que la velocidad de reacción enzimática se vea afectada por limitaciones en la difusión tanto del sustrato como del producto formado.

Los apartados 1 y 2 se darán principalmente si la unión de la enzima al soporte de inmovilización se realiza mediante un enlace covalente o por entrecruzamiento, ya que las condiciones en que éstos se realizan son relativamente más severas que cuando se enlazan por adsorción física o enlace iónico. Los dos primeros casos pueden evitarse, con una elección adecuada de las condiciones de inmovilización. Sin embargo, la tercera de ellas es difícil de evitar, a no ser que se elija un método de inmovilización diferente.

Cuando se produce disminución en la actividad en el método de atrapamiento, se considera debida a la desnaturalización de la enzima durante el proceso de inmovilización y, además, a la baja capacidad de difusión del sustrato y producto a través del retículo del gel o de la membrana formada.

Se han hecho varios intentos para obtener preparaciones de enzimas inmovilizadas con mayor actividad enzimática. Para ello, la enzima ha sido inmovilizada después de proteger su centro activo con un inhibidor específico, un sustrato (Tosa et al., 1973; Khare y Gupta, 1990) o un producto. Así, β -galactosidasa fue inmovilizada por el método de atrapamiento utilizando gel de poliacrilamida en presencia de un inhibidor como glucono- δ -lactona o galactona- γ -lactona. Tras la inmovilización, se elimina el inhibidor, comprobándose que la preparación de enzima inmovilizada obtenida presentaba mayor actividad enzimática que la obtenida sin la protección previa de la enzima. Además, y en el caso de proteasas (tripsina, quimotripsina, etc.), se tiene la posibilidad de inmovilizar los zimógenos precursores de éstas (tripsinógeno, quimotripsinógeno, etc., respectivamente), y tras la inmovilización transformarlos en las enzimas activas correspondientes. De este modo las preparaciones obtenidas también mostraron superior actividad enzimática que cuando se inmovilizó la enzima ya activa.

Aunque los métodos de inmovilización que implican la formación de enlaces covalentes, generalmente conducen a preparaciones finales con menor actividad

enzimática, en comparación a cuando se emplean otros métodos de inmovilización, sin embargo, como las fuerzas de enlace son fuertes, no se producirá pérdida de enzima durante su utilización, incluso a concentraciones salinas elevadas. Esto que en principio es una ventaja, termina convirtiéndose en un inconveniente ya que cuando la actividad enzimática se pierde tras largos períodos de utilización, ésta no podrá regenerarse por liberación de la enzima inactiva y nueva inmovilización de enzima activa.

Por el contrario, y como ya se dijo en la descripción del método de enlace iónico a un soporte, la inmovilización de enzimas por este método se realiza en condiciones suaves y pueden obtenerse preparaciones con elevada actividad enzimática. Como la fuerza de los enlaces es débil, podrá ocurrir la pérdida de la enzima del soporte de inmovilización por cambios de la fuerza iónica, pH del medio, o durante su actuación debido a la presencia del sustrato y/o producto de la enzima. Sin embargo, cuando se pierde la actividad enzimática tras largos períodos de actuación y/o almacenado, ésta podrá regenerarse fácilmente, lo cual es de gran importancia sobre todo si se trabaja con enzimas y/o soportes caros.

La actividad enzimática perdida tampoco podrá ser regenerada cuando la enzima haya sido inmovilizada por atrapamiento. Además este método tiene la desventaja que la enzima atrapada presenta pequeña o ninguna actividad hacia sustratos de gran tamaño molecular debido a las limitaciones en la difusión tanto del sustrato como del producto formado. Por ello este método queda limitado a sustratos y productos de pequeño tamaño molecular. Para evitar los inconvenientes mostrados en el caso de la inmovilización por atrapamiento, pueden producirse, primero, fibras huecas del material polimérico deseado, para posteriormente situar la enzima en su interior y cerrar el extremo inicialmente abierto (Rony, 1971). Esto ofrece como ventajas, la facilidad de llenar las fibras huecas con muchos tipos de enzimas y además permite recuperar la enzima atrapada y por lo tanto regenerarla cuando ésta se agota.

Todos los métodos de inmovilización presentan ventajas e inconvenientes con respecto al resto. No existe un método ideal y general para la inmovilización de cualquier enzima. Por lo tanto, la elección del método y condiciones de inmovilización deberá realizarse en base a la enzima concreta a inmovilizar y a la utilización posterior que se va a dar a la preparación final obtenida.

1.2.3 Propiedades de enzimas inmovilizadas

Cuando se inmoviliza una enzima, se producen cambios en sus propiedades debido, principalmente, a dos factores. Por un lado, los cambios (en la conformación y en la carga) producidos en la propia enzima debido a la modificación de residuos de aminoácidos de su centro activo y por otro, ha de considerarse las propiedades físicas y químicas del soporte de inmovilización, puesto que se formarán capas de difusión alrededor de la enzima inmovilizada, se producirán impedimentos estéricos e interacciones electrostáticas entre el soporte y el sustrato. Todos estos factores actúan conjuntamente, dando lugar a la modificación de las propiedades de la enzima inmovilizada, y resulta difícil determinar qué factor concreto provoca un determinado cambio.

1.2.3.1 Especificidad por el sustrato

Ya se ha comentado que cuando se inmoviliza una enzima, su actividad enzimática, a menudo disminuye, observándose que, a veces, la especificidad por su sustrato también cambia. Esto se observa, principalmente, en el caso de enzimas que actúan sobre sustratos de elevado peso molecular (proteasas y amilasas) que se han inmovilizado por enlace a un soporte insoluble en agua, y se compara las actividades obtenidas con las mostradas por esas mismas enzimas frente a sustratos de mucho menor peso molecular (Chibata, 1978). En general, cuando se inmoviliza una enzima usando un polímero como soporte insoluble en agua, su actividad hacia sustratos de alto peso molecular disminuye drásticamente debido a impedimentos estéricos, que obstaculizan la aproximación del sustrato a la molécula de enzima. Sin embargo, cuando el sustrato es de bajo peso molecular no se observan cambios en la actividad enzimática con respecto a la enzima nativa en estado soluble, puesto que el acercamiento del sustrato a las moléculas de enzima no estará impedido.

Si la enzima se inmoviliza por el método de atrapamiento, este efecto será más notorio, puesto que la acción de la enzima sobre su sustrato estará limitado por la posibilidad de las moléculas de sustrato para penetrar a través de los poros de la membrana semipermeable formada.

Sin embargo, en contraposición con lo antedicho, en otros casos se ha observado, que la acción de determinadas enzimas inmovilizadas frente sustratos de elevado peso molecular está favorecida frente a la acción de estas enzimas frente a sustratos de bajo peso molecular. Esto puede ser debido a las fuerzas atractivas entre el sustrato y el

soporte de inmovilización, que en determinadas ocasiones serán más importantes que los impedimentos estéricos que pudieran surgir entre ambos. Por otro lado, en el caso de enzimas que normalmente actúan frente a sustratos de bajo peso molecular, su inmovilización, en general, no provoca cambio alguno en la especificidad por su sustrato (Tosa et al., 1967; Weetall y Baum, 1970). No obstante, se ha descrito que la introducción de un espaciador químico o eslabón de dos a ocho átomos de carbono a modo de cadenas lineales alquílicas, provoca una disminución de los impedimentos estéricos de los sustratos en su aproximación a las moléculas de enzima inmovilizada, por lo que será interesante su incorporación al soporte de inmovilización cuando los impedimentos estéricos descritos sean importantes (Sturgeon, 1988; Jayakumari y Rajasekharan-Pillai, 1991).

1.2.3.2 pH óptimo de enzimas inmovilizadas

Como es conocido, el pH del medio acuoso donde se encuentra la enzima, tiene una gran influencia, tanto para su estabilidad como para la actividad catalítica que muestra hacia su sustrato. Toda enzima, en su estado nativo soluble, muestra un comportamiento característico de su actividad enzimática frente a un determinado sustrato en función del pH del medio en que actúa, dando lugar a unas curvas de actividad-pH características. Cualquier cambio en estas curvas debido a la inmovilización de la enzima podrá ayudar a entender la relación que existe entre la estructura de la enzima y la función que desempeña.

Se conocen casos en que la inmovilización provoca cambios tanto en el pH óptimo de acción de la enzima hacia su sustrato como en las curvas de actividad-pH, y también se conocen casos en que la inmovilización no provoca tales cambios (Khare y Gupta, 1990). Estos cambios, cuando se producen, se deben a la carga de la enzima y/o del soporte de inmovilización. Entre las enzimas que muestran un cambio en el pH óptimo de acción citaremos β -galactosidasa inmovilizada por el método de atrapamiento por formación de microcápsulas de nitrocelulosa (Wadiak y Carbonell, 1975). En este caso, el pH óptimo de acción frente a ONPG cambió de 7-7,5 de la enzima nativa a 6,5 cuando fue inmovilizada.

Hay muchos casos en que el cambio del pH óptimo de acción no va acompañado de un cambio en la curva de actividad-pH. Es decir, se produce un desplazamiento paralelo de la curva de actividad-pH a lo largo del eje de abscisas (valores de pH), de modo que el valor de pH óptimo se modifica pero sin alterarse la forma de la curva.

Los cambios observados en el pH óptimo de acción de una enzima debido a su inmovilización se han cuantificado, en general, entre 0,5 y 1 unidad de pH, ya sea hacia el lado ácido o básico con respecto al pH óptimo presentado por la enzima nativa soluble. El que el cambio se produzca en un sentido u otro depende de la carga electrostática presente sobre el soporte de inmovilización (Goldstein et al., 1964; Axén et al., 1970; Hsiao y Royer, 1979), y el rango de variación observado se encuentra dentro del intervalo teórico de capacidad amortiguadora de un tampón aunque en determinados casos se han descrito variaciones de hasta 2 unidades de pH (Levin et al., 1964; Patel et al., 1969; Axén et al., 1970; Grzywnowicz et al., 1992). Además, se observa que a elevada fuerza iónica la curva de actividad-pH es similar a la mostrada por la enzima nativa soluble. Esto último es debido a que cuando la fuerza iónica es alta, la carga positiva y/o negativa del soporte de inmovilización se contrarresta por los aniones y/o cationes, respectivamente, del medio, no siendo necesario involucrar a los OH^- y/o H^+ del tampón utilizado para este fin. El desarrollo teórico y cuantificación de este fenómeno ha sido establecido (Goldstein et al., 1964).

En otras ocasiones se ha descrito un cambio simultáneo en el pH óptimo de acción de la enzima y en la curva de actividad-pH frente a un determinado sustrato. Así, se han descrito casos en que la curva de pH-actividad para un determinado sustrato se hizo más estrecha que la correspondiente a la enzima nativa en estado soluble (O'Neill et al., 1971). Además, también se han descrito otros casos en que las curvas de pH-actividad en lugar de hacerse más estrechas se hicieron más anchas (Weetall et al., 1974a; Liberatore et al., 1976).

Cuando se inmovilizan enzimas por atrapamiento en geles de poliacrilamida, teóricamente, no debería ocurrir cambio alguno en la enzima y si además, consideramos que el gel de poliacrilamida es eléctricamente neutro, entonces no debiera producirse ninguna variación ni en el pH óptimo ni en las curvas de pH-actividad de la enzima inmovilizada. Sin embargo, en determinados casos se observó ambos cambios en las preparaciones finales de enzimas inmovilizadas (Mori et al., 1972a; Bernfeld et al., 1969), donde las curvas de pH-actividad se hicieron más estrechas.

Además y como se ha indicado en el apartado 1.2.2.5 anterior, para mejorar la actividad de las preparaciones finales de enzimas inmovilizadas, éstas se han inmovilizado en presencia de sustratos, productos o inhibidores específicos. Así se ha descrito que tripsina inmovilizada en presencia de su sustrato presenta un pH óptimo de acción diferente de cuando se inmovilizó en ausencia de éste (Uy et al., 1976).

También se ha descrito que determinadas enzimas, tras la inmovilización, no mostraron cambio en su pH óptimo de acción, aunque sí cambió la curva de pH-actividad (Mori et al., 1973; Bernfeld y Bieber, 1969; Husain et al., 1996; Liberatore et al., 1976).

Por último, mencionaremos los casos en que no se ha observado cambio alguno ni en el pH óptimo de acción ni en las curvas de pH-actividad frente a un determinado sustrato (Bar-Eli y Katchalski, 1963; Axén et al., 1971; Stenn y Blout, 1972; Tosa et al., 1973; Cebra et al., 1961).

1.2.3.3 Temperatura óptima de enzimas inmovilizadas

Como es sabido, la actividad enzimática depende de la temperatura de reacción, al igual que ocurre con catalizadores químicos ordinarios. Sin embargo, a temperatura superior a un determinado valor, se pierde la actividad catalítica como consecuencia de la desnaturalización de la enzima. En algunos casos, debido a la inmovilización, se produce un cambio en la temperatura óptima de acción de determinadas enzimas. En unos casos fue superior al valor mostrado por las enzimas nativas solubles (Bishop et al., 1966; Mori et al., 1972a) y en otros casos, ocurrió al contrario, de tal modo que la temperatura óptima de las enzimas inmovilizadas fue inferior que la mostrada por las correspondientes enzimas nativas en estado soluble (Mori et al., 1973).

En el caso de aminoacilasa (Chibata, 1978) la temperatura óptima mostrada por la enzima inmovilizada por diferentes métodos de inmovilización, en unos casos fue superior y en otras inferior a la mostrada por la enzima nativa soluble, dependiendo del método de inmovilización empleado. Sin embargo, para el caso de invertasa inmovilizada, también, por diferentes métodos, la temperatura óptima mostrada por todas las preparaciones finales obtenidas fue siempre inferior a la de la enzima nativa. Por otro lado, en otros muchos trabajos no se produce cambio alguno en la temperatura óptima de acción de las enzimas inmovilizadas (Strandberg y Smiley, 1972; Royer y Andrews, 1973; Gregor y Rauf, 1975; Walter, 1976; Khare y Gupta, 1990).

1.2.3.4 Constantes cinéticas de enzimas inmovilizadas

Este estudio es de gran importancia ya que debido a la inmovilización puede producirse un cambio conformacional de la enzima y por lo tanto, verse alterada la afinidad entre la enzima y su sustrato (Chibata, 1978).

Constante de Michaelis (K_m)

En algunos casos (Chibata, 1978) se ha observado que el cambio producido en el valor de K_m debido a la inmovilización, ha sido pequeño o nulo, dependiendo no sólo del método de inmovilización empleado sino también del sustrato ensayado. En estos casos, el cambio experimentado no supera un orden de magnitud. Así, por ejemplo, β -galactosidasa (Sharp et al., 1969), inmovilizada por el método de alquilación a dicloro-s-triazinil-celulosa, mostró un valor de K_m hacia ONPG cuatro veces superior que el mostrado por la enzima nativa.

Cuando se inmoviliza una enzima por unión a un soporte insoluble en agua, se considera que la interacción electrostática entre el soporte y el sustrato es una de las causas de la modificación en el valor de K_m (Guilbault, 1984). Así, ficina inmovilizada sobre el derivado azida de CM-celulosa por el método de enlace peptídico (Hornby et al., 1966), mostró un valor de K_m hacia benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) diez veces inferior al mostrado por ficina soluble. Esta disminución puede ser explicada como debida a un aumento en la atracción electrostática entre el soporte cargado negativamente y el sustrato cargado positivamente, de tal modo que la concentración de sustrato en las proximidades de la enzima inmovilizada es superior que la presente en la disolución externa. Por lo tanto, debido a este diferente reparto en la concentración de sustrato entre el medio interno y externo, la reacción enzimática transcurre a una concentración de sustrato superior que la empleada, dando lugar a una disminución aparente en el valor de K_m .

Un efecto justo al contrario del descrito, se observó cuando la carga electrostática presente sobre el soporte de inmovilización coincidió con la presente en el sustrato de la enzima inmovilizada, dando lugar, por lo tanto, a un aumento en el valor de K_m hacia ese sustrato (Hornby et al., 1968). Si el soporte de inmovilización y/o el sustrato de la enzima no son especies cargadas, entonces no habrá interacciones entre ambos y, en consecuencia, el valor de K_m teóricamente, no debiera cambiar. Por lo tanto, el cambio observado en los valores de K_m en estas condiciones, no debe interpretarse como una modificación de la afinidad de la enzima por el sustrato, sino más bien como una modificación de la disponibilidad de ese sustrato por parte de la enzima.

Para verificar que el cambio en los valores de K_m es debido a interacciones electrostáticas entre el soporte de inmovilización y el sustrato de la enzima, se ensayaron enzimas inmovilizadas sobre soportes cargados para conocer sus valores de K_m frente a sustratos también cargados, a diferente fuerza iónica del medio de reacción (Goldstein et al., 1964). Se observó que al aumentar la fuerza iónica del medio, el valor de K_m se aproximó al calculado para la enzima nativa. Esto puede deberse a que al aumentar la fuerza iónica, los iones presentes en el medio de reacción interfieren en las interacciones entre el soporte de inmovilización y el sustrato, de modo que no se producirá una diferente distribución de la concentración de sustrato entre el medio interno y externo de la enzima inmovilizada.

Además del factor antes considerado, otros factores pueden ser responsables de la modificación en los valores de K_m calculados. Así, se han observado cambios en estos valores debido a limitaciones en la difusión del sustrato y/o producto de la enzima a través de la preparación final de enzima inmovilizada (Axén et al., 1970). Este efecto es principalmente notorio cuando la enzima se inmoviliza por el método de atrapamiento (Mori et al., 1973), ya sea en el retículo de un gel o en el interior de microcápsulas, ya que en este caso las limitaciones a la difusión del sustrato y/o producto a través del retículo o de la membrana semipermeable formada son más explícitas y notorias, dando lugar a una diferente distribución del sustrato, cuya concentración, ahora, será menor en el interior del retículo y/o microcápsulas que en el exterior. De este modo se obtienen valores de K_m de hasta dos órdenes de magnitud superiores a los medidos para la enzima nativa en estado soluble.

Velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$)

En los estudios de $V_{m\acute{a}x}$ de reacción de una enzima inmovilizada frente a un determinado sustrato, se han descrito casos en que apenas se produjo un cambio con respecto al valor medido para la enzima nativa soluble (Chibata, 1978; Mason y Weetall, 1972). Para β -galactosidasa (Sharp et al., 1969), el valor medido tras la inmovilización fue treinta veces superior que el de la enzima soluble. Sin embargo, en otros casos (Filippusson y Hornby, 1970) el valor medido fue inferior al obtenido para la enzima nativa.

En este caso, el método de inmovilización empleado, en sí mismo, no determinó el sentido de la modificación observada ni la extensión de ésta.

1.2.3.5 Estabilidad

Se ha observado que en muchos casos debido a la inmovilización, la estabilidad de las enzimas inmovilizadas ha aumentado con respecto a la estabilidad mostrada por las correspondientes enzimas nativas solubles. Este hecho es de gran importancia para la aplicación industrial de tales enzimas inmovilizadas. Esta tendencia no es general, y en cada caso deberá determinarse si la inmovilización ha provocado un aumento, una disminución o ningún cambio sobre la estabilidad de la enzima inmovilizada. Además, no hay una correlación general entre el método de inmovilización usado y la estabilidad alcanzada.

A continuación, se describirán, brevemente, aquellos factores para los que resulta de interés comprobar si la inmovilización ha provocado o no alguna modificación en su estabilidad.

Estabilidad hacia reactivos

Se ha observado un aumento de la estabilidad de enzimas inmovilizadas hacia agentes desnaturizantes o inhibidores específicos (Zaborsky y Ogletree, 1972; Pennington et al., 1968; Gregor y Rauf, 1975; Gabel et al., 1970; Glassmeyer y Ogle, 1971). En algunos casos, incluso se ha observado un efecto activador por parte de aquellos reactivos responsables de la inactivación de la enzima nativa (Gabel et al., 1970; Osheroff y Guillory, 1972). Aunque el mecanismo de activación que lo provoca no está claro.

También se han descrito casos en que la estabilidad frente a determinados reactivos disminuye debido a la inmovilización (Schwabe, 1969), así como casos en que no se ha observado cambio alguno con respecto a la estabilidad mostrada por la enzima nativa frente a esos reactivos (Schejter y Bar-Eli, 1970; Glassmeyer y Ogle, 1971). El estudio de la estabilidad frente a determinados agentes, es de gran importancia, sobre todo a la hora de considerar la aplicación para la que ha sido diseñada la enzima inmovilizada. Así, en determinados casos, se ha observado un aumento de la estabilidad de enzimas inmovilizadas frente a disolventes orgánicos, en los que, en general, las enzimas son muy inestables. Esto aumentaría el campo de aplicación de las reacciones enzimáticas, y la posibilidad de utilizarlas como catalizadores en reacciones químicas de síntesis orgánica.

En el presente trabajo se ha estudiado, cómo la inmovilización de HRPc afectaba a su estabilidad frente a uno de sus sustratos: H₂O₂. Es conocido el efecto inactivador de

este sustrato, sobre todo en ausencia del sustrato reductor, por ejemplo ABTS, que además de ser el segundo sustrato de la enzima, actúa como agente protector frente a la inactivación provocada por H_2O_2 .

Estabilidad hacia enzimas proteolíticas

Cuando se realiza una reacción enzimática usando un extracto enzimático crudo, a menudo, se provoca la inactivación de la actividad catalítica por la presencia de enzimas proteolíticas contaminantes. En general, se observa que la inmovilización provoca un aumento de la estabilidad de las enzimas hacia actividades proteolíticas presentes en el medio de reacción, en comparación con las correspondientes enzimas nativas (Dixon y Stolzenbach, 1974; Grzywnowicz et al., 1992). En el caso de enzimas proteolíticas como tripsina y papaína, la inmovilización provocó una limitación de la actuación de la enzima hacia sustratos de elevado peso molecular debido a impedimentos estéricos. Así, el aumento de su estabilidad fue debido a una disminución en la extensión de su autólisis (Cebra et al., 1961; Katchalski y Bar-Eli, 1960b). También puede ocurrir, en estos casos, que los aminoácidos que reconocen las enzimas proteolíticas para su acción estén bloqueados por estar implicados en el enlace responsable de la inmovilización. En estas condiciones, también estará reducida la autólisis (Katchalski y Bar-Eli, 1960b).

Cuando se desea estabilizar enzimas frente a actividades proteolíticas, se considera que el método de inmovilización por atrapamiento resulta efectivo, ya que como la enzima está encerrada en el interior de un polímero semipermeable, no entrará en contacto con la enzima proteolítica, de elevado peso molecular, presente en el medio externo (Mori et al., 1972b; Mori et al., 1973).

Estabilidad Térmica

Ya se ha mencionado que la actividad catalítica de las enzimas aumenta al elevar la temperatura, pero que a temperatura demasiado alta se provoca la desnaturalización de éstas. Por lo tanto, si se consigue aumentar su estabilidad frente a la temperatura operacional, se conseguirá extender, también, el campo de utilización de estas enzimas.

Se han aportado ejemplos en que la estabilidad térmica aumenta (Toraya et al., 1975; Patel et al., 1972), disminuye (Schwabe, 1969) o bien que no se modifica (Tosa et al., 1973).

La actividad enzimática retenida tras el tratamiento térmico de una determinada enzima inmovilizada, depende del método de inmovilización empleado, aunque el efecto del método de inmovilización sobre la estabilidad térmica mostrada por una determinada enzima no es extrapolable a otras enzimas. Sin embargo, en la mayoría de las enzimas inmovilizadas por adsorción física se observó una disminución de la estabilidad térmica.

Es de destacar que aunque cuando se emplea el método de inmovilización covalente, las preparaciones finales fueron, en principio, menos estables, sin embargo la caída de la actividad enzimática por efecto de la temperatura siguió una cinética de tipo exponencial, tendiendo asintóticamente a un valor mínimo. Esta es la explicación del porqué en intervalos de temperatura más elevada, la estabilidad térmica mostrada por las preparaciones de enzima inmovilizada mediante enlace covalente suele ser mayor que la inmovilizada mediante un método diferente.

Se ha sugerido que la estabilidad térmica de enzimas inmovilizadas depende del tamaño de poro del soporte usado para la inmovilización (Horigome et al., 1974; Manjón et al., 1985). Este efecto estabilizador dependiente del tamaño de poro del soporte de inmovilización utilizado se ha observado también al estudiar la estabilidad de enzimas frente a factores como pH, EDTA y urea. Así, se ha sugerido que podría haber un tamaño de matriz óptimo para estabilizar las enzimas. Este efecto, podría estar en relación con las observaciones realizadas en el presente trabajo, que muestran que la actividad enzimática inmovilizada, así como la presente después de un almacenado prolongado, dependió del grado de entrecruzamiento de los monómeros utilizados y, por lo tanto, del tamaño de poro del polímero final obtenido. Además, se encontró la existencia de un grado de entrecruzamiento óptimo en el cual la actividad enzimática retenida fue máxima.

Estabilidad frente al almacenado

La estabilidad frente al almacenado, es otro factor a considerar dependiendo de la aplicación final de la enzima inmovilizada. Al igual que en los casos anteriores, se conocen casos en que la estabilidad frente al almacenado aumentó (Katchalski y Bar-Eli, 1960b), así como casos en que disminuyó (Weibel et al., 1975; Goldstein et al., 1971). Al igual que ocurre durante el proceso de inmovilización (apartado 1.2.2.5), se ha observado que la estabilidad frente al almacenado de una enzima inmovilizada aumenta si en el medio de inmovilización está presente algún sustrato de la enzima.

También cuando se emplean para la inmovilización de enzimas, soportes inorgánicos, como vidrio poroso, las preparaciones finales tuvieron mayor estabilidad

frente al almacenado, que cuando se emplearon soportes orgánicos como celulosa (Weetall, 1970a). De los métodos de enlace a estos soportes inorgánicos disponibles, el método de enlace diazo fue el que proporcionó la mayor estabilidad frente al almacenado. Sin embargo esta observación no puede ser generalizada puesto que se han obtenido enzimas inmovilizadas sobre soportes orgánicos con una estabilidad muy elevada frente al almacenado.

Estabilidad operacional

Este factor es uno de los más importantes a tener en cuenta a la hora de que la aplicación industrial de la enzima inmovilizada resulte con éxito, puesto que además de conseguir la estabilidad frente a los factores descritos en los apartados anteriores, es de gran importancia que la enzima inmovilizada pueda ser utilizada en la mayor cantidad de ensayos posibles, con la garantía de que los resultados obtenidos sean perfectamente reproducibles y fiables.

La estabilidad operacional depende de la estabilidad térmica, durabilidad del soporte, presencia y concentración de inhibidores orgánicos así como de metales pesados y apelmazado del soporte de inmovilización durante su reutilización. El que la estabilidad operacional bajo condiciones de trabajo controladas dependa de la temperatura no significa que la pérdida de actividad enzimática sea debida a desnaturalización de la enzima inmovilizada. Así, se ha descrito que β -galactosidasa inmovilizada sobre vidrio poroso recubierto con ZrO_2 por entrecruzamiento con glutraldehído retuvo el 50% de su actividad inicial después de ser utilizada durante 54 días a 40°C para la hidrólisis de suero azucarado ó 100 días a 30°C para la hidrólisis de lactosa (Weetall et al., 1974b).

Estabilidad frente al pH

Además de las propiedades enzimáticas antes descritas, también se ha estudiado el efecto del pH sobre la estabilidad de las enzimas inmovilizadas. Se ha observado que cuando el soporte usado para la inmovilización estaba cargado, la estabilidad de las enzimas inmovilizadas aumentaba por cambio hacia valores de pH alcalinos, cuando se usó un soporte polianiónico, mientras que aumentaba hacia valores de pH ácidos cuando se usó un soporte policatiónico (Levin et al., 1964; Goldstein, 1970). Si el soporte usado para la inmovilización es neutro, la dependencia frente al pH de la estabilidad mostrada por la enzima inmovilizada fue similar a la mostrada por la enzima soluble (Goldstein, 1970; Goldstein et al., 1970; Silman et al., 1966). Si embargo, también se han descrito

casos en que la enzima inmovilizada sobre soportes neutros, muestran estabilidad en regiones de pH diferentes que la mostrada por las correspondientes enzimas solubles (Goldstein, 1970; Goldstein et al., 1970; Goldstein et al., 1964).

1.2.4 Ventajas y desventajas de la inmovilización

El uso de enzimas con fines analíticos ha estado limitado por su inestabilidad, mala precisión y falta de disponibilidad. Además, las enzimas no pueden ser recuperadas de la disolución, ni su actividad regenerada cuando se pierde, en algunos casos demasiado rápidamente. La inmovilización de enzimas elimina o disminuye estas dificultades. Las enzimas inmovilizadas retienen sus propiedades catalíticas durante más tiempo y pueden utilizarse continuamente durante mayor número de análisis.

Entre las principales ventajas que las enzimas inmovilizadas ofrecen sobre las enzimas solubles, cuando se emplean como reactivos analíticos, mencionaremos las siguientes (Guilbault, 1984; Tischer y Wedekind, 1999; Tischer y Kasche, 1999):

- a) **Reutilización.** Muchas enzimas son muy caras, y la realización de análisis requiere gran cantidad de ellas, por lo que resultan costosos. Su inmovilización proporciona muestras que pueden ser reutilizadas gran número de veces con el correspondiente ahorro.
- b) **Gran estabilidad.** En muchos casos la inmovilización proporciona una mejora en la estabilidad de la enzima frente a diferentes factores. Así, se consigue que las enzimas puedan ser usadas en rangos de pH más amplios así como a temperaturas más elevadas. También se consigue un aumento de estabilidad frente al almacenado y continua reutilización, así como a diferentes agentes inactivadores y/o desnaturalizantes. Todo esto permite la utilización de las enzimas inmovilizadas durante períodos de tiempo más prolongados y durante un número mayor de ensayos, con el consiguiente ahorro en las pruebas analíticas realizadas. También se ha mejorado la estabilidad de ciertas enzimas inmovilizadas en medio orgánico, aumentando, así, sus posibilidades de utilización.
- c) **Pocas interferencias.** Las enzimas inmovilizadas parecen ser menos susceptibles a la acción de activadores e inhibidores que afectan a la enzima nativa soluble. Sólo serán capaces de modificar su actividad catalítica aquellos activadores y/o inhibidores más potentes. Esto es de especial importancia en los ensayos con muestras analíticas complejas como sangre o excrementos

en que el control de la presencia de agentes que interfieran en la acción catalítica de la enzima es prácticamente imposible. Además, también se posibilita la utilización de extractos enzimáticos crudos con el consiguiente ahorro en posteriores fases de purificación, sobre todo si se considera que la propia inmovilización supone un paso de purificación si la elección del soporte de inmovilización ha sido la adecuada en base a las características físico-químicas de la enzima a inmovilizar.

- d) Protección del medio ambiente.** La posibilidad de realizar las reacciones enzimáticas o químicas, en general, mediante enzimas o reactivos químicos inmovilizados posibilita su retirada del medio tras la finalización de la reacción, evitando, así, los posibles problemas de contaminación que acarrearían la presencia de estos agentes en el medio ambiente. Esto es más acentuado en el caso de trabajar con células o virus especialmente contagiosos o peligrosos o, con microorganismos modificados por ingeniería genética, tal que el trabajo en disolución plantea la incertidumbre de si, tras el estudio, se ha eliminado o destruido todo el material. Además, elimina o disminuye de modo considerable los problemas de contaminación derivados por pérdidas accidentales.

Además, en el campo de la Tecnología de los Alimentos, la posibilidad de emplear antioxidantes, acidulantes y otros conservantes inmovilizados en las paredes internas de los recipientes de almacenado permitiría la realización, sin ningún tipo de impedimento, de su acción química pero sin estar presentes en el “líquido de gobierno” lo que permitiría el consumo de los alimentos sin que ello implique la ingestión de los agentes arriba mencionados.

Sin embargo, las modificaciones observadas durante el proceso de inmovilización, en determinadas circunstancias suponen algunas desventajas con respecto a las enzimas solubles. Así, puede ocurrir que se produzca una disminución en la especificidad y actividad hacia el sustrato, sobre todo cuando éste es de elevado peso molecular debido a los impedimentos estéricos entre el soporte y el sustrato que obstaculizan la aproximación de este último a las moléculas de enzima.

También se ha citado que puede ocurrir un cambio en el pH óptimo de la enzima o un estrechamiento en el rango de pH en el que la enzima trabaja de modo adecuado. Un cambio en el pH óptimo de la enzima puede suponer, sobre todo en el caso de sustratos ionizables, que la concentración real de éste disponible para la reacción enzimática sea

menor que la inicialmente añadida, dando lugar a una disminución, aparente, de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Además, y debido al cambio conformacional que puede ocurrir durante la inmovilización, puede darse un aumento en el valor de K_m de la enzima por su sustrato o una disminución en la $V_{m\acute{a}x}$ de la reacción enzimática. Esto ocurrirá, sobre todo, cuando el soporte y el sustrato sean especies cargadas, e implicará, junto con lo indicado en el párrafo anterior, una disminución aparente de la afinidad de la enzima por su sustrato. Esta modificación en los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ será más acentuada si se producen limitaciones en la difusión del sustrato y/o producto de la enzima a través del soporte de inmovilización.

Por último, en algunas ocasiones el proceso de inmovilización produce una disminución en la estabilidad de la enzima inmovilizada a factores diversos como inhibidores específicos, agentes desnaturalizantes, temperatura (sobre todo en enzimas inmovilizadas por adsorción física), almacenado, pH extremos, etc. En todos estos casos, estará limitada la utilización de enzimas inmovilizadas.

1.2.5 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

Tanto enzimas como células microbianas inmovilizadas se utilizan en varios campos, tales como procesos químicos, análisis, tratamientos médicos, procesado de alimentos, cromatografía de afinidad, tratamiento de aguas residuales, etc. A veces para que la aplicación de las enzimas inmovilizadas sea eficiente, es necesario la realización de estudios de ingeniería química para el diseño de los reactores enzimáticos más adecuados.

Independiente del reactor químico utilizado, la utilización de enzimas inmovilizadas es ventajosa, puesto que en el peor de los casos la enzima puede ser recuperada por centrifugación o filtración y, posteriormente ser reutilizada. Además el aislamiento y purificación del producto de reacción será fácil de realizar. También es posible el diseñar sistemas donde la reacción enzimática se realice en continuo. Serán también ventajas a considerar, la posibilidad de automatizar las operaciones y el aumento del rendimiento de la reacción por unidad de enzima.

Los reactores enzimáticos utilizados pueden clasificarse por el modo de operación y características de flujo del sustrato y del producto de reacción. La elección del reactor

dependerá de la aplicación industrial proyectada y de las características de la enzima inmovilizada. Así, puede mencionarse:

- a) **Reactor de baño de tanque agitado.** Es el más simple de todos, y es adecuado para soluciones de sustrato de alta viscosidad, para enzimas inmovilizadas de baja actividad, y para la obtención de pequeñas cantidades de productos químicos. Sin embargo, tiene el inconveniente que la enzima inmovilizada tiende a descomponerse debido a la agitación física. La enzima inmovilizada y la disolución de sustrato se mezclan al comienzo del proceso, y finalizado éste el producto de reacción se separa y purifica.
- b) **Reactor continuo de tanque agitado.** Es más eficiente que el anterior, pero requiere un poco más de equipamiento que permita la entrada de sustrato y la salida de producto del medio de reacción, de modo continuo.
- c) **Reactor continuo de lecho empaquetado.** Son los más utilizados para la inmovilización de enzimas. En ellos la preparación con enzima inmovilizada se empaqueta en el interior de una columna. A su vez, la circulación de la disolución de sustrato puede ser de flujo ascendente, de flujo descendente y con recirculación. Se prefiere el flujo ascendente cuando en la reacción se forma un producto gaseoso o bien cuando la posible utilización de un flujo descendente provocaría una compresión de la columna. Estos reactores son adecuados cuando la enzima usada es cara y/o la velocidad de reacción enzimática es elevada. Estos métodos continuos tienen la ventaja añadida sobre los métodos de baño en que la operación y control es fácil de automatizar, se reduce los costos de manipulación por operarios, posibilidad de estabilizar las condiciones de trabajo y, fácil control de calidad del producto de reacción, que es obtenido con elevada pureza y en mayor cantidad. Sin embargo el coste inicial del equipamiento es bastante elevado y la posibilidad de usarse con una amplia variedad de enzimas y sustratos es menor que en los reactores de baño.
- d) **Reactor continuo de lecho fluidizado.** Este sistema contiene la enzima inmovilizada en suspensión dentro del medio de reacción. La disolución de sustrato se introduce por la parte inferior de la columna y el producto de reacción se extrae por la parte superior. El tamaño de partícula de la enzima inmovilizada es importante para la formación del lecho fluidizado. Este método es conveniente cuando la disolución de sustrato es de elevada viscosidad y

cuando se forma un sustrato o producto gaseoso continuamente en el sistema de reacción.

- e) **Membranas de ultrafiltración.** En este caso, la enzima se utiliza soluble, sólo que en el interior de un dispositivo que contiene una membrana de ultrafiltración. Es adecuado para sustratos de elevado peso molecular y productos de bajo peso molecular. Aquí también pueden ser nombrados los mecanismos de fibra hueca cuyas características son similares a las membranas de ultrafiltración.
- f) **Tubos de enzima.** El flujo a través de estos tubos suele ser laminar, salvo cuando las paredes internas se recubren con algún gel, en cuyo caso el flujo se torna turbulento.
- g) **Películas de enzima.** Para aumentar la superficie específica de estas películas por unidad de volumen de reactor, se han ideado diferentes mecanismos, tales como un reactor de tipo espiral, en el que la película inicial es arrollada a modo de espira.

Como factores que influyen en la caída de la actividad enzimática durante una reacción enzimática en continuo puede considerarse, la desnaturalización de la enzima debido a la temperatura de reacción, cambios de pH, etc., adsorción de sustancias inhibitoras, contaminación bacteriana, pérdida de la propia enzima o de estabilizadores de ésta, descomposición del soporte material, alteración del flujo en la columna, modo incorrecto de operación, etc. Un parámetro que mide esta caída de la actividad enzimática o grado de estabilidad operacional es el “tiempo de vida media”.

Para la aplicación industrial de enzimas inmovilizadas, deberán considerarse factores como coste del soporte y reactivos para la inmovilización, disponibilidad de la enzima y actividad mostrada tras su inmovilización, estabilidad operacional de la preparación final, regeneración de la enzima inmovilizada deteriorada tras largos períodos de operación. También deberán considerarse aquellos factores necesarios para la elección del reactor enzimático adecuado.

1.2.5.1 Utilización de enzimas inmovilizadas en procesos químicos

Reacciones Redox

Se han publicado diferentes ejemplos de inmovilización de enzimas oxido-reductasas para la obtención de una gran variedad de sustancias químicas. Así es de

gran importancia la inmovilización de L-aminoácido oxidasa para la obtención de L-aminoácidos a partir de las correspondientes mezclas racémicas, con un rendimiento superior que cuando se utilizó enzima soluble (Weetall y Baum, 1970). También se ha inmovilizado tirosinasa para la obtención de L-DOPA a partir de L-tirosina (Wykes et al., 1971). Ha sido importante la inmovilización de flavoproteína oxidasa hepática, usada para la obtención de metabolitos N-oxidados de drogas útiles clínicamente como etilmorfina, cloropromazina, etc., y que son difíciles de obtener por otros métodos. También se ha descrito la inmovilización conjunta de células y enzimas para desarrollar reacciones de conversión de diferentes hormonas esteroideas (Mosbach y Larsson, 1970).

Reacciones de transferencia

Se trata de reacciones que conducen a la síntesis de sustancias de elevado peso molecular tales como polisacáridos y ácidos nucleicos. Así se ha descrito la inmovilización covalente de fosforilasa para la obtención de un polisacárido de elevado peso molecular (Marshall y Walter, 1972). También se ha aportado la inmovilización de polinucleótido fosforilasa para la síntesis de polinucleótidos (Smith et al., 1973). Y también la inmovilización de carbamato quinasa para la regeneración de ATP a partir de ADP (Marshall, 1973).

Reacciones de hidrólisis

Se han inmovilizado muchos tipos de hidrolasas para la obtención de diferentes sustancias químicas. Como razones de su elevado uso puede mencionarse la existencia de muchos diferentes tipos de ellas, que generalmente son estables, no requieren coenzimas y que se hacen más estables debido a la inmovilización, por lo que pueden usarse durante largos períodos de tiempo. Así, se ha inmovilizado la enzima aminoacilasa para la producción industrial de L-aminoácidos (Tosa et al., 1966; Chibata y Tosa, 1976; Chibata et al., 1976a; Tosa et al., 1967; Weetall y Detar, 1974a), que son de gran importancia en medicina, alimentos y comida de animales, puesto que son las formas naturales fisiológicamente activas. Estos L-aminoácidos se obtienen por resolución óptica a partir de las correspondientes mezclas racémicas de acil-DL-aminoácidos. Se han obtenido por este procedimiento, metionina, fenilalanina, valina y otros aminoácidos ópticamente activos.

Se han utilizado otras hidrolasas inmovilizadas para la obtención de L-aminoácidos. Entre ellas puede nombrarse carboxipeptidasa y leucina-aminopeptidasa (Chibata, 1978).

Pueden realizarse otras reacciones de hidrólisis de interés industrial, mediante la utilización de enzimas inmovilizadas. Así, puede mencionarse la obtención de glucosa a partir de la hidrólisis de almidón por medio de α - o β -amilasa y glucoamilasa inmovilizadas (Wilson y Lilly, 1969; Dinelli, 1972; Stone, 1955; Weetall et al., 1974a; Weetall et al., 1976; Weetall, 1975). También puede obtenerse D-glucosa por hidrólisis de celulosa por acción de la enzima celulasa, en un reactor enzimático provisto de una membrana de ultrafiltración (Ghose y Kostick, 1970; Mandels et al., 1971).

También es de interés industrial la producción de azúcares invertidos. Así, para ello se ha inmovilizado la enzima invertasa por diferentes métodos (Mason y Weetall, 1972; Dinelli, 1972) y utilizado para la hidrólisis continua de sacarosa.

Nombraremos, además, la producción del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) como intermediario en la fabricación de penicilina sintética. Para ello, se ha descrito la utilización de una columna empaquetada con penicilina amidasa inmovilizada (Dinelli, 1972). Otra hidrolasa inmovilizada ha sido papaína, utilizada para la hidrólisis de caseína (Weetall y Mason, 1973).

Síntesis asimétrica

Dentro de este apartado cabe mencionar la síntesis de ácido L-aspartico a partir de ácido fumárico y amoníaco por la acción de la enzima aspartasa inmovilizada (Tosa et al., 1973). Esta enzima intracelular es inestable cuando se extrae de las células, por lo que se prefiere la preparación de ácido L-aspartico mediante la inmovilización directa de células que presentan esta actividad enzimática. Además es de interés la preparación de ácido L-málico a partir de ácido fumárico por la acción de la enzima fumarasa, así como la preparación del ácido urocánico a partir de L-histidina por la acción de la enzima L-histidina amonioliasa. En ambos casos, y al igual que ocurre con la preparación del ácido L-aspartico, se prefiere la utilización de células inmovilizadas que contienen actividad fumarasa o actividad L-histidina amonioliasa, respectivamente.

Además de las aplicaciones antes descritas, cabe citar la inmovilización de D-oxinitrilasa para la conversión en continuo de benzaldehído a D-(+)-mandelonitrilo, así como para la conversión de aldehídos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos a los correspondientes nitrilos en presencia de ácido cianhídrico.

Reacciones de isomerización

Es de especial importancia la inmovilización de glucosa isomerasa para catalizar la isomerización de glucosa a fructosa, para la obtención de edulcorantes análogos a hidrolizados de sacarosa. (Mermelstein, 1975; Fujita, 1976; Strandberg y Smiley, 1972; Glovenco et al., 1973).

Síntesis de compuestos radiactivos

Debido a la gran utilización que en la actualidad se hace de compuestos radiactivos, se ha descrito el uso de enzimas inmovilizadas para la síntesis de compuestos que contienen isótopos de vida media corta como ^{11}C o ^{13}N y, con elevada pureza (Cohen et al., 1974). En este sentido, se ha utilizado glutamato deshidrogenasa y glutamato-piruvato transaminasa inmovilizadas, para la síntesis de ácido ^{13}N -L-glutámico y ^{13}N -L-alanina, respectivamente.

Reacciones con sistemas multienzimáticos

Como ejemplo mencionaremos que la coenzima nicotinamida adenindinucleótido (NAD^+) se prepara por la acción de las enzimas NAD-pirofosforilasa y pirofosfatasa inorgánica convenientemente inmovilizadas en soportes adecuados y empaquetadas en la misma columna de reacción (Traub et al., 1969). También la síntesis de L-lisina usando dos enzimas diferentes inmovilizadas sobre un mismo soporte (Fukumura, 1974) y la síntesis de gliceraldehído-3-fosfato usando hexoquinasa, glucosafosfato isomerasa, fosfofructoquinasa y aldolasa inmovilizadas por separado y empaquetadas conjuntamente en una columna de reacción (Brown et al., 1968). Asimismo, se ha descrito la síntesis de NADPH a partir de hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa inmovilizadas sobre un mismo soporte, a varias relaciones entre sus actividades (Srere y Mosbach, 1974).

Estos sistemas preparados con varias enzimas coinmovilizadas, no sólo se han empleado para la síntesis de compuestos químicos de interés, sino que además han sido empleados para la identificación de diferentes especies químicas como metabolitos, colesterol, azúcares, alcoholes, etc. (Thakur y Pundir, 1999; Hasegawa et al., 1994; Onda et al., 1996; Vijayakumar et al., 1996).

Junto con las aplicaciones anteriores, se ha diseñado su aplicación en órganos artificiales y se ha intentado sustituir ciertas funciones fisiológicas empleando sistemas multienzimáticos microencapsulados. Así, las enzimas carbamato quinasa y ornitina transcarbamilasa han sido microencapsuladas y utilizadas para la síntesis de L-citrulina a

partir de amoníaco, CO₂, ATP y L-ornitina. Se ha realizado el análisis teórico de estos sistemas multienzimáticos (Lawrence y Okay, 1973).

1.2.5.2 Aplicaciones analíticas

La combinación de enzimas inmovilizadas con instrumentos analíticos ha dado lugar a métodos analíticos de gran aplicación en los campos de química y medicina.

Análisis automatizado

El uso de β -galactosidasa y glucosa oxidasa inmovilizadas, en combinación de un espectrofotómetro ha sido utilizado para la determinación de lactosa (Inman y Hornby, 1974). También se ha inmovilizado alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, que dependen de la coenzima NAD⁺, y utilizadas para la determinación automática de etanol, ácido láctico y ácido málico, respectivamente, en combinación con un espectrofotómetro (Hornby et al., 1972) siguiendo la formación de NADH a 340 nm.

También se ha relatado la combinación de enzimas inmovilizadas con autoanalizadores (Hornby et al., 1972; Inman y Hornby, 1972). Así, se ha descrito el análisis automático de glucosa o urea, usando, respectivamente, glucosa oxidasa o urea inmovilizadas. Además, Se ha usado D-aminoácido oxidasa inmovilizada, para la determinación de D-aminoácidos y la pureza óptica de L-aminoácidos y, se ha utilizado un sistema multienzimático formado por triptofanasa y lactato deshidrogenasa inmovilizadas simultáneamente, para la determinación de triptófano. También se han utilizado enzimas inmovilizadas en métodos analíticos basados en el calor de reacción química (Johansson et al., 1973). Por último, la determinación de inhibidores enzimáticos por medio de ensayos de fluorimetría empleando enzimas inmovilizadas (Guilbault y Kramer, 1965), en los cuales la emisión de fluorescencia disminuye por inhibición de la enzima en presencia de un inhibidor.

Electrodos bioquímicos

Su utilización es de gran importancia por la posibilidad de control de la concentración de metabolitos en fluidos corporales, agentes contaminantes en aguas y aire, etc. Se ha desarrollado una gran variedad de tales electrodos (Chibata, 1978; Sosnitza et al., 1998; Boguslavsky et al., 1995; Ruzgas et al., 1995; Ruzgas et al., 1996; Krawczyk y Krawczynski, 1998). Estos electrodos se conocen como “electrodos enzimáticos”. Los electrodos enzimáticos consisten en una capa de enzima que

reacciona específicamente con un determinado compuesto y un electrodo para detectar cambios en la carga de ese compuesto. El electrodo de vidrio es el más comúnmente usado, y es adecuado para la detección de cambios en la concentración de protones. También, se ha descrito la utilización de electrodos específicos para los iones amonio, potasio, sodio, cianuro, fosfato, así como electrodos sensibles a moléculas como O_2 y CO_2 , por su idoneidad para el seguimiento de reacciones enzimáticas. Un electrodo enzimático se prepara inmovilizando la enzima sobre estos electrodos, o recubriendo el electrodo con una capa de enzima previamente inmovilizada.

Como ejemplos, mencionaremos la preparación de electrodos enzimáticos para la determinación cuantitativa de D-glucosa (Updike y Hicks, 1967; Weibel et al., 1973) en muestras o, incluso, directamente en cuerpos vivos. También resaltaremos el uso de peroxidasa inmovilizada en combinación de un electrodo selectivo de iones yoduro para la determinación de L-fenilalanina (Guilbault y Nagy, 1973), determinación de H_2O_2 , colina y acetilcolina (Garguilo et al., 1993; Liu et al., 1995), alcoholes (Vijayakumar et al., 1996), etc.

“Kit” de ensayos clínicos

Un método rápido y sencillo para la determinación de D-glucosa en orina consiste en tiras de papel de filtro empapadas con una solución tampón que contiene glucosa oxidasa, peroxidasa y un reactivo de color apropiado. En este mismo sentido, se ha descrito la utilización de tiras de papel empapadas con peroxidasa inmovilizada y bencidina, para la determinación de H_2O_2 (Weetall y Weliky, 1966). También se han empleado tiras de papel con β -galactosidasa inmovilizada y un colorante para la medida de lactosa en excrementos (Stasiw et al., 1972) o con peroxidasa inmovilizada para la determinación de Hg^{+2} (Shekhovtsova et al., 1995).

Análisis estructural de biopolímeros

Un método para estudiar la estructura primaria de biopolímeros tales como proteínas, ácidos nucleicos, etc., consiste en la hidrólisis limitada por la acción de enzimas proteolíticas o nucleasas convenientemente inmovilizadas. Su utilización, facilitaría la separación de las enzimas inmovilizadas del medio de ensayo, evitando, así, la posible contaminación acarreada por su presencia en estado soluble. Así, se ha determinado la secuencia de aminoácidos de proteínas y polipéptidos utilizando tripsina inmovilizada (Katchalski y Bar-Eli, 1960b; Lowey et al., 1967), así como leucina aminopeptidasa y aminopeptidasa M inmovilizadas (Royer y Andrews, 1973; Schwabe,

1969). Se han inmovilizado otras muchas enzimas con esta finalidad (Bennett et al., 1972).

Por otro lado, se utiliza fosfatasa alcalina inmovilizada para el análisis estructural de ácidos ribonucleicos (ARN) (Zingaro y Uziel, 1970), y, fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa inmovilizadas, para la determinación cuantitativa de la composición de nucleótidos y análisis del extremo 5'-terminal de oligonucleótidos (Knorre et al., 1973).

Elucidación de mecanismos de reacción de enzimas y funciones enzimáticas

Dentro de este apartado, comenzaremos mencionando la utilización de enzimas inmovilizadas para la clarificación del mecanismo de la coagulación sanguínea y del mecanismo de licuefacción/fibrinólisis. Se han publicado diferentes trabajos para elucidar el mecanismo de la coagulación sanguínea (Rimon et al., 1966; Howell y Dupe, 1971; Stenn y Blout, 1972), así como del mecanismo de fibrinólisis (Rimon et al., 1963; Gutman y Rimon, 1964). También se han utilizado para elucidar el mecanismo de activación de varios tipos de zimógenos o precursores inactivos de enzimas. De este modo se ha podido estudiar, entre otros, el mecanismo de activación de quimotripsinógeno a quimotripsina (Mitz y Summaria, 1961), de pepsinógeno a pepsina (Ong et al., 1966) y el de angiotensinógeno a angiotensina (Seki et al., 1970).

Su utilización para el estudio de las interacciones entre las enzimas que participan en un sistema multienzimático también ha sido importante (Mattiasson y Mosbach, 1971), así como servir de modelo para estudiar el mecanismo de acción de enzimas que "in vivo" muestran su actividad catalítica enlazadas a membranas o partículas subcelulares (Goldman et al., 1965; Goldman et al., 1968; Julliard et al., 1971). También se han utilizado enzimas inmovilizadas para investigar las funciones de subunidades de enzimas, así como el mecanismo de disociación y asociación de las subunidades componentes (Chan y Mawer, 1972; Ikeda y Fukui, 1974).

Por último, citar aquí el estudio del mecanismo de reacción de la enzima succinil-CoA-sintetasa, inmovilizando a la vez la enzima y ATP (Wider et al., 1972).

1.2.5.3 Aplicaciones médicas

Esta aplicación es de gran importancia, puesto que, por ejemplo, pueden utilizarse enzimas inmovilizadas por el método de atrapamiento con fines terapéuticos en casos de deficiencia enzimática o desórdenes metabólicos. Así, se han publicado diferentes trabajos en los que se estudia la administración, con fines terapéuticos, de diferentes

enzimas atrapadas en microcápsulas (Chang, 1964; Chang y Poznansky, 1968; Chang, 1971; Mori et al., 1973; Mumtaz y Bachhawat, 1992). Resultan interesantes, los estudios que pretenden atrapar enzimas en membranas que sean degradables y que por lo tanto puedan ser eliminadas del cuerpo en un determinado período de tiempo (Schacht et al., 1993b; Chafi et al., 1991). En este sentido, asparraginasa ha sido atrapada en células de eritrocitos (Updike et al., 1976). También resultan de interés el atrapamiento de enzimas en liposomas para la terapia de determinadas enfermedades (Gregoriadis et al., 1971). También se ha intentado el tratamiento, también con fines terapéuticos, de la sangre mediante un sistema extracorporal provisto de enzimas inmovilizadas (Inada et al., 1975; Venter et al., 1975).

Además, puede mencionarse que se han realizado intentos para usar enzimas inmovilizadas para órganos artificiales, como una derivación lógica de la aplicación mencionada en el párrafo anterior.

1.2.5.4 Aplicaciones en la elaboración de alimentos

La leche, al igual que otros alimentos derivados de ella, posee un excelente valor nutricional. Sin embargo, contiene una considerable concentración de lactosa, por lo que debe eliminarse de estos productos antes de que los consuman niños o personas adultas deficientes en la enzima β -galactosidasa intestinal, responsable de su hidrólisis. La diálisis de la leche no resulta efectiva puesto que su poder calorífico se reduce a un tercio, y se pierden varias sustancias de bajo peso molecular. La administración oral de la enzima, no siempre ha sido satisfactoria, dando lugar a reacciones alérgicas en algunos casos. Para evitar los problemas arriba mencionados, se ha utilizado β -galactosidasa inmovilizada por diferentes procedimientos (Pastore y Morisi, 1976; Wierzbicki et al., 1973; Samejima y Kimura, 1974; Maeda, 1975) consiguiendo, así, la eliminación de la lactosa contenida en la leche, de manera continua.

En ocasiones, durante la elaboración de la leche se utiliza peróxido de hidrógeno para su esterilización, por lo que para eliminar el exceso de este reactivo se utiliza catalasa inmovilizada (Schreiner, 1966). Además, para prevenir la aparición de un sabor "oxidado" se ha utilizado tripsina inmovilizada (Shipe et al., 1972).

Como producto derivado de la leche, puede producirse queso mediante la enzima renina inmovilizada, evitándose, así, el problema planteado por la escasez de esta enzima (Green y Crutchfield, 1969). Además, se ha utilizado β -galactosidasa inmovilizada, para la hidrólisis de suero ácido obtenido en la fabricación de requesón, de

poco valor y difícil de vender, para la obtención de edulcorantes de uso en productos de dieta, los cuales poseen un gran valor por su elevado coste (Pitcher et al., 1976).

Se ha investigado el uso de enzimas inmovilizadas para la preelaboración de bebidas y licores, como amilasa para hidrolizar almidón durante la fabricación de cerveza, o enzimas proteolíticas para hidrolizar proteínas y polipéptidos. Si se almacena cerveza durante mucho tiempo, adquiere una cierta turbidez, que puede evitarse tratándola, de modo controlado, con papaína y polifenol oxidasa inmovilizadas. Además se evita el inconveniente del uso de las enzimas solubles, puesto que, la que permanece activa genera un exceso de proteolisis que también es indeseado.

También se han empleado enzimas inmovilizadas en procesos como eliminar el sabor amargo en el zumo de naranja empleando naringinasa inmovilizada, eliminar la glucosa de la albúmina de la clara del huevo mediante glucosa oxidasa y peroxidasa inmovilizadas (Leuschner, 1964), tratamiento de la crema de té mediante tanasa inmovilizada (Weetall y Detar, 1974b), purificación de azúcar, etc.

1.2.5.5 Cromatografía de afinidad

Es un proceso de purificación basado en la especificidad biológica de sustancias presentes en organismos vivos. Así, las interacciones altamente específicas entre una enzima y su sustrato, producto de reacción, inhibidor competitivo, coenzima o efector alostérico, entre un antígeno y su anticuerpo correspondiente, entre una hormona y un receptor proteínico, etc., pueden utilizarse para la separación y purificación de estas sustancias. Para ello, se selecciona como ligando una sustancia biológicamente relacionada con la sustancia a purificar, luego se inmoviliza y se usa como adsorbente para la cromatografía de afinidad. A continuación, la muestra que contiene la sustancia a purificar se pasa a través de una columna empaquetada con el adsorbente, y sólo la sustancia que tiene afinidad específica hacia el ligando inmovilizado será adsorbida sobre el soporte insoluble en agua y el resto pasarán libremente a través de la columna. Después de eliminar las impurezas con sucesivos lavados, se eluye de la columna la sustancia adsorbida, cambiando la fuerza iónica del medio, el pH, la temperatura o una combinación de ellos. Si la sustancia adsorbida es una enzima, su elución puede realizarse de un modo altamente específico, mediante una disolución de sustrato, producto de reacción, coenzima, efectores alostéricos o un inhibidor competitivo, dando lugar a un producto de elevada pureza.

También, cuando se utiliza como ligando una enzima inmovilizada mediante un método adecuado, la preparación que resulta puede utilizarse para el aislamiento de sustratos (Cuatrecasas y Anfinsen, 1971), inhibidores competitivos (Stewart y Doherty, 1971; Sundberg y Kristiansen, 1972), coenzimas, efectores alostéricos, o anticuerpos de la enzima (Omenn et al., 1970a; Omenn et al., 1970b).

Del mismo modo, y a la inversa de lo indicado en el párrafo inmediatamente anterior, para la adsorción de enzimas será necesario un soporte adecuado que contenga alguna de las sustancias nombradas por las cuales muestra una elevada especificidad, como un sustrato o producto de reacción (Starkenstein, 1910; Poonian et al., 1971; Tosa et al., 1974; Uren, 1971), coenzima (Lowe y Dean, 1971; Chibata et al., 1974; Collier y Kohlhaw, 1971) efectores alostéricos (Sprossler y Lingens, 1970), un inhibidor competitivo (Feinstein, 1970) o un anticuerpo (Weetall, 1970b).

1.2.5.6 Tratamiento de aguas residuales

Varios compuestos aromáticos como fenoles y aminas aromáticas, están presentes en las aguas residuales de muchas industrias como conversión de carbón, refinerías de petróleo, química orgánica y colorantes, o bien pueden estar presentes en aguas que posteriormente pueden ir destinadas al consumo humano. La mayoría de estos compuestos son tóxicos y en algunos casos se sospecha o sabe que son cancerígenos. Por ello la eliminación de estas sustancias químicas resulta de gran importancia.

Hasta la fecha, diferentes procedimientos químicos tradicionales se han venido utilizando con éxito para este fin. Pero con la intención de abaratar el costo de los procesos, diferentes estudios se han realizado para la aplicación de un método enzimático a nivel industrial, fácil de realizar y más barato (Klibanov et al., 1983; Buchanan et al., 1998). Varias son las enzimas que con este propósito se han venido investigando principalmente. Una de ellas es HRPc (Tatsumi et al., 1996) que cataliza la oxidación de fenol con H_2O_2 para generar radicales fenoxi que salen del centro activo de la enzima, y en la disolución reaccionan no enzimáticamente para formar oligómeros y polímeros de superior peso molecular y menos solubles en la disolución acuosa de trabajo. Si los productos de reacción formados precipitan en la disolución, podrán ser eliminados por sedimentación o filtración.

Este procedimiento, tiene la ventaja que HRPc cataliza la eliminación de gran variedad de compuestos aromáticos en un amplio rango de temperatura, pH y salinidad,

lo cual es de gran importancia para el diseño de procesos a escala industrial (Buchanan et al., 1998). Sin embargo, la utilización de esta enzima presenta el inconveniente que H_2O_2 , es un reactivo caro, y que inactiva a la propia enzima. Además, la enzima se inactiva también por interacción con los radicales libres formados y, por atrapamiento y coprecipitación con los productos de reacción.

También se ha empleado tirosinasa (Wada et al., 1993) para la eliminación de los compuestos aromáticos arriba citados y presentes en los efluentes de las industrias. Esta enzima utiliza O_2 molecular como agente oxidante, pero sin embargo se inactiva por reacción con las *o*-benzoquinonas formadas durante el proceso de oxidación que catalizan.

Para mejorar la eficacia del proceso catalizado por estas enzimas, se han empleado diferentes polímeros como agentes coagulantes. Así, polímeros sintéticos como polietilénimina o naturales como quitina o quitosano se han utilizado para la eliminación de los polifenoles formados en las reacciones que catalizan estas enzimas. Quitosano, además de coagulante actúa también como adsorbente y se ha observado que aumenta la velocidad de reducción de los fenoles presentes en aguas residuales (Wada et al., 1993).

Estos coagulantes no retiran ni fenoles ni aminas aromáticas del medio de reacción, pero sí a los productos de reacción coloreados formados y que no precipitan de la disolución (Wada et al., 1995).

También se han añadido diferentes aditivos protectores al medio de reacción como polietilenglicol principalmente (Buchanan et al., 1998; Nakayama, 1992; Wu et al., 1998) y gelatina (Nakamoto y Machida, 1992). Estos aditivos interaccionan con los productos de reacción formados y previenen la adsorción de la enzima en ellos.

En el caso de contaminación provocada por la presencia de diferentes clorofenoles, se ha observado que la utilización de co-sustratos puede mejorar la eficiencia del método de descontaminación enzimático utilizado (Roper et al., 1995).

Una contaminación adicional que es introducida por el propio esquema de reacción y de la que poca discusión puede ser encontrada en las hemerotecas, es la provocada por la propia enzima, que cuando se utiliza soluble permanecerá en la disolución una vez terminado el proceso (Wada et al., 1993; Tatsumi et al., 1996).

1.2.5.7 Células de combustible y baterías bioquímicas

La principal reacción por la que los organismos vivos obtienen energía para el mantenimiento de la vida, es la oxidación de sustancias ricas en electrones (nutrientes) a sustancias pobres en electrones (metabolitos). Si puede usarse parte del sistema de transporte de electrones para una reacción de electrodo, y la energía química puede convertirse a energía eléctrica, la fabricación de células de combustible o baterías bioquímicas puede ser una realidad. Células de este tipo ya han sido diseñadas empleando papaína inmovilizada (Blumenthal et al., 1967), glucosa oxidasa inmovilizada (Wingard et al., 1971), etc.

Las enzimas inmovilizadas son relativamente estables durante la conversión de energía química a energía eléctrica, y son fáciles de manejar, por lo que ofrecen grandes posibilidades como una nueva forma de conversión de energía.

1.2.5.8 Otras aplicaciones

Entre otras aplicaciones de enzimas inmovilizadas podemos mencionar la esterilización en frío de diferentes bacterias por la acción de peroxidasa inmovilizada (Henry et al., 1974), su utilización en sistemas anticontaminantes como la esterilización del aire y aguas, etc.

1.3 OBJETIVOS

En relación a los antecedentes y al estado actual del tema, sobre los métodos de inmovilización y la utilización de los inmovilizados obtenidos en diferentes aplicaciones, resulta de especial interés el desarrollo de nuevos soportes para la inmovilización de enzimas, células y biomoléculas, así como de otros catalizadores y/o reactivos implicados en reacciones de gran interés para la industria en general, siendo especialmente crítico el poder controlar las características químico-físicas del soporte diseñado para adaptarlas a las necesidades del proceso en el cual van a estar implicados, sobre todo cuando serán inmovilizadas moléculas biológicamente activas y/o células. Estos estudios se realizaron utilizando como modelo, una enzima de estructura relativamente poco compleja como la peroxidasa de la raíz de rábano picante, y una enzima de estructura cuaternaria muy compleja como la presentada por la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*. En concreto, los objetivos generales que persigue la presente Memoria se relacionan a continuación:

1. Síntesis de nuevos soportes poliméricos a partir de derivados cinamoilados de mono, oligo y polisacáricos, así como de otros polialcoholes como monómeros fotoentrecruzables.
2. Caracterización de los sólidos preparados mediante técnicas espectroscópicas y otros métodos habituales de análisis de compuestos orgánicos (DSC, análisis elemental, etc.).
3. Estudio comparativo de los soportes sintetizados y elección de aquellos que reúnan las características más adecuadas para el desarrollo de los fines propuestos en esta Memoria.
4. Utilización de aquellos sólidos seleccionados para la inmovilización de diferentes enzimas. Optimización de las condiciones más adecuadas para su inmovilización y posterior utilización y almacenado.
5. Determinación de los parámetros necesarios para caracterizar y cuantificar la extensión y condiciones en que la enzima ha sido inmovilizada (medidas de actividad enzimática inicial, constantes de inactivación frente a diferentes agentes inactivadores y/o desactivadores, constantes cinéticas, etc.).
6. Utilización de nuestros inmovilizados en procesos industriales de relevante interés económico, medioambiental y social en general.

Capítulo 2

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El objeto del presente trabajo es el desarrollo de nuevos soportes para la inmovilización de enzimas. Los compuestos elegidos a estudiar fueron los derivados total y parcialmente cinamoilados de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En la obtención de los soportes, se prepararon los derivados con diferentes grados de esterificación de los monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos de partida con cloruro de trans-cinamoilo hasta obtener un producto final con el grado de cinamoilación deseado. Se obtuvieron derivados con distintos porcentajes de cinamoilación para realizar sobre ellos el estudio del efecto de dicho grado de cinamoilación de los sólidos de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida.

Como ensayos previos se realizaron experimentos con diferentes procedimientos para la inmovilización de las enzimas sobre los sólidos previamente sintetizados. Procedimientos conducentes a la inmovilización de las enzimas, ya sea por adsorción, atrapamiento o enlace covalente sobre el soporte de inmovilización. Los soportes sólidos se ensayaron solos o previamente depositados sobre una matriz inerte antes seleccionada. En este segundo caso, fueron varias las matrices inertes elegidas a probar para encontrar aquella que proporcionaba las mejores condiciones para la inmovilización, así como los mejores resultados finales. Estas matrices fueron diferentes en cuanto a su composición química y forma de presentación.

Dependiendo del modo en que el sólido de inmovilización fue utilizado, se ensayaron diferentes formas y condiciones de inmovilización hasta encontrar aquellas que permitieron obtener los mejores resultados. Así, se diseñaron dispositivos que facilitaron la manipulación del sólido de inmovilización, o de las matrices inertes sobre las que fueron previamente depositados durante todas las fases del estudio realizado.

Se ensayaron los diferentes factores que pueden afectar a la inmovilización tales como concentración de sólido de inmovilización, número de capas de éste, pH de inmovilización, temperatura de inmovilización, concentración de enzima y tiempo de inmovilización. Además, y dependiendo del tipo de enlace que se quiso poner de manifiesto, se estudiaron diferentes métodos, condiciones y composición del medio de lavado del sólido con la enzima inmovilizada hasta encontrar aquél que garantizó un

eficaz lavado de éste. La eficacia del lavado estudiado fue seguida mediante el ensayo de la actividad enzimática presente en diferentes fracciones intermedias del lavado que fueron tomadas a unos tiempos predeterminados.

Una vez optimizado el método de inmovilización así como del lavado de la enzima débilmente enlazada, se realizaron diferentes ensayos para poner de manifiesto la estabilidad de la enzima inmovilizada frente a diferentes factores, y calcular algunos de sus parámetros cinéticos más representativos. Así, se estudió el efecto de la temperatura, altas concentraciones de H_2O_2 , pH y almacenado, y se calculó los valores de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Esto permitió diferenciar unos soportes de otros, profundizándose, a continuación, en el estudio del efecto de estos factores para las enzimas inmovilizadas sobre aquellos sólidos de inmovilización que ofrecieron mejores resultados. Se realizaron ensayos paralelos con enzima soluble para comparar los resultados obtenidos para la enzima inmovilizada con los correspondientes para la enzima soluble.

Las enzimas que fueron utilizadas para el presente trabajo fueron la peroxidasa de la raíz de rábano picante (HRPc; EC.1.11.1.7) y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* (EC.3.2.1.23). Dependiendo del modo en que se inmovilizó la enzima en estudio sobre el sólido de inmovilización, se diseñaron diferentes métodos para poner de manifiesto la actividad enzimática retenida. Así, se realizaron ensayos de punto final durante un tiempo adecuado que pudo asegurar la linealidad de los resultados obtenidos, así como ensayos en continuo en los que una disolución de sustrato, en las condiciones previamente establecidas, se hizo recircular mediante una bomba peristáltica a través del lecho donde se encontraba el sólido con la enzima inmovilizada.

2.2 SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN

2.2.1 Productos de partida

D(-)-arabinosa, D(-)-fructosa e inulina para fines bioquímicos, así como D-(+)-maltosa (monohidrato) cristalina, D(-)-manitol, Tritón X-110 y etilmetilcetona fueron suministrados por Merck (Alemania). Glucosa anhidra, carbonato de plomo, acetato de cobre(II), sulfato magnésico ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) químicamente puros, y una disolución acuosa al 90% de fenol fueron obtenidos de Probus S.A. (España). Fluka (España) suministró los siguientes reactivos: dextrina para fines bacteriológicos, D(-)-sorbitol cristalizado, Amberlita IR-120, alcohol polivinílico 72000, ácido D-glucurónico, metil- α -D-manopiranosido, $NaBH_4$, o-nitrofenol puro (ONF) y Tritón X-114. Dextrano T40 fue de

Pharmacia (Suecia) y sacarosa para análisis, piridina, sulfato sódico anhidro, ácido acético gálico, hexano, ácido sulfúrico (96%), acetona, glicerina, NaOH, NaCl, dioxano-1,4 purísimos y ácido clorhídrico (35%) fueron de Panreac Química, S.A. (España). Etanol absoluto y dimetilformamida (DMF) del grado reactivo fueron suministrados por J.T. Baker (Holanda), mientras que el cloruro de *trans*-cinamoilo, H_3BO_3 del grado reactivo, SDS (dodecil sulfato sódico), quitosano (mínimo un 85% deacetilado), *p*-hidroxibenzaldehído, ferricianuro potásico y 4-aminoantipirina fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (España). Cloroformo y metanol para HPLC fueron suministrados por LAB-SCAN Ltd. (Irlanda). Ácido D-gulónico- γ -lactona y 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa se obtuvieron de Aldrich Chemical Company Inc. (España). Los cartuchos de extracción de papel Whatman (de una sola capa y de tamaño 18 x 55 mm) y el papel Whatman n°1 fueron suministrados por Whatman Laboratory Division (Gran Bretaña). Finalmente, 2-mercaptoetanol (98%) y $NaBH_3CN$ fueron suministrados por Janssen Chimica (Bélgica), mientras que Farmitalia Carlo Erba (Italia) suministró N-metil-2-pirrolidona.

Para la preparación de las disoluciones tampón se empleó monohidrógeno fosfato potásico y dihidrógeno fosfato potásico de grado reactivo analítico, suministrados por PROBUS (España), y también di-sodio hidrógeno fosfato 12-hidrato y ácido cítrico 1-hidrato purísimos de Panreac Química, S.A (España).

Para determinar la actividad enzimática de HRPc se emplearon como sustratos la sal diamónica del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazol-6-sulfónico)) y H_2O_2 (33%, p/v). El primero de ellos fue suministrado por Sigma Chemical Co. (España) mientras que Scharlau (España) suministró el segundo. Como sustrato de la β -galactosidasa se utilizó el ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) el cual fue suministrado por Sigma Chemical Co. (España).

En esta Memoria se ha utilizado agua purificada de tipo I (18 M Ω x cm) mediante bidestilación y posterior desionización con un sistema Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA).

Se utilizaron jeringuillas de polipropileno de la marca Terumo (10 y 20 mL), filtros de acetato de 0,22 mm, bolas de vidrio de diferente diámetro, anillos Raschig, cubreobjetos de 2,25 cm² de superficie, plásticos de acetato de celulosa recortados con diferentes formas y tamaños según era requerido, perlas de PVC, de polipropileno y de polietileno con diferente grado de dureza.

2.2.1.1 Derivados de Hidratos de Carbono

Preparación de D-arabino-2-hexosulosa (D-glucosona)

12 g de acetato de cobre(II) y 7,21 g de D-fructosa se disolvieron en 120 mL de metanol-ácido acético-agua (12:1:2). Este medio de reacción se calentó hasta que alcanzó el reflujo, que fue mantenido durante un tiempo de dos horas. Transcurrido este tiempo, se filtró el medio de reacción para eliminar el óxido de cobre(II) formado. Posteriormente, la disolución se pasó a través de una columna de Amberlita IR-120 con el fin de fijar el Cu^+ y Cu^{2+} que hubiesen podido quedar libres en la disolución. La disolución resultante se colocó en un matraz y se eliminó el disolvente calentando en un rotavapor. Como resultado se obtuvieron 6,77 g de D-glucosona que se empleó como producto de partida en la obtención del cinamato de la misma.

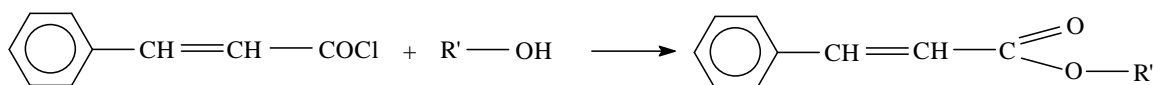
Preparación de etil- α -D-glucopiranosido

En un matraz de 250mL se colocaron 15 g de D-glucosa anhidra, 160 mL de etanol absoluto y unas gotas de ácido sulfúrico hasta que el pH se ajustó entre 3 y 4. El matraz se colocó dentro de un baño con agua y se calentó hasta alcanzar el reflujo, manteniéndose así durante dos horas más. Acabada la reacción se dejó enfriar y se neutralizó el medio con carbonato de plomo. Tras neutralizar, se filtró el medio de reacción y a la disolución final obtenida se le eliminó el disolvente llevando a sequedad el contenido del matraz en un rotavapor. Finalmente, el sólido resultante fue disuelto en metanol y vuelto a llevar a sequedad en el rotavapor. El producto final obtenido se empleó para su posterior cinamoilación.

2.2.2 Preparación de cinamatos

2.2.2.1 De Hidratos de Carbono

La preparación se realizó modificando el método propuesto por Van Cleve (Moliner, 1986). El esquema de reacción es el siguiente:



Se disolvieron 0,02 moles del hidrato de carbono en 100 mL de piridina, con las siguientes excepciones en las que se substituyó el disolvente piridina por cada uno de los indicados:

Cinamato de:	Piridina:DMF
Dextrina	2:1
Dextrano	1:2
D-arabinosa	2:1
D-glucosa	1:1
Etil-α-D-glucopiranososa	2:1

La mezcla se calentó a 60°C durante una hora hasta su completa disolución. A la disolución, una vez enfriada hasta temperatura ambiente, se le agregó una cantidad de cloruro de cinamoilo correspondiente a multiplicar la cantidad equimolar necesaria por el número de grupos hidroxilo a cinamoilar en el hidrato de carbono, más un exceso del 20% para asegurar la completa cinamoilación. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se vertió la mezcla producto de la reacción sobre agua fría fuertemente agitada. Al decantar y filtrar esta mezcla, se obtuvo un precipitado que se disolvió en cloroformo. La purificación se llevó a cabo adicionando gota a gota la disolución del cinamato en cloroformo sobre hexano fuertemente agitado. El sólido obtenido tras ser rediseuelto y reprecipitado se desecó sobre P₂O₅ a presión reducida.

2.2.2.2 De Alcohol Polivinílico

En este caso se tomaron 0,045 moles de alcohol polivinílico y se disolvieron en 100 mL de N-metil-2-pirrolidona. Se calentó la mezcla hasta 80°C para lograr la disolución total del polialcohol. Una vez fría y termostalizada la mezcla a 25°C se añadieron 0,078 moles de cloruro de cinamoilo y 6,36 mL de piridina. La reacción se realizó termostalizada a 25°C en ambiente inerte de N₂ y durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se vertió la mezcla de reacción sobre agua acidulada fuertemente agitada. Aparece un precipitado que disuelto en etilmetilcetona, se precipitó de nuevo sobre agua. El sólido obtenido se secó en una estufa de presión reducida a 30°C y posteriormente se conservó en un desecador de P₂O₅ a presión reducida.

2.2.2.3 De *p*-Hidroxibenzaldehído

El método de preparación de este cinamato es similar al indicado en el apartado 2.2.2.1 para la síntesis de los derivados totalmente cinamoilados de hidratos de carbono. En este caso, como sólo hay un hidroxilo libre que cinamoilar, la cantidad de cloruro de cinamoilo que se añadió fue la equimolar con respecto a la cantidad de *p*-hidroxibenzaldehído utilizada, además del exceso arriba citado, que también se mantuvo.

2.2.3 Hidrólisis de derivados

2.2.3.1 De 2,3,4,6-Tetracinamoil-D-glucopiranososa

Este soporte se preparó por hidrólisis en medio ácido del derivado totalmente cinamoilado del etil-D-glucopiranosido. Para ello, a las jeringuillas que contenían las bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización se les añadió una disolución 0,1 M de tampón fosfato sódico (pH 3,0) o potásico (pH 5,0), y se mantuvo así durante 30 minutos. Tras este período se retiró el medio de hidrólisis y se volvió a añadir nueva disolución 0,1 M de tampón fosfato sódico (pH 3,0) o potásico (pH 5,0), permaneciendo así durante otros 30 minutos más. A continuación, se retiró el medio de hidrólisis último y las jeringuillas con sus inmovilizados fueron lavadas a fondo con abundante agua destilada. Por último, las bolas de vidrio se enjuagaron con tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante aproximadamente 10 minutos, para ajustar el pH al que posteriormente se empleará en la inmovilización. Finalmente, las jeringuillas con sus inmovilizados fueron secadas por succión a presión reducida.

2.2.3.2 De 3,5,6-Tricinamoil-D-glucofuranosa

Este soporte se preparó por hidrólisis en medio ácido del cinamato de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa. El procedimiento es similar al redactado en el punto anterior para la preparación de 2,3,4,6-tetracinamoil-D-glucopiranososa.

2.3 APLICACIÓN DE LOS SOPORTES

Independientemente del método de inmovilización empleado, el sólido de inmovilización fue usado ya sea directamente o bien depositado sobre diferentes matrices inertes.

2.3.1 Desengrasado de las matrices inertes

Como matrices inertes sobre las que posteriormente se depositó el sólido de inmovilización deseado se emplearon: bolas de vidrio con diferente diámetro, cubre-objetos con una superficie de 2,25 cm², anillos Raschig y papel de acetato recortado convenientemente. Para garantizar una efectiva utilización, todas estas matrices fueron desengrasadas con una disolución acuosa de NaOH (5%) y etanol absoluto. También se emplearon perlas de PVC, de polipropileno y de polietileno con diferente grado de dureza y que fueron previamente desengrasadas con cloroformo.

2.3.1.1 Bolas de vidrio

Cuando en los ensayos de inmovilización se utilizaron bolas de vidrio, éstas tuvieron, principalmente, un diámetro de 3 mm.

Previo a la utilización de las bolas de vidrio, éstas fueron desengrasadas mediante una disolución acuosa de NaOH (5%) durante un tiempo aproximado de 30 minutos. Posteriormente, fueron colocadas en un quitasatos y lavadas a fondo con abundante agua del grifo. A continuación, las bolas de vidrio se colocaron en un embudo de placa fritada y se enjuagaron con 1 L de agua destilada, tras lo cual, los restos de agua destilada se eliminaron por succión mediante conexión a la línea de presión reducida. En este momento se añadió un poco de etanol para enjuagar las bolas de vidrio. Por último, se colocaron en un cristizador de vidrio y se añadió etanol hasta cubrir las por completo. Se mantuvieron así durante otros 30 minutos, tras los cuales, se volvieron a depositar sobre el embudo de placa fritada, para eliminar el etanol. Los restos de este último fueron eliminados por conexión al sistema de presión reducida. Las bolas de vidrio, casi secas, fueron depositadas, de nuevo en el cristizador de vidrio que se situó bajo una lámpara de infrarrojos hasta secarlas por completo. Para este fin, se dispuso de una lámpara de luz infrarroja de 220-230V y 250W situada a una altura entre 80 y 100 cm de las muestras a secar.

Si las bolas de vidrio ya habían sido utilizadas en ensayos de inmovilización, antes de ser desengrasadas, eran lavadas a fondo con cloroformo para eliminar la capa de polímero depositada sobre ellas, lo cual se corroboró comprobando la no aparición de la banda a 280 nm en el espectro de ultravioleta, característica de los ésteres del ácido cinámico, en posteriores volúmenes de cloroformo de lavado.

2.3.2 Inmovilización de HRPc

Para la inmovilización de HRPc se empleó sólido de inmovilización convenientemente pulverizado, al igual que se hizo para la inmovilización de β -galactosidasa, o bien depositado previamente sobre diferentes matrices sólidas inertes. Debido a la poca actividad enzimática mostrada por las preparaciones de β -galactosidasa, sólo se pudo utilizar matrices inertes para la inmovilización de HRPc. Las matrices inertes sobre las que posteriormente se depositó el sólido de inmovilización fueron las indicadas anteriormente en el punto 2.3.1.

2.3.2.1 Preparación de películas sobre soportes inertes

Por precipitación

Para la deposición de la capa de sólido de inmovilización, una cantidad fijada de la matriz seleccionada se sumergió en una disolución clorofórmica de sólido de inmovilización de concentración deseada. La matriz se separó de la disolución clorofórmica y rápidamente se sumergió en hexano para producir la precipitación del soluto de la disolución cloroformica retenida sobre la superficie de la matriz (sólido de inmovilización). Finalmente, la matriz con el depósito superficial de soporte se separó del hexano y se dejó secar hasta la total eliminación de éste.

Por evaporación del disolvente

Al igual que en el caso anterior, la matriz seleccionada se introdujo en una disolución clorofórmica de sólido de inmovilización de concentración deseada. La matriz se sacó de la disolución clorofórmica y se dejó evaporar lentamente el disolvente de la disolución cloroformica retenida sobre la superficie de la matriz, para conseguir que la extensión obtenida fuera lo más uniforme posible. Cuando las preparaciones quedaron completamente secas estuvieron listas para ser utilizadas.

Cuando se emplearon bolas de vidrio de 3 mm de diámetro como matriz inerte, el procedimiento estándar seguido fue el que a continuación se especifica: Para los ensayos se utilizaron jeringuillas de polipropileno de 10 mL (ó 20 mL) de volumen en cuya parte inferior se colocó una rejilla de fibra de vidrio para evitar que se obture al introducir las bolas de vidrio. En cada jeringuilla se introdujeron 15 g (ó 30 g) de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Se preparó una disolución clorofórmica con 0,3 g de sólido de inmovilización (o cantidades variables de éste cuando su efecto quiso ser estudiado) y 20 mL de cloroformo. Por lo tanto, la concentración de sólido era de 15 g/L (o la que resultó

de disolver la masa de sólido de inmovilización elegida). Se añadió la disolución clorofórmica hasta cubrir las bolas de vidrio sin cerrar la salida inferior de la jeringuilla para que la disolución clorofórmica salga al mismo tiempo. Se dejó secar durante aproximadamente 15 minutos, tras los cuales se succionó ligeramente con succión a presión reducida para eliminar los restos de la disolución aún no secos. Se dejó secar otros 15 minutos y se repitió este proceso durante dos veces más.

2.3.2.2 Irradiación de las muestras preparadas

Una vez que la película de pre-polímero de inmovilización estuvo depositada y seca sobre la matriz inerte correspondiente, se colocaron en una placa de Petri, y se procedió a su entrecruzamiento mediante la irradiación (15 minutos) con una lámpara de vapor de mercurio Osram HOL-125W, desprovista de su envoltura exterior de cristal, al objeto de obtener una máxima intensidad en la región ultravioleta, que es la de máxima sensibilidad de los productos obtenidos. De esta manera se obtuvieron los polímeros finales utilizados para la inmovilización enzimática. La lámpara estaba situada a aproximadamente 17-18 cm de la película a irradiar, lo que equivalía a una intensidad de iluminación de 2500 lux. Con objeto de obtener resultados comparables, todos los ensayos se realizaron bajo la misma intensidad de iluminación. Todo este proceso de deposición de la capa de sólido arriba descrito y posterior irradiación de la película formada, se repitió tantas veces como número de capas se quiso depositar sobre las matrices inertes. Tras la irradiación, las muestras ya preparadas se colocaron convenientemente en el lugar donde posteriormente se realizó la inmovilización. En el caso en que bolas de vidrio de 3 mm de diámetro fueron empleadas, se colocaron en jeringuillas nuevas con un trozo de rejilla de fibra de vidrio en su parte inferior.

Normalmente, y a no ser que se especifique lo contrario, se entenderá que los ensayos se realizaron con 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro sobre las que se depositó una sola capa de sólido de inmovilización a partir de una disolución clorofórmica de concentración 15 g/L, y fueron ensayadas en una jeringuillas de polipropileno de 10 mL de volumen.

2.3.3 Inmovilización de β -galactosidasa

Para la inmovilización de la β -galactosidasa se utilizó directamente el soporte previamente purificado en forma de polvo fino. Para su preparación, una cantidad arbitraria de sólido de inmovilización se disolvió en cloroformo o dioxano-1,4. Esta disolución en medio orgánico se extendió sobre placas de vidrio previamente

desengrasadas con una disolución acuosa de NaOH (5%) para asegurar la uniformidad y transparencia de las extensiones realizadas. Cuando se consiguió la total eliminación del disolvente, las placas de vidrio se irradiaron con luz ultravioleta durante 15 minutos, estando la lámpara situada a aproximadamente 17-18 cm de la película a irradiar, lo que equivalía a una intensidad de iluminación de 2500 lux. Así se aseguró el completo entrecruzamiento del monómero utilizado. Una vez entrecruzado, el polímero obtenido se rascó mediante un cúter de las placas de vidrio y se redisolvió nuevamente en cloroformo. Finalmente, la disolución clorofórmica obtenida se hizo precipitar gota a gota sobre hexano fuertemente agitado y el precipitado formado se recogió por filtración en papel y se dejó secar. Esto último sirvió como un paso adicional de purificación del sólido final, para eliminar los restos de ácido cinámico que aún pudieran persistir en los sólidos de partida, antes de su fotoentrecruzamiento.

2.4 CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN

Las enzimas utilizadas para este trabajo fueron la peroxidasa de la raíz del rábano picante (HRPc; EC.1.11.1.7; tipo VI) suministrada por Sigma Chemical Co. (España), como un polvo liofilizado, y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* (EC.3.2.1.23; Lactozym 3000L, tipo HP-G) de Novo Nordisk A/S (Dinamarca), suministrada como una preparación enzimática líquida.

Dependiendo de si el sólido de inmovilización fue empleado directamente, o bien, depositado sobre una matriz inerte, el procedimiento de inmovilización fue diferente, independientemente del método de inmovilización empleado.

2.4.1 Inmovilización de HRPc

2.4.1.1 Sólido de inmovilización convenientemente pulverizado

En este caso el método de inmovilización que se empleó fue como el indicado en el apartado 2.4.2.1 para la β -galactosidasa. Aquí, la concentración de enzima en el medio de inmovilización fue de 17,1 $\mu\text{g/mL}$.

2.4.1.2 Utilización de matrices inertes

Bolas de vidrio

Cuando se quiso establecer un método estándar para la realización del proceso de inmovilización, previo a los estudios que se deseó desarrollar, se emplearon bolas de

vidrio de 3 mm de diámetro. Se preparó una disolución acuosa inicial de HRPc (1 mg/mL) que se usó para los ensayos posteriores y se almacenó a -20°C cuando no era utilizada. Esta disolución inicial fue diluida hasta la concentración deseada. A cada jeringuilla se le añadió 5 mL de tampón de inmovilización y 0,1 mL de la disolución enzimática última preparada. Las jeringuillas con sus inmovilizados se colocaron en el frigorífico a una temperatura que osciló entre 0 y 4°C , y se dejaron inmovilizar durante un tiempo previamente fijado.

En los ensayos iniciales se emplearon bolas de vidrio de 1 y 3 mm de diámetro. En este caso, 10 g de bolas de vidrio del diámetro seleccionado fueron colocados en un vial de 20 mL convenientemente preparado para la realización de las operaciones que deseamos hacer. Aquí, la deposición de la película de sólido de inmovilización sobre las bolas de vidrio utilizadas fue por precipitación. Las bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización, fueron colocadas en otro vial de 20 mL. A cada vial se le añadió 10 mL del tampón de inmovilización y 0,2 mL de la disolución inicial de enzima. El vial o viales preparados, fueron colocados en el frigorífico a una temperatura que osciló entre 0 y 4°C , y la inmovilización se dejó que tuviera lugar durante el tiempo establecido.

Anillos Raschig

El procedimiento empleado para la preparación de los anillos recubiertos con el sólido de inmovilización, y desarrollo del proceso de inmovilización, es similar, en todo, a lo descrito en el apartado anterior, durante la realización de los ensayos iniciales con bolas de vidrio.

Matrices planas

Las matrices planas utilizadas fueron cubreobjetos de $2,25\text{ cm}^2$ de superficie y plásticos de acetato de celulosa recortados con diferentes formas y tamaños según fue requerido. En este caso la deposición de la película de sólido de inmovilización fue por precipitación, por inmersión de las superficies empleadas primero en la disolución clorofórmica del sólido de inmovilización e inmediatamente después en hexano. El proceso de inmovilización seguido es como se ha descrito durante la realización de los ensayos iniciales con bolas de vidrio. En este caso, también las matrices planas fueron colocadas en un vial de vidrio convenientemente preparado para los ensayos que fueron necesarios realizar.

Plásticos

Cuando se empleó como matriz inerte perlas de PVC, de polipropileno o de polietileno, se introdujeron éstas en una jeringuilla de 10 mL hasta ocupar un volumen igual al ocupado en el punto anterior por las bolas de vidrio. Esto supuso la utilización de 8 g de perlas de PVC, 5,5 g de perlas de polietileno duro, 5,7 g de polietileno blando y 6 g de polipropileno. El proceso de inmovilización seguido es como se ha descrito en el apartado de arriba para el caso de bolas de vidrio.

2.4.2 Inmovilización de β -galactosidasa

Lactozym 3000L, tipo HP-G, tiene una actividad de 1638,16 U/mL, medida sobre una disolución 5 mM de ONPG en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en $MgSO_4$, a 25°C y a 420 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol/min de ONF en las condiciones de ensayo arriba mencionadas. En tales condiciones el coeficiente de extinción molar para ONF resultó ser de $\epsilon = 2465 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.4.2.1 Sólido de inmovilización convenientemente pulverizado

Para la inmovilización de β -galactosidasa, en un vaso de 100 mL se añadió la masa de sólido de inmovilización junto con 30 mL de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1). Para asegurar una buena mezcla del medio de inmovilización, previo a la adición de la enzima, se agitó durante una hora con un agitador magnético. Cuando el sólido se observó convenientemente disperso por todo el medio de inmovilización se añadió la enzima hasta que tuvo la concentración deseada en el medio de inmovilización. La enzima se dejó inmovilizar durante el tiempo fijado a una temperatura entre 0 y 4°C. Tras el proceso de inmovilización, el medio de reacción fue filtrado a través de un filtro de papel Whatman nº 1, y el sólido recogido lavado a fondo hasta eliminar la enzima débilmente retenida. A partir del apartado 5.1.3.2 en que se encontró la conveniencia de usar glicerina para la inmovilización, se añadió 31 g de ésta en el medio de inmovilización para facilitar la humectación del sólido de inmovilización por el tampón y asegurar, posteriormente, un acceso efectivo de la enzima al soporte de inmovilización.

2.4.2.2 Bolas de vidrio

Cuando bolas de vidrio de 3 mm de diámetro fueron empleadas, la preparación de éstas con el sólido de inmovilización fue realizada por evaporación del disolvente y posterior irradiación. El medio de inmovilización es preparado con 30 mL de tampón

fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1), 31 g de glicerina y 0,5 mL del preparado comercial de β -galactosidasa. Este medio de inmovilización fue añadido a cada una de las jeringuillas, que se colocaron en el frigorífico a una temperatura que osciló entre 0 y 4°C, y se dejaron inmovilizar durante un tiempo previamente fijado.

2.5 PROCEDIMIENTOS DE LAVADO

2.5.1 HRPc

En los ensayos iniciales que fueron realizados, tras el proceso de inmovilización, el sólido de inmovilización, ya sea solo o depositado sobre las diferentes matrices inertes utilizadas, fue lavado a fondo para eliminar la enzima débilmente enlazada, utilizando para ello viales de vidrio de 20 mL convenientemente preparados para este fin. Todas las disoluciones de lavado estaban frías.

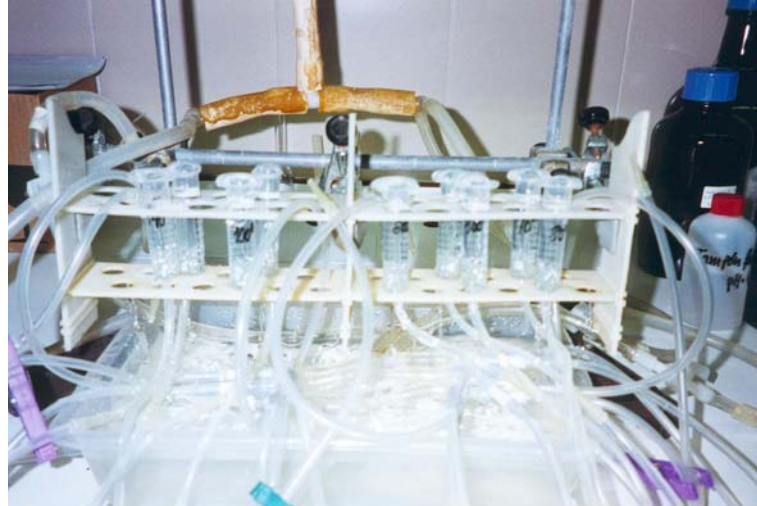
Lavado P1

- a. Agua destilada (15 minutos).
- b. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,25 M en NaCl (30 minutos).
- c. Agua destilada (30 minutos).
- d. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,25 M en NaCl (15 minutos).
- e. Agua destilada (30 minutos).
- f. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1).

Lavado P2

- a. Agua destilada (15 minutos).
- b. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,25 M en NaCl (15 minutos).
- c. Agua destilada (30 minutos).

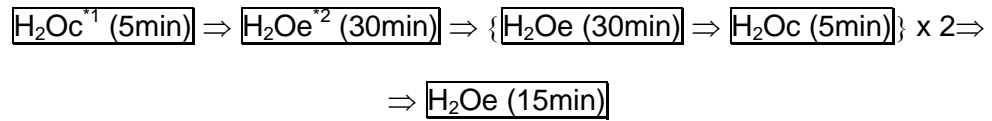
Para el lavado de las jeringuillas con las bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización se diseñó un dispositivo que permitió el lavado en contracorriente y en continuo de hasta 16 muestras a la vez. En distintos momentos del lavado se obtuvieron muestras intermedias para controlar la eficacia del lavado realizado. Este dispositivo se muestra en las Figuras 2.1 y 2.2.

**FIGURA 2.1**

Dispositivo de lavado con jeringuillas que contienen los soportes con la enzima inmovilizada, lavándose mediante un flujo ascendente de agua destilada a una temperatura entre 0 y 4°C.

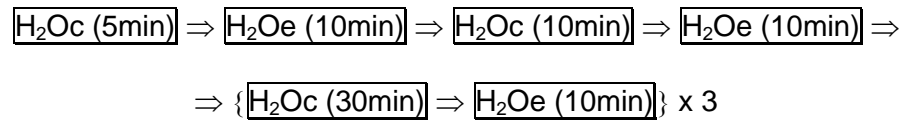
**FIGURA 2.2**

Vista superior del dispositivo de lavado, lleno de cubitos de hielo, para obtener la temperatura deseada.

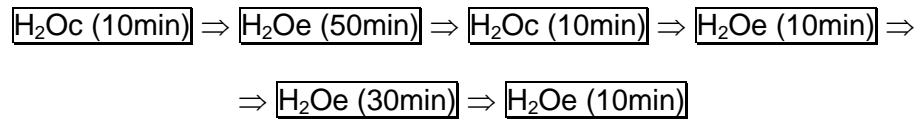
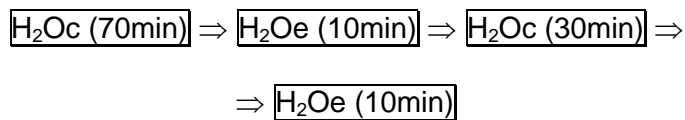
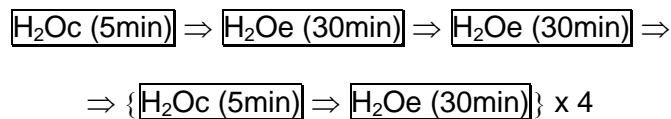
Lavado P3

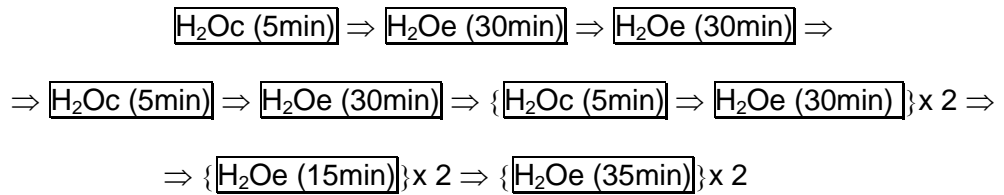
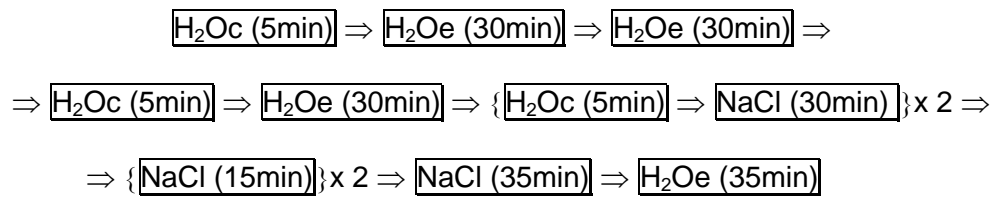
*1 Circulación de agua destilada entre 0 y 4°C en contracorriente.

*2 Almacenado con agua destilada entre 0 y 4°C.

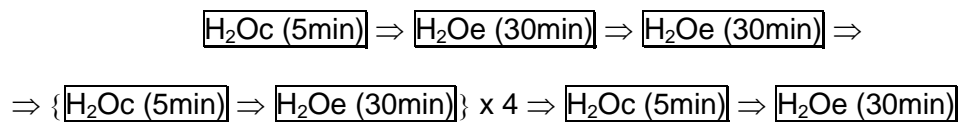
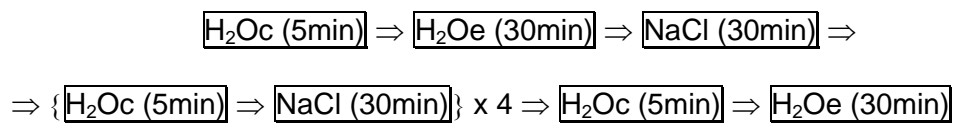
Lavado P4

Las fracciones intermedias de lavado fueron realizadas con 3 mL de agua bidestilada y desionizada.

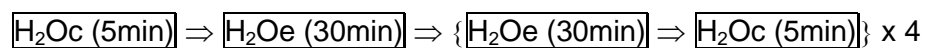
Lavado P5**Lavado P6****Lavado 1**

Lavado 2.A**Lavado 2.B**

En las fracciones intermedias de lavado en las que una disolución salina fue empleada, las sucesivas concentraciones de NaCl que se emplearon fueron 0,25; 0,5; 1; 1,5 y 2 M.

Lavado 3.A**Lavado 3.B**

En las fracciones intermedias de lavado en las que una disolución salina fue empleada, las sucesivas concentraciones de NaCl que se emplearon fueron 0,25; 0,5; 1; 1,5 y 2 M.

Lavado 3.C

Lavado 4.A

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2$$

Lavado 4.B

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow \text{Almacenado (60min)} \Rightarrow \\ \Rightarrow \text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (10min)}$$

Lavado 4.C

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow \{\text{Almacenado (60min)} \Rightarrow \\ \Rightarrow \text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (10min)}\} \times 2$$

Lavado 4.D

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow \{\text{Almacenado (60min)} \Rightarrow \\ \Rightarrow \text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (10min)}\} \times 2 \Rightarrow \{\text{Almacenado (22 h)} \Rightarrow \\ \Rightarrow \text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (10min)}\}$$

Los almacenados se realizaron con 5 mL de una disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1)

Lavado 5.A

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow \text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \\ \Rightarrow \text{Almacenado (60min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (10min)}$$

Lavado 5.B

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow \text{Almacenado (60min)} \Rightarrow \\ \Rightarrow \text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (10min)}$$

Lavado 5.C

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow \{\text{Almacenado (60min)}\} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (10min)}\} \times 2$$
Lavado 6.A

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow \{\text{H}_2\text{Oc (2min)}\} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \{\text{Almacenado (3x10min)}\} \Rightarrow \{\text{H}_2\text{Oc (5min)}\}$$
Lavado 6.B

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \{\text{Almacenado (3x10min)}\} \Rightarrow \{\text{H}_2\text{Oc (5min)}\}$$
Lavado 6.C

$$\{\text{H}_2\text{Oc (5min)} \Rightarrow \text{H}_2\text{Oe (30min)}\} \times 2 \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \{\text{Almacenado (10+25+10 min)}\} \Rightarrow \{\text{H}_2\text{Oc (5min)}\}$$

Las disoluciones de almacenado se realizan con 5 mL de una disolución acuosa al 1,5% del detergente estudiado. En todos los lavados realizados, las fracciones intermedias de lavado y de almacenado se guardaron en el frigorífico a una temperatura entre 0 y 4°C hasta que fueron medidas. Cuando se emplearon bolas de vidrio recubiertas de soporte de inmovilización en jeringuillas de polipropileno para la inmovilización de la enzima estudiada, tras finalizar el lavado y antes de medir la actividad enzimática inicial o del ensayo correspondiente, las bolas de vidrio fueron secadas mediante succión a vacío y cambiadas a jeringuillas nuevas diferentes a las utilizadas para la inmovilización. Esta precaución fue tomada a pesar de haber verificado experimentalmente que las jeringuillas no retienen actividad enzimática adsorbida.

2.5.2 β -galactosidasa

Lavado 1

- a. Agua bidestilada.
- b. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1).
- c. Vaso de 100 mL: Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1), 15 minutos con agitación magnética.
- d. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,6) y 0,1 M en NaCl.
- e. Vaso de 100 mL: Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,6) y 0,1 M en NaCl, 15 minutos con agitación magnética.
- f. Agua bidestilada.

Lavado 2

- a. Agua bidestilada.
- b. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,0) y 1 M en NaCl.
- c. Agua bidestilada.
- d. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1).

Lavado 3.a

- a. Agua destilada (15 minutos).
- b. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,0) y 0,25 M en NaCl (30 minutos).
- c. Agua destilada (30 minutos).
- d. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,0) y 0,25 M en NaCl (15 minutos).
- e. Agua destilada (30 minutos).
- f. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1).

Lavado 3.b

Igual que el lavado 3.a, pero la disolución salina tiene un pH de 7,1.

Lavado 3.b.1

- a. Agua destilada (15 minutos).
- b. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,25 M en NaCl (30 minutos).
- c. Agua destilada (30 minutos).

Lavado 4.a

- a. Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,0) y 0,25 M en NaCl (15 minutos).
- b. Agua destilada (45 minutos).

Lavado 4.b

Igual que el lavado 4.a, pero la disolución salina tiene un pH de 7,1.

A partir del apartado 5.1.3.1, los lavados fueron realizados estando el sólido con la enzima inmovilizada convenientemente colocado en un lecho de hielo. Además, todas las disoluciones de lavado empleadas estaban frías. Desde el apartado 5.1.3.2 se emplearon cartuchos de extracción de papel Whatman para filtrar la enzima tras su inmovilización sobre el soporte correspondiente. Este mismo cartucho fue donde se realizaron los lavados, medidas de actividad enzimática y almacenados del sólido con la enzima inmovilizada. De este modo se evitaron las pérdidas que se pudieran producir, en los diferentes pasos realizados, en ensayos hechos con anterioridad a este momento.

2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS**2.6.1 Análisis de soportes****2.6.1.1 Análisis elemental**

Los análisis elementales cuantitativos de C, H, N y O se realizaron en un analizador elemental CNHS-O Carlo ERBA EA-1108. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el software de trabajo EAGER 200.

2.6.1.2 Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros de ir. se realizaron en un aparato Nicolet Impact 400 en representaciones de 4000 a 500 cm^{-1} para los espectros en general. Los derivados cinamoilados obtenidos se prepararon como películas sobre pastillas de KBr. Para ello se emulsionó la pastilla con la disolución clorofórmica de cada uno de los derivados analizados, dejándose, a continuación, evaporar el disolvente hasta total desecación. Se ha podido comprobar que mediante esta técnica se han obtenido mejores resultados que con los métodos alternativos, tales como en disolución o incluidos en pastillas de KBr. Las frecuencias de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1} .

2.6.1.3 Espectroscopía Visible-UV

Los espectros ultravioleta-visible se realizaron en un espectrofotómetro UV/Visible UNICAM 8625. Los análisis y medidas se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo o vidrio.

Cuando fueron preparados derivados con diferente grado de cinamoilación, éste fue determinado a partir del valor de la absorbancia medido a 280 nm para una disolución clorofórmica de concentración conocida de los derivados preparados.

2.6.1.4 Espectroscopía de r.m.n.

Los espectros de ^1H r.m.n. y ^{13}C r.m.n. correspondientes a los derivados cinamoilados de carbohidratos y polialcoholes sintetizados, se realizaron en un espectrómetro Bruker AC200 provisto de sonda dual carbono-protón para muestras líquidas y tubos de 5 mm de diámetro. Alternativamente se utilizó un espectrómetro VARIAN UNITY 300MHz provisto de sonda de banda ancha. Los desplazamientos químicos se dan en unidades δ (ppm). En todos los casos se empleó como disolvente cloroformo perdeuterado.

2.6.1.5 Espectrometría de masas

El análisis de glc-ms del derivado cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5980-A en combinación con un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5710-A. Para el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona se utilizó un espectrómetro Hewlett Packard 5995. En ambos casos, se utilizó la técnica de impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (m/e) y la abundancia relativa de cada fragmento se da en tanto por ciento respecto al pico base del espectro.

2.6.1.6 Análisis térmico

Se utilizó un Calorímetro Diferencial de Barrido modelo TGA-DSC 2920. Se trabajó en corriente de nitrógeno seco con un flujo de 5 mL/min. Como método de trabajo, se realizó un equilibrado de 10°C y una rampa de 10°C/min hasta 300°C. A continuación se volvió a calibrar a 300°C seguido de una nueva rampa de 10°C/min hasta 10°C. Finalmente, se volvió a equilibrar a 10°C y se siguió con otra rampa de 10°C/min hasta los 300°C. Se emplearon cápsulas selladas herméticamente de aluminio, y como material de referencia se utilizó una cápsula vacía en iguales condiciones de sellado. Con las dos primeras rampas de calentamiento se procedió al borrado de la historia térmica de las

muestras preparadas y de este modo se consiguió la uniformización de todas ellas. La medida obtenida para cada muestra fue realizada en la tercera rampa de calentamiento.

2.6.1.7 Microscopía electrónica

Nuestros soportes de inmovilización fueron visualizados, ya sea solos o como inmovilizados finales preparados, tras ser depositados del modo descrito en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos sobre bolas de vidrio de 3 mm de diámetro como matriz inerte. Las muestras fueron pegadas sobre un soporte de aluminio mediante cinta adhesiva de carbón, y recubiertas con carbón. Las muestras, así preparadas, fueron observadas al microscopio electrónico de barrido JEOL-6100. Se empleó el sistema de microanálisis LINK ISIS L-200 C de Oxford.

2.6.2 Medidas de actividad enzimática

Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas usando un espectrofotómetro UV/Visible UNICAM 8625 controlado por un ordenador PC provisto del programa Unicam Software Scan 8620/25, previo ajuste de la longitud de onda de medida deseada dependiendo de si se trataba de ensayar la actividad β -galactosidasa o la actividad de HRPc.

Para la realización de las medidas de actividad enzimática en continuo, se utilizó una bomba peristáltica de flujo variable DINKO (modelo D25V), mediante la cual se hizo bombear el medio de reacción a través del espectrofotómetro en cuyo interior se colocó una cubeta de cuarzo con entrada y salida conectadas al circuito de la bomba. El sistema de medida se muestra en las Figuras 2.3 y 2.4.

**FIGURA 2.3**

Vista general del sistema de medida de la actividad enzimática.

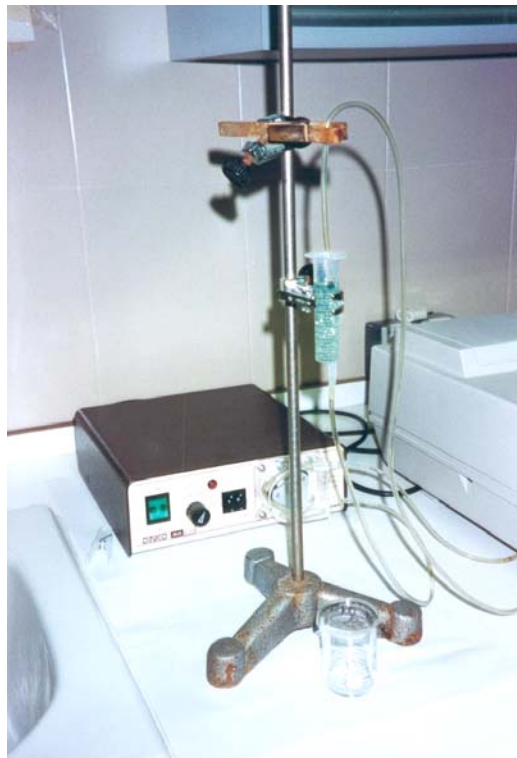
**FIGURA 2.4**

Imagen de una jeringuilla con soporte de inmovilización y enzima inmovilizada, durante el curso de una medida enzimática, seguida mediante el desarrollo del color verde intenso que se observa en su interior.

2.6.2.1 HRPc

La actividad enzimática de esta enzima fue determinada usando H_2O_2 como sustrato oxidante y ABTS como sustrato reductor. El medio de ensayo contenía ABTS 1 mM y H_2O_2 1 mM en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La actividad enzimática fue medida espectrofotométricamente como el aumento en la absorbancia debido a la formación del producto de oxidación del ABTS a 414 nm ($\epsilon_{414\text{nm}} = 31,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que forma 1 μmol de producto en un minuto al pH especificado y a 25°C de temperatura.

En ciertos ensayos, fue utilizado tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). Cuando este tampón sea utilizado será especificado en el ensayo correspondiente, considerándose en su defecto que se estará utilizando la disolución tampón arriba citada.

Las medidas de actividad enzimática pudieron ser realizadas tanto en continuo como en discontinuo. Cuando las medidas se realizaron en discontinuo se empleó un tiempo de ensayo que aseguró la linealidad de los resultados obtenidos.

Medidas en continuo

Enzima soluble. En una cubeta de vidrio de 3 mL se colocó 2 mL de una disolución compuesta por ABTS y H_2O_2 , ambos a una concentración de 1 mM, y en un tampón de pH deseado. A continuación se adicionó un volumen de disolución enzimática tal que su concentración final en la cubeta fuera comparable a la concentración de enzima empleada para el ensayo de inmovilización que se describirá posteriormente. La actividad enzimática se midió como la velocidad de formación del producto de oxidación de ABTS a 414 nm. El registro de absorbancia se utilizó para determinar la medida de la pendiente en el tramo recto inicial.

Enzima liberada a las aguas de lavado. La actividad enzimática de las fracciones intermedias de lavado o de almacenado es obtenida a partir del medio contenido en las jeringuillas ($\cong 7$ ó 5 mL, respectivamente). Para ello, en una cubeta de vidrio de 3 mL se colocaron 2 mL de una disolución 1 mM de ABTS y 1 mM de H_2O_2 en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La absorbancia de este medio de reacción fue tomado como el valor cero de la medida. La reacción enzimática se inició, posteriormente, por la adición de 1 mL del medio de lavado o almacenado correspondiente. La actividad enzimática se midió como la velocidad de formación del producto de oxidación de ABTS a

414 nm. El registro fue seguido durante varios minutos y el cálculo de la actividad fue realizado en el tramo recto inicial.

Enzima Inmovilizada: Ensayo estándar. Una vez que las bolas de vidrio han sido lavadas y secadas con succión a presión reducida, fueron cambiadas a una jeringuilla nueva. Cada jeringuilla fue utilizada a modo de un pequeño *Reactor Continuo de Lecho Empaquetado con Recirculación y Flujo Descendente*, a través del cual se le hizo bombear mediante una bomba peristáltica la disolución de sustratos a una velocidad de flujo de 50-55 mL/min. La actividad enzimática fue detectada continuamente a 414 nm durante varios minutos y la velocidad inicial de la reacción enzimática fue medida en el tramo inicial recto del registro grabado.

Enzima Inmovilizada: Ensayos iniciales. En los ensayos iniciales en que bolas de vidrio de 3 mm de diámetro fueron empleadas, las medidas en continuo fueron realizadas estando las bolas de vidrio en un vial de 20 mL convenientemente preparado para el ensayo que se deseaba realizar. Este vial, fue introducido en el reactor termostatado a 25°C, y el medio de reacción fue recirculado mediante una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 50-55 mL/min. La actividad enzimática fue detectada continuamente a 414 nm durante 15 minutos y la velocidad inicial de la reacción enzimática fue medida en el tramo inicial recto del espectro grabado.

Medidas en discontinuo

Ensayo estándar. Las medidas en discontinuo sólo se realizaron para la enzima inmovilizada. Para ello a la jeringuilla que contenía la matriz inerte con el sólido depositado y la enzima inmovilizada se cerró su salida inferior, y se le añadieron 5 mL de disolución 1 mM de ABTS y 1 mM de H₂O₂ en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). Tras dejar reaccionar durante el tiempo deseado (normalmente 5 minutos), se extrajo una fracción del medio de reacción y se midió su absorbancia a 414 nm. El valor obtenido fue dividido por el tiempo de reacción empleado y el resultado fue expresado como $\Delta A/\text{min}$. El medio de reacción contenido en la cubeta del espectrofotómetro se dejó durante un tiempo para comprobar que la medida inicial obtenida no evolucionó significativamente, comprobando así la no liberación de la enzima al medio de reacción.

Ensayos iniciales. El método es similar al descrito en el apartado correspondiente para β -galactosidasa inmovilizada, pero en este caso, la disolución de sustratos será la indicada al comienzo de este apartado 2.6.2.1 a pH 4,5, el reactor estará termostatado a

25°C y además, la reacción enzimática se dejará que tenga lugar sólo durante 15 minutos.

La actividad retenida sobre el sólido de inmovilización fue estimada en base a la cantidad de producto de oxidación de ABTS formado, mediante la medida del valor de absorbancia obtenido a 414 nm tras finalizar el tiempo de reacción arriba citado. El cero de la medida es realizado con la disolución de sustratos de partida. El medio contenido en la cubeta fue mantenido durante otros 15 minutos para comprobar que no tenía lugar una evolución posterior del valor inicialmente medido, o que esta evolución era despreciable.

Si se emplearon matrices inertes para la deposición del sólido de inmovilización, cuando fue ensayada la actividad enzimática retenida, las matrices fueron colocadas en un vial de vidrio de 20 mL convenientemente preparado para el ensayo que se deseaba realizar. Este vial, con la matriz recubierta de sólido de inmovilización, fue introducido en el reactor termostataado a 25°C.

2.6.2.2 β -Galactosidasa

Medidas en discontinuo

Enzima inmovilizada. El sólido con la enzima inmovilizada fue resuspendido en un reactor termostataado a 38°C con 20 mL de disolución 5 mM de ONPG en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1). La reacción fue dejada evolucionar durante 1 hora con agitación magnética. La reacción fue parada mediante separación del medio de ensayo del sólido de inmovilización, por filtración a través de un filtro de papel Whatman. La actividad retenida sobre el sólido de inmovilización fue estimada en base a la cantidad de ONF formado, mediante la medida del valor de absorbancia obtenido a 420 nm tras finalizar el tiempo de reacción arriba citado. El cero de la medida es realizado con la disolución de ONPG de partida.

Los datos de absorbancia, inicialmente obtenidos, fueron convertidos a concentración de fenol dividiendo por el correspondiente coeficiente de extinción molar (ϵ), que en las condiciones de ensayo fue de $2465 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, tal y como se hace constar en el apartado 2.6.3 de este capítulo, donde se describe el método para la determinación de este parámetro.

El medio contenido en la cubeta fue mantenido durante 30 minutos más para comprobar que no tenía lugar una evolución posterior del valor inicialmente medido,

debido a la presencia de enzima soluble liberada del sólido de inmovilización. A partir del apartado 5.1.1 en que se puso de manifiesto la conveniencia de usar iones Mg^{+2} para medir la actividad enzimática de la proteína, el tampón usado para este fin, como el utilizado para su almacenamiento estuvo constituido por $MgSO_4$ 0,5 mM. A partir del apartado 5.1.3.2 se emplean cartuchos de papel Whatman, y las medidas de actividad enzimática fueron realizadas sin agitar el medio de reacción. La reacción fue detenida sacando el cartucho del medio de ensayo.

Enzima soluble liberada al medio de almacenado. En una cubeta de plástico de 3 mL se colocó 2 mL de disolución 5 mM de ONPG en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en $MgSO_4$. Con este medio se hizo el cero de absorbancia. La reacción enzimática se inició por la adición de 1 mL del medio de almacenado correspondiente y se dejó evolucionar durante 1 hora. La actividad liberada al medio de almacenado, fue estimada en base a la cantidad de ONF formado, mediante la medida del valor de absorbancia obtenido a 420 nm tras finalizar el tiempo de reacción arriba citado.

A partir del apartado 5.3.4, este ensayo se realizó colocando el medio de reacción en un vial de vidrio, que a su vez se introdujo en el reactor termostataado a 38°C.

Medidas en continuo

Este tipo de ensayos sólo se ha realizado para el caso de fracciones de enzima inmovilizada sobre bolas de vidrio. Una vez que las bolas de vidrio han sido lavadas y secadas con la bomba de vacío, fueron cambiadas a una jeringuilla nueva. Cada jeringuilla fue utilizada a modo de un pequeño *Reactor Continuo de Lecho Empaquetado con Recirculación y Flujo Descendente*, a través del cual se le hizo bombear, mediante una bomba peristáltica, la disolución de sustratos a una velocidad de flujo de 50-55 mL/min. Para el ensayo fue empleada una disolución 5 mM de ONPG en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en $MgSO_4$. La actividad enzimática fue detectada a temperatura ambiente, a 420 nm durante 1 hora y la velocidad inicial de la reacción enzimática fue medida en el tramo inicial recto del registro grabado.

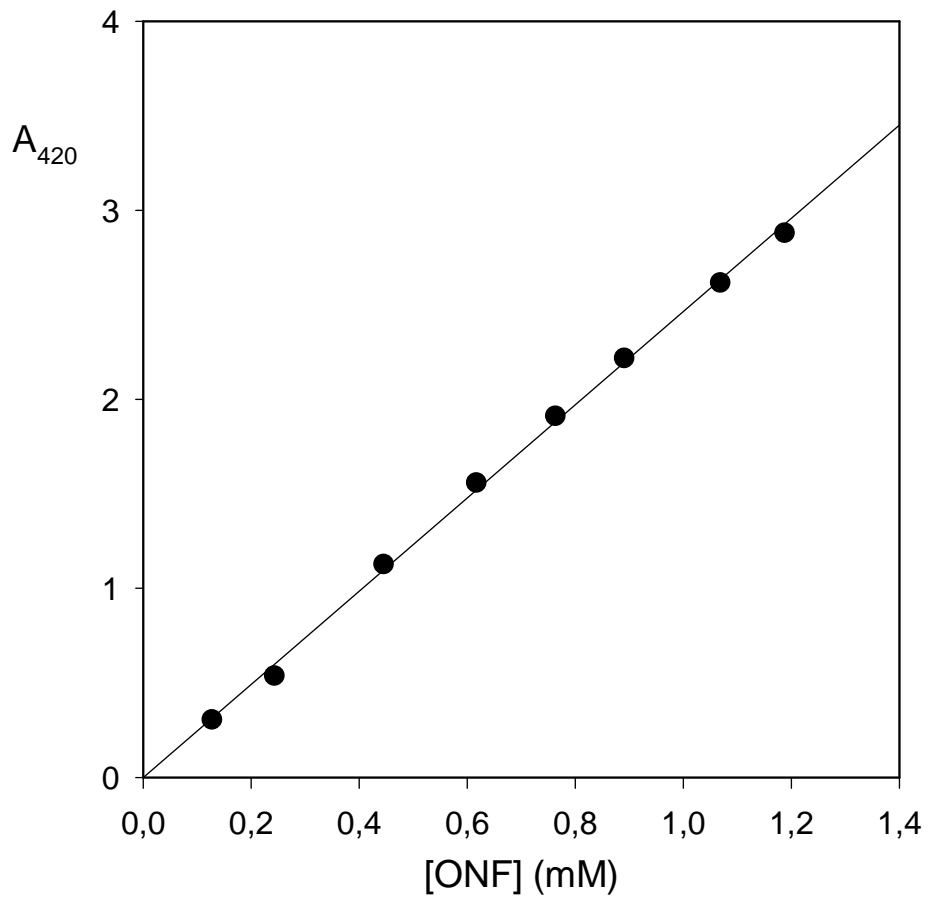
2.6.3 Coeficiente de extinción molar del ONF

A partir de una disolución inicial 26,7 mM de ONF, en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO_4 0,5 mM, se prepararon las diferentes disoluciones de concentración conocida e indicadas en la tabla abajo especificada.

El blanco del espectrofotómetro a la longitud de onda de medida ($\lambda = 420$ nm) se realizó con 2 mL de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO_4 0,5 mM. A continuación se realizaron las medidas de absorbancia de las disoluciones arriba citadas a 420 nm, obteniéndose los siguientes resultados.

[ONF] (mM)	A_{420}
0,13	0,306
0,24	0,538
0,45	1,128
0,62	1,559
0,76	1,913
0,89	2,218
1,07	2,618
1,19	2,881

La representación de los resultados arriba indicados permitió obtener la gráfica mostrada al final de este apartado (Figura 2.5). Los datos representados fueron ajustados a la ecuación de una recta mediante el programa Sigma Plot 4.01. Los datos de ordenada en el origen y pendiente del ajuste realizado permitieron establecer la ecuación de la recta siguiente: $y = 2465,01x - 1,477 \times 10^{-4}$ con $r^2 = 0,998$. La pendiente de esta recta determina un valor del coeficiente de extinción molar del ONF de $2465 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

**FIGURA 2.5**

Representación del valor de absorbancia medido a $\lambda = 420 \text{ nm}$, A_{420} , frente a la concentración de o-nitrofenol, $[ONF] \text{ (mM)}$.

2.7 ANÁLISIS DE REGRESIÓN

El análisis de regresión permite evaluar los parámetros implicados en una ecuación algebraica o diferencial a partir de datos experimentales. El método de los mínimos cuadrados es el más utilizado para el ajuste de funciones lineales y no lineales. En este caso, es necesario conocer unas estimaciones iniciales de los parámetros que se mejoran en iteraciones sucesivas (Atkins y Nimmo, 1980; Draper y Smith, 1981; Endrenyi, 1981; Johnson, 1992).

Una función “f” con “n” datos, “k” variables independientes y “p” parámetros puede expresarse como (Watts, 1981):

$$Y_i = f(\mathbf{z}, \mathbf{u}_i)$$

utilizando la notación matricial:

$$\mathbf{Y} = (Y_1, \dots, Y_n)^T$$

$$\mathbf{u}_i = (u_{i1}, \dots, u_{ik})^T$$

$$\mathbf{z} = (z_1, \dots, z_p)^T$$

En lo sucesivo, los superíndices “T” y “-1” corresponde a las matrices transpuesta e inversa, respectivamente.

En la práctica, existe diferencia entre los valores calculados, Y_i , y los experimentales, y_i , debida al error experimental o residuo, E_i .

$$Y_i = f(\mathbf{z}, \mathbf{u}_i) + E_i$$

El método de los mínimos cuadrados establece que el mejor ajuste entre los datos experimentales y calculados corresponde al conjunto de parámetros $\hat{\mathbf{z}}$ característico del mínimo de la función suma de los residuos al cuadrado, $S(\mathbf{z})$:

$$S(\mathbf{z}) = \sum_{i=1}^n [y_i - f(\mathbf{z}, \mathbf{u}_i)]^2$$

2.7.1 Regresión no lineal

Los ajustes por regresión no lineal pueden realizarse a través de los análisis en gradiente y de los algoritmos tipo Gauss-Newton. Los primeros métodos (Swann, 1969) exploran el espacio de los parámetros buscando la dirección en la que tiene lugar la máxima variación de la función, respecto a todos ellos. A continuación evolucionan en la dirección opuesta a la anterior, mejorando los valores de los parámetros en iteraciones

sucesivas del método. Estos procedimientos no requieren estimaciones iniciales muy próximas a $\hat{\mathbf{z}}$ pero requieren largo tiempo de cálculo, características opuestas a las de los algoritmos de Gauss-Newton.

Los algoritmos de Gauss-Newton introducen una aproximación lineal de la función en un entorno próximo a los valores de los parámetros calculados en cada iteración (Watts, 1981). Así, en base a las estimaciones \mathbf{z}^i se calculan los incrementos \mathbf{B}^{i+1} que conducen a las estimaciones mejoradas \mathbf{z}^{i+1} :

$$\mathbf{z}^{i+1} = \mathbf{z}^i + \mathbf{B}^{i+1}$$

La expresión que define al vector de incrementos de parámetros en cada iteración abarca diversos componentes:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{V}^T \mathbf{W} \mathbf{V})^{-1} (\mathbf{V}^T \mathbf{W} \mathbf{D}) = \mathbf{A}^{-1} \mathbf{C}$$

Así pues, cada iteración requiere una nueva evaluación de los residuos \mathbf{D} y de las derivadas \mathbf{V} , respecto a las estimaciones en curso de los parámetros \mathbf{z} y actualizadas mediante los incrementos \mathbf{B} .

La ponderación \mathbf{W} asociada a cada dato determina la contribución específica del mismo al ajuste global de todos los valores experimentales. Los factores de ponderación:

$$\mathbf{W}_i = 1 / \mathbf{S}_i^2$$

están inversamente relacionados con las varianzas respectivas de cada punto, obtenidas a partir de varias repeticiones para cada dato experimental (Cleland, 1967; Endrenyi, 1981).

La fiabilidad del ajuste se realiza mediante la región de confianza correspondiente al nivel de significación α (Watts, 1981):

$$(\mathbf{z} - \hat{\mathbf{z}})^T \mathbf{V}^T \mathbf{V} (\mathbf{z} - \hat{\mathbf{z}}) \leq p \mathbf{S}(\hat{\mathbf{z}}) F(p, n - p; \alpha) / (n - p)$$

Esta región es un elipsoide p-dimensional en el espacio de los parámetros con centro $\hat{\mathbf{z}}$, interpretación geométrica asociada al concepto estadístico de matriz de correlación (Cleland, 1967; Endrenyi, 1981). Esta expresión abarca la varianza experimental, $\mathbf{S}(\hat{\mathbf{z}}) / (n - p)$, estimada para el número de grados de libertad del ajuste ($n - p$), así como los valores tabulados de la distribución F de Fisher.

Entre los mejores métodos de regresión no lineal, se encuentra un algoritmo de Gauss-Newton que incorpora cierta proporción de búsqueda en gradiente (Marquardt,

1963). La contribución del proceso en gradiente se introduce en la anterior expresión de **B** a través de la matriz **A**.

$$A_{ij} = \begin{cases} A_{ij} (1 + L), & i = j \\ A_{ij}, & i \neq j \end{cases}$$

A la constante L se le asigna un valor inicial de 10^{-3} (Marquardt, 1963) que puede aumentar o disminuir en factores de diez, durante las sucesivas iteraciones.

2.7.2 Regresión lineal

La minimización de la suma de los residuos al cuadrado para una función lineal simple o múltiple, conduce directamente a expresiones algebraicas que definen los parámetros correspondientes (Draper y Smith, 1981; Endrenyi, 1981). Así, a partir de las anteriores expresiones para las matrices **z** y **B** se obtiene:

$$\mathbf{z} = (\mathbf{x}^T \mathbf{W} \mathbf{x})^{-1} (\mathbf{x}^T \mathbf{W} \mathbf{y})$$

siendo igualmente aplicables los conceptos de ponderación y fiabilidad anteriormente descritos.

2.8 ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES

La determinación de los valores experimentales de las constantes de inactivación frente a los diferentes factores estudiados a lo largo de esta Memoria, el cálculo de las constantes cinéticas para la enzima HRPc soluble e inmovilizada, así como aquellos otros datos experimentales que se obtuvieron a partir del ajuste por regresión lineal o no lineal de los datos inicialmente obtenidos, se llevó a cabo mediante el algoritmo de Marquardt (1963) implementado en el programa Sigma Plot[®] 4.01 para Windows[®] (Jandel Scientific, 1997).

Capítulo 3

3 SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN

3.1 SOPORTES OBTENIDOS

Para el análisis elemental se empleó el derivado totalmente cinamoilado de maltosa, como representativo de los polímeros de mediano o bajo peso molecular, y el derivado totalmente cinamoilado de inulina como representativo de los de elevado peso molecular. Para el derivado de maltosa, el análisis elemental proporcionó un valor para la relación C/H de 14,22, siendo el correspondiente valor teórico de 14,39. En el caso del derivado de inulina, el valor experimental obtenido para la relación C/H fue de 14,66, mientras que el valor teórico esperado es de 14,13.

Los espectros de UV-visible se realizaron en el intervalo 240 a 340 nm. Los espectros obtenidos fueron acordes con los mostrados en otros trabajos (Moliner, 1986) y presentaron máximos de absorción a 278-280 nm.

No se aportan los registros aislados para no ser reiterativos. Sin embargo, a lo largo de este capítulo se mostrarán los obtenidos para ciertos soportes tras distintos tiempos de irradiación.

Los datos espectroscópicos de los derivados cinamoilados sintetizados se muestran a continuación:

p-Hidroxibenzaldehído: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 300 MHz): 6,63 (d, 1H), 7,34-7,47 (m, 3H), 7,55-7,62 (m, 2H), 7,69 (dd, 4H), 7,90 (d, 1H), 10,00 (s, 1H); ir. (KBr): 1729, 1637, 1598, 1500, 1450, 1336, 1309, 1281, 1218, 1159, 1100, 1072, 989, 967, 858, 768, 683 cm^{-1} .

Glicerina: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 300 MHz): 4,45 (m, 4H), 5,51 (q, 1H), 6,41 (d, 2H), 6,43 (d, 1H), 7,30-7,35 (m, 9H), 7,42-7,50 (m, 6H), 7,66 (d, 2H), 7,69 (d, 1H); ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1491, 1449, 1382, 1330, 1308, 1281, 1275, 1255, 1203, 1160, 1097, 1051, 1023, 980, 864, 767, 709, 683 cm^{-1} .

D-sorbitol: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 300 MHz): 4,38-4,70 (m, 4H), 5,57-5,69 (m, 2H), 5,88-5,97 (m, 2H), 6,41-6,57 (m, 6H), 7,21-7,50 (m, 30H), 7,66-7,81 (m, 6H); ^{13}C r.m.n. δ (CDCl_3 , 75,4 MHz): 62,05 (CH_2), 62,36 (CH_2), 68, 81 (CH), 69, 25 (CH), 69,43 (CH), 70,06 (CH), 116,55 (CH), 116,79 (CH), 116,97 (CH), 128,18 (CH), 128,78 (CH), 130,41 (CH), 134,07(C), 146,22 (CH), 146,58 (CH), 147,04 (CH), 165,47 (CO), 165,67 (CO), 165,74 (CO), 165,82(CO), 166,27 (CO), 166,31 (CO); ir. (KBr): 1719, 1636, 1578, 1496, 1450,

1364, 1330, 1308, 1281, 1269, 1250, 1203, 1155, 1072, 1025, 980, 863, 766, 708, 683 cm^{-1} .

D-manitol: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 300 MHz): 4,39-4,73 (m, 2+2H), 5,60-5,62 (m, 2H), 5,91-5,93 (m, 2H), 6,40-6,57 (m, 6H), 7,24-7,47 (m, 18H), 7,48-7,59 (m, 12H), 7,67-7,88 (m, 6H); ^{13}C r.m.n. δ (CDCl_3 , 75,4 MHz): 62,16 (CH_2), 68,63 (CH), 69,35 (CH), 116,67 (CH), 117,00 (CH), 117,21 (CH), 128,32 (CH), 129,02 (CH), 131,23 (CH), 133,65 (C), 145,62 (CH), 146,08 (CH), 146,65 (CH), 165,43 (CO), 165,56 (CO), 166,30 (CO); ir. (KBr): 1719, 1632, 1578, 1508, 1491, 1449, 1382, 1328, 1312, 1286, 1267, 1252, 1203, 1149, 1069, 1026, 984, 870, 766, 706, 676 cm^{-1} .

1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 300 MHz): 1,27 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 4,28-4,40 (m, 2H), 4,55-4,56 (m, 1H), 4,58-4,62 (m, 1H), 4,72-4,77 (m, 2H), 5,38-5,39 (m, 1H), 5,47-5,52 (m, 1H), 5,94 (d, 1H), 6,27-6,41 (m, 3H), 7,24-7,50 (m, 15H), 7,55-7,64 (m, 3H); ^{13}C r.m.n. δ (CDCl_3 , 75,4 MHz): 26,29 (CH_3), 26,87 (CH_3), 63,64 (CH_2), 68,28 (CH), 75,63 (CH), 77,10 (CH), 83,33 (CH), 105,18 (CH), 112,52 (C), 116,71 (CH), 117,09 (CH), 117,56 (CH), 128,29 (CH), 128,87 (CH), 130,33 (CH), 134,08 (C), 145,35 (CH), 145,83 (CH), 146,34 (CH), 165,40 (CO), 165,54 (CO), 166,47 (CO); e.m.; m/z (%): 611 (1), 610 (M^+ , 3), 595 (3), 552 (1), 524 (1), 479 (0,2), 463 (1), 462 (1), 449 (0,1), 433 (1), 404 (1), 351 (0,1), 321 (1), 315 (3), 314 (13), 289 (6), 286 (2), 285 (9), 259 (0,2), 257 (1), 256 (2), 232 (2), 231 (7), 199 (0,2), 161 (0,1), 149 (1), 148 (3), 147 (5), 131 (100), 103 (13), 85 (1), 77 (4), 58 (0,3); ir. (KBr): 1719, 1635, 1577, 1496, 1450, 1382, 1330, 1310, 1284, 1269, 1230, 1202, 1159, 1074, 1027, 981, 865, 763, 704, 683 cm^{-1} .

Ácido D-glucurónico: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 200 MHz): 4,79 (t, 1H), 5,05 (t, 1H), 5,09 (t, 1H), 5,35 (t, 1H), 6,11 (d, 1H), 6,39 (d, 1H), 6,47-6,51 (m, 2H), 6,59 (d, 1H), 7,26-7,46 (m, 12H), 7,49-7,60 (m, 8H), 7,73 (d, 1H), 7,81 (d, 2H), 7,86 (d, 1H); ^{13}C r.m.n. δ (CDCl_3 , 50,4 MHz): 65,71 (CH), 66,19 (CH), 68,55 (CH), 71,37 (CH), 100,58 (CH), 115,96 (CH), 116,33 (CH), 116,71 (CH), 126,35 (CH), 126,93 (CH), 130,90 (CH), 133,80 (C), 147,21 (CH), 147,35 (CH), 147,67 (CH), 164,14 (CO), 165,00 (CO); ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1496, 1449, 1382, 1330, 1310, 1282, 1266, 1252, 1203, 1155, 1072, 1022, 980, 863, 767, 708, 683 cm^{-1} .

Ácido D-gulónico: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 300 MHz): 4,35-4,65 (m, 1+1H), 5,05-5,10 (m, 1H), 5,74-5,82 (m, 1H), 5,98-6,00 (d, 1H), 6,10-6,15 (m, 1H), 6,34-6,57 (m, 4H), 7,21-7,60 (m, 20 H), 7,67-7,90 (m, 4 H); ir. (KBr): 1719, 1636, 1578, 1496, 1449, 1382, 1331, 1310, 1282, 1275, 1251, 1203, 1155, 1072, 1027, 980, 864, 767, 706, 683 cm^{-1} .

Sacarosa: ^1H r.m.n. δ (CDCl_3 , 300 MHz): 4,46-4,57 (m, 4H), 4,65-4,77 (m, 2H), 5,29-5,31 (m, 1H), 5,33-5,34 (m, 1H), 5,47-5,54 (m, 3H), 5,83-5,85 (m, 1H), 5,88-5,90 (m, 1H), 6,01-6,08 (m, 1H), 6,20-6,74 (m, 8H), 7,27-7,64 (m, 40H), 7,70-7,92 (m, 8H); ^{13}C r.m.n. δ (CDCl_3 , 75,4 MHz): 62,74 (CH_2), 64,08 (CH_2), 69,00 (CH), 69, 64 (CH), 70,71 (CH), 75,86 (CH), 76,65 (CH), 79,47 (CH), 90,71 (CH), 104,36 (C), 116,44 (CH), 116,96 (CH), 117,18 (CH), 117,34 (CH), 117,48 (CH), 128,49 (CH), 128,99 (CH), 131,19 (CH), 133,66 (C), 145,38 (CH), 145,59 (CH), 145,78 (CH), 146,48 (CH), 146,60 (CH), 146,89 (CH), 165,49 (CO), 165,62 (CO), 165,67 (CO), 165,84 (CO), 166,13 (CO), 166,37 (CO), 166,48 (CO); ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1497, 1449, 1382, 1330, 1310, 1282, 1273, 1252, 1203, 1158, 1071, 1023, 979, 863, 766, 708, 683 cm^{-1} .

D-glucosona: FAB $^+$: 852 (3), 851 (6), 850 (2), 822 (2), 775 (5), 720 (3), 719 (8), 717 (5), 705 (4), 704 (1), 703 (3), 702 (1), 699 (M^++1 , 2), 691 (2), 690 (1), 689 (2), 687 (1), 663 (2), 661 (8), 647 (4), 617 (5), 601 (7), 599 (1), 573 (3), 562 (2), 559 (6), 545 (8), 544 (2), 543 (6), 533 (1), 531 (4), 517 (2), 513 (1), 503 (8), 501 (7), 487 (8), 473 (4), 447 (2), 441 (1), 431 (2), 401 (2), 391 (1), 389 (2), 388 (2), 387 (8), 357 (5), 343 (4), 342 (1), 341 (4), 327 (8), 325 (2), 314 (3), 302 (8), 301 (2), 300 (2), 284 (3), 274 (2), 271 (9), 256 (4), 255 (10), 254 (4), 230 (1), 190 (2), 189 (2), 182 (8), 174 (1), 172 (1), 161 (2), 153 (11), 149 (25), 148 (10), 147 (4), 131 (30); ir. (KBr): 1718, 1637, 1578, 1497, 1450, 1382, 1330, 1310, 1282, 1275, 1253, 1203, 1159, 1072, 1060, 1026, 980, 864, 767, 709, 683 cm^{-1} .

D-arabinosa: ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1495, 1449, 1382, 1331, 1308, 1281, 1268, 1250, 1203, 1152, 1071, 1051, 1022, 979, 863, 766, 708, 683 cm^{-1} .

D-fructosa: ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1496, 1449, 1382, 1330, 1310, 1281, 1275, 1251, 1203, 1154, 1072, 1051, 1027, 979, 863, 766, 708, 683 cm^{-1} .

D-glucosa: ir. (KBr): 1718, 1636, 1577, 1496, 1450, 1382, 1330, 1309, 1282, 1267, 1255, 1203, 1159, 1072, 1029, 981, 865, 767, 709, 683 cm^{-1} .

Etil-D-glucopiranosido: ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1498, 1449, 1379, 1330, 1310, 1282, 1275, 1251, 1203, 1158, 1072, 1028, 980, 863, 767, 708, 683 cm^{-1} .

Maltosa: ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1496, 1449, 1382, 1330, 1310, 1282, 1268, 1250, 1203, 1162, 1072, 1045, 1025, 979, 864, 766, 707, 683 cm^{-1} .

Inulina 100%: ir. (KBr): 1719, 1637, 1578, 1498, 1449, 1386, 1329, 1310, 1282, 1255, 1203, 1161, 1071, 1041, 979, 863, 767, 709, 683 cm^{-1} .

Inulina 49%: ir. (KBr): 1719, 1637, 1561, 1498, 1449, 1386, 1329, 1310, 1282, 1255, 1203, 1163, 1071, 1035, 980, 863, 767, 709, 683 cm^{-1} .

Inulina 41%: ir. (KBr): 1719, 1637, 1561, 1498, 1449, 1386, 1329, 1311, 1282, 1255, 1203, 1165, 1071, 1035, 980, 862, 767, 709, 683 cm^{-1} .

Dextrina: ir. (KBr): 1718, 1637, 1578, 1497, 1450, 1380, 1331, 1310, 1282, 1255, 1203, 1165, 1028, 979, 863, 766, 708, 683 cm^{-1} .

Dextrano: ir. (KBr): 1719, 1701, 1637, 1577, 1497, 1449, 1331, 1309, 1282, 1252, 1203, 1155, 1077, 1044, 1026, 979, 868, 863, 766, 707, 683 cm^{-1} .

Alcohol polivinílico: ir. (KBr): 1719, 1638, 1577, 1491, 1448, 1438, 1331, 1311, 1266, 1206, 1171, 1105, 1072, 1055, 1025, 983, 865, 804, 766, 707, 681, 670 cm^{-1} .

En todos los casos se observaron señales a $\delta \cong 4,4-4,9$ y $5,3-6,1$ debidas al carbohidrato; a $\delta \cong 6,4$; $6,6$ y $7,8$ debidas a los protones vinílicos y a $\delta \cong 7,4$ debida a los protones aromáticos. Las señales de integración guardan relaciones concordantes con las correspondientes a los derivados totalmente esterificados. Se comprobó, además, la ausencia de grupos hidroxilo mediante el análisis de muestras a las que se les había añadido agua deuterada. Los espectros "DEPT", así como distintos experimentos bidimensionales, son concordantes con la estructura propuesta para estos compuestos.

Para moléculas no demasiado complejas, la asignación de los picos obtenidos en los correspondientes espectros de ^1H r.m.n. se realizó de forma adecuada. Sin embargo, para moléculas más complejas, esta asignación no es tan sencilla de realizar debido a la elevada multiplicidad presentada por las señales. Así, en el caso de derivados cinamoilados de polisacáridos, aparecen bandas anchas a los desplazamientos químicos correspondientes a los grupos característicos de nuestros derivados. Esto pudo estar motivado por la presencia de gran cantidad de grupos cinamoilo con elevada densidad electrónica unidos al núcleo de carbohidrato mediante enlaces sencillos, capaces de rotar libremente a temperatura ambiente, y la posibilidad que, en algunos casos, haya podido ocurrir entrecruzamientos entre grupos cinamoilo vecinos e incluso, que en algún porcentaje muy pequeño algún grupo hidroxilo haya quedado sin cinamoilar. Todo esto dará lugar a una gran variedad de entornos electrónicos no repartidos estadísticamente que serán difíciles de predecir y que darán lugar a la multiplicidad de señales mencionada anteriormente.

Para los espectros de ^1H r.m.n. de los derivados cinamoilados de D-sorbitol, D-manitol y ácido D-gulónico las señales de los grupos CH_2 se duplican, pues los dos hidrógenos presentes son diferentes por encontrarse en ambientes electrónicos diferentes, posiblemente debido a rigidez estructural, etc. Para D-sorbitol, los hidrógenos

de los grupos CH₂ dan señales diferentes pero sus integrales se hallan solapadas. Para D-manitol las dos señales obtenidas están claramente diferenciadas y la integración de las mismas se corresponden con el número de hidrógenos esperado. Por su parte para el ácido D-gulónico, sólo contiene un grupo CH₂ y cada hidrógeno genera una señal diferente y claramente separada de la del segundo hidrógeno, como se desprende de los valores obtenidos de la integración de las correspondientes señales. Para el derivado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa ocurre lo mismo para las señales asignadas a su grupo CH₂. Además, en el espectro COSY uno de los H de este grupo deberá encontrarse perpendicular al H del CH vecino por lo que no se acoplan, y las señales que correspondería a su acoplamiento no aparecen.

En los espectros de ¹³C r.m.n. se observa una elevada multiplicidad en las señales obtenidas para un determinado tipo de C. Para el derivado de D-glucosona, el espectro de ¹³C r.m.n. está formado por bandas en lugar de picos más o menos aislados. Esto apoya lo argumentado anteriormente referido a la gran multiplicidad de las señales obtenidas.

En algunas muestras se ha utilizado ácido cinámico libre como referencia para la asignación de los grupos CH vinílicos.

La asignación de bandas del espectro del infrarrojo es coherente con los productos sintetizados. Así, presentan bandas a 1720, 1312 y 1160 cm⁻¹ típicas de ésteres α,β -insaturados; las de 1637, 1285, 980 y 865 cm⁻¹ debidas al doble enlace carbono-carbono (trans) conjugado; las de 1600, 1500 y 1450 cm⁻¹ correspondientes al núcleo aromático, y, por último, las de 770 y 685 cm⁻¹ debidas al benceno monosustituido. Aparecen también las correspondientes al polisacárido, tales como las de 1331, 1100, 1072 y 960 cm⁻¹, por ejemplo.

Los espectros obtenidos fueron acordes con los realizados por otros investigadores para otros cinamatos (Hamton y Newell, 1949; Moliner, 1986).

En el espectro de masas del derivado cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa se observa el ión molecular, aunque con abundancia relativamente pequeña. Para el caso del derivado de D-glucosona, el estudio fue realizado con la técnica FAB⁺ y se empleó 3-nitrobencil alcohol como iniciador de la ionización, siendo característica la aparición de picos correspondientes al agrupamiento de fragmentos procedentes del derivado de D-glucosona con el ión formado a partir del citado alcohol.

Los espectros correspondientes a los derivados analizados se muestran en las Figuras A3.1-60 del Apéndice.

El análisis térmico diferencial de las muestras preparadas permitió extraer diferentes conclusiones dependiendo de la naturaleza química del soporte estudiado. Así, para los derivados totalmente cinamoilados de polisacáridos, oligosacáridos o de alcohol polivinílico, no se observan más que pequeños picos (posiblemente de productos de degradación) de absorción de calor debidos a transformaciones o fusiones (derivado de inulina) en la primera rampa térmica. En la segunda rampa no se observan puntos de fusión ni de transición vítrea en el intervalo entre 0 y 300°C. Por lo tanto, todos estos soportes de inmovilización serán muy estables a las temperaturas de trabajo habituales empleadas en aquellos fines industriales para los que podrán ser utilizados, incluso sin necesidad de ser entrecruzados.

Para el caso de compuestos polihidroxílicos, se observan picos agudos de absorción de calor (probablemente fusiones) mientras que en la segunda rampa ya no se detecta pues las muestras han oligomerizado. Por lo tanto, estos soportes, al igual que los anteriormente citados serán muy estables a la temperatura, pero será necesario su entrecruzamiento previo a su utilización.

El derivado cinamoilado de etil-D-glucopiranosido se comporta como los compuestos polihidroxílicos arriba citados debido al grado de sustitución de grupos cinamoilo que contiene.

Dentro del grupo de derivados cinamoilados de monosacáridos, los de D-arabinosa y 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa, presentan puntos de fusión definidos a temperatura relativamente bajas tal que aún en la segunda rampa de calentamiento aparecen picos de absorción de calor debido a la presencia de moléculas que no han oligomerizado tras calentar inicialmente a 300°C. Estos compuestos deberán ser entrecruzados a fondo para obtener soportes que no sufran alteraciones térmicas.

Por último, para el caso de los derivados de D-fructosa, D-glucosa y D-glucosona (pertenecientes a la misma familia), se comportan como los compuestos polihidroxílicos arriba mencionados, pero los DSC obtenidos (análogos entre sí) muestran incrementos y disminuciones de la capacidad calorífica, debidos a pérdidas de disolventes y/o transformaciones inter o intramoleculares.

Los registros de DSC obtenidos se muestran en las Figuras A3.61-80 del Apéndice de esta Memoria.

3.2 APLICACIÓN DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE HRPc

Para estos estudios se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado de inulina cinamoilado, aproximadamente, un 41% entrecruzado en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona. El método de preparación del sólido de inmovilización, para su posterior utilización en el proceso de inmovilización fue el indicado en el apartado 2.3.2 de Materiales y Métodos. En este caso también se empleó cloroformo como disolvente.

3.2.1 Empleo de sólido de inmovilización convenientemente pulverizado

Para este ensayo, se preparó una fracción de soporte de inmovilización, con 0,05 gramos de sólido. El método de inmovilización fue el indicado en el apartado 2.4.1.1 de Materiales y Métodos y el medio de inmovilización contó con la presencia de glicerina como agente humectante. La enzima tuvo una concentración en el medio de inmovilización de 17,1 µg/mL. Tras añadir la enzima, el medio de reacción se agitó durante otros 5 minutos estando el vaso en un recipiente con hielo. Tras ésto, el medio de reacción fue guardado en el frigorífico. La inmovilización se desarrolló durante 21 horas. Tras el proceso de inmovilización, el medio de reacción fue filtrado en un cartucho de papel Whatman, y el sólido recogido lavado a fondo hasta eliminar la enzima débilmente retenida. El procedimiento de lavado fue el lavado P1 descrito en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos, y la medida de la actividad enzimática se realizó en discontinuo (Ensayos iniciales).

3.2.2 Empleo de matrices inertes

En este apartado se recogerán los resultados obtenidos en los ensayos iniciales, en que el sólido de inmovilización es depositado sobre las matrices inertes relacionadas en el apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos. Dependiendo de la matriz utilizada, la cantidad de ésta fue variable. Así, se emplearon 10 gramos de bolas de vidrio o anillos Raschig, un solo cubreobjetos, o un trozo de papel de acetado convenientemente recortado. El método de preparación de las diferentes matrices inertes recubiertas con el sólido de inmovilización fue por precipitación.

El método de inmovilización dependió de la matriz inerte empleada, y se redacta en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. El procedimiento de lavado de muestras fue independiente de la matriz inerte empleada, y correspondió al lavado P2 descrito en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos.

La medida de la actividad enzimática se realizó del modo indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Los ensayos fueron realizados en discontinuo excepto cuando se emplearon bolas de vidrio de 3 mm de diámetro en cuyo caso la medida de actividad se realizó en continuo. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 3.1.

TABLA 3.1

Actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre diversas matrices inertes.

Matriz inerte empleada	V₀	V₀
	(%)	($\Delta A/min$)
Ninguna	100	-----
Anillos Raschig	10,9	-----
Cubreobjetos	8,01	-----
Bolas de vidrio (d = 1 mm)	46,8	-----
Bolas de vidrio (d = 3 mm)	-----	0,301

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 41% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (4,3 g/L). La inmovilización de HRPc (19,6 $\mu\text{g/mL}$) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 2 horas y a una temperatura entre 0-4°C.

El volumen ocupado por los anillos Raschig es casi el doble con respecto al ocupado por las bolas de vidrio de 1 mm de diámetro y, sin embargo, la actividad enzimática inicial mostrada por estas últimas es más de cuatro veces superior. Para el ensayo de las fracciones preparadas con papel de acetato, éste fue arrollado en espiral e introducido en el baño termostatado a 25°C. La cantidad de sólido depositado, y por tanto de enzima inmovilizada debió de ser muy pequeña por lo que sólo en el pequeño volumen de disolución de sustratos retenido entre dos caras adyacentes de la lámina de acetato, pudo observarse una evolución clara del medio de reacción.

3.2.2.1 Empleo de matrices de plástico

Este ensayo fue realizado al comprobar que las bolas de vidrio utilizadas mostraban retención de actividad enzimática, aunque no estuvieran recubiertas por sólido de inmovilización, por lo que se intentó encontrar alguna matriz inerte sobre la que depositar los sólidos de inmovilización preparados, pero que por sí mismas no retuvieran actividad enzimática alguna, o en caso contrario que retuvieran la menor cantidad posible. Estas matrices son también indicadas en el apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos.

Para la realización de este estudio, se prepararon diferentes fracciones utilizando como matriz inerte bolas de vidrio, perlas de PVC, perlas de polietileno duro, polietileno blando y polipropileno (Tabla 3.2). Aunque la masa empleada en cada caso fue diferente, sin embargo, el volumen ocupado en todos los casos fue similar, procurándose ocupar la mayor parte de la jeringuilla de 10 mL utilizada, y dejar un pequeño volumen muerto adicional para evitar que la disolución de sustratos rebosara.

El método de inmovilización fue como se describió en Materiales y Métodos, para el caso de bolas de vidrio y plásticos, respectivamente. La enzima tuvo una concentración en el medio de inmovilización que dependió de la matriz utilizada, puesto que la cantidad de tampón añadida hasta cubrir totalmente la matriz inerte fue diferente en cada caso. El procedimiento de lavado de muestras fue el lavado P3 descrito en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos.

Cada una de las jeringuillas preparadas fueron ensayadas en continuo para conocer su actividad enzimática inicial y la actividad enzimática de la fracción final de lavado es ensayada, también, en continuo del modo indicado en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 3.2 siguiente.

Los resultados de actividad final retenida sobre las matrices inertes ensayadas deben ser considerados con cierta cautela, puesto que debe considerarse que en el ensayo con bolas de vidrio hay prácticamente tres veces más masa de matriz que en el resto de soportes utilizados, y, además, la concentración de enzima es ligeramente superior. Esto es debido a que las matrices de plástico utilizadas, aunque tienen forma de “perlas”, sin embargo no son totalmente regulares y, en general, no todas son similares. Esto hace que el agrupamiento de la matriz en el interior de la jeringuilla no sea del todo uniforme, ocasionando que una masa bastante inferior que la utilizada en el caso de las bolas de vidrio ocupe un volumen similar.

TABLA 3.2
Actividad enzimática retenida sobre matrices inertes de diferente naturaleza química.

Matriz inerte	m_{matriz}	t_{inmov.}	[HRPc]	H₂O_e^{f a}	V₀
	(g)	(h)	(μg/mL)	(ΔA/min.mL)	(ΔA/min)
Bolas de vidrio	15	21	19,6	0,004	0,369
PVC	8	20	15,6	0,000	0,162
Polipropileno	6	18	19,6	0,001	0,262
Polietileno duro	5,5	20	15,6	0,000	0,135
Polietileno blando	5,7	21	17,9	0,000	0,272

La inmovilización de HRPc (15,6-19,6 μg/mL) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0) durante un tiempo aproximado de 20 horas y a una temperatura entre 0-4°C. (a) Fracción final de lavado.

Las enzimas inmovilizadas pueden ser preparadas en forma de partículas, membranas, tubos y fibras. Sin embargo, la mayoría de las enzimas inmovilizadas son preparadas en forma de partículas por las siguientes razones (Chibata, 1978): Fácil manejo, los soportes comercialmente disponibles para la inmovilización de enzimas están, generalmente, en forma de partículas y la superficie efectiva de los soportes en forma de partículas es mayor que la de otras formas y en consecuencia, la eficiencia de la reacción será superior.

En la línea de lo arriba mencionado, debe considerarse, que algunas de las matrices empleadas son menos densas que el agua (polietileno duro y blando, y polipropileno), por lo que flotarán en el medio de trabajo. Este hecho dificultará grandemente su manipulación durante la inmovilización, lavado y medida de actividad enzimática final. Sin embargo, la utilización de bolas de vidrio no plantea estos problemas mecánicos y, como todas son prácticamente iguales, su empaquetamiento en la jeringuilla es uniforme. Todo esto facilita su manipulación y la reproducibilidad de los resultados a obtener.

También debe tenerse en cuenta, que cuando las bolas de vidrio se recubrieron con ciertos sólidos, la actividad retenida tras el proceso de inmovilización fue despreciable, como puede ponerse de manifiesto en la Tabla 4.6. Este dato pone de manifiesto la uniformidad de la extensión del sólido de inmovilización alrededor de las

bolas de vidrio, anulando la adsorción de la enzima por parte de estas últimas. Además, debe ser considerado que nuestros inmovilizados son utilizados a modo de un Reactor Continuo de Lecho Empaquetado, con recirculación y flujo descendente. En este tipo de reactores un factor de gran importancia a ser considerado es la caída de presión que puede tener lugar durante su utilización (Chibata, 1978). Esta caída de presión depende, entre otros factores, de la forma y diámetro de las partículas empaquetadas en el reactor, comprobándose que cuando se utilizó un sistema que contenía partículas de 3 mm de diámetro, la caída de presión producida durante su funcionamiento fue hasta seis veces inferior que cuando se utilizaron partículas de diámetro menor (Chibata et al., 1976b). También se ha escrito que con la utilización de partículas esféricas, en reactores de tanque agitado y de lecho empaquetado, las averías producidas por compresión y desgaste son menores que cuando se utilizan partículas de forma irregular (Lilly y Dunnill, 1976).

Por último mencionaremos que nuestros soportes preparados a partir de bolas de vidrio recubiertas con nuestros sólidos de inmovilización, podrían ser descritos como soportes esféricos no porosos. En este tipo de soportes ha sido descrito que la actividad enzimática es inversamente proporcional al diámetro de la partícula, por lo que se preferirán partículas del menor diámetro posible. Sin embargo, el límite inferior en el tamaño de partícula del soporte vendrá determinado por la posibilidad de mantener estas partículas en el reactor. Por todo, se prefirió utilizar bolas de vidrio como matriz sobre la que depositar nuestros soportes de inmovilización. Cuando se quiso estandarizar un método de trabajo para los estudios proyectados, se emplearon bolas de vidrio de 3 mm de diámetro, para evitar los problemas de manipulación planteados por bolas de vidrio de menor diámetro, y también para que la superficie efectiva de la matriz no se redujera en exceso como ocurre con bolas de diámetro mayor. En general, en la matriz inerte utilizada se contemplan la mayoría de las consideraciones arriba citadas y además debe ser destacado que resulta de bajo coste, fácil de obtener en grandes cantidades y tiene la posibilidad de ser reutilizada.

Por todo lo anterior, la mayoría de los trabajos realizados y a los que se ha hecho referencia a lo largo de esta Memoria, han sido realizados utilizando este tipo de soportes.

3.2.2.2 Bolas de vidrio de 3 mm de diámetro

En los primeros ensayos realizados con esta matriz se pretendió comprobar la reproducibilidad de los resultados a obtener, así como la búsqueda de un lavado sencillo

y eficaz para la eliminación de la enzima débilmente retenida sobre el sólido de inmovilización. Las bolas de vidrio fueron recubiertas con el sólido de inmovilización con el método de precipitación. La medida de la actividad enzimática se realizó de modo continuo en todos los casos y los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 3.3.

TABLA 3.3

Actividad enzimática de HRPc inmovilizada empleando bolas de vidrio como matriz inerte.

Fracción	m_{bolas}	$t_{\text{inmov.}}$	Lavado	$H_2O_e^{f^a}$	V_0
	(g)	(h)		($\Delta A/\text{min.mL}$)	($\Delta A/\text{min}$)
1	10	2	P4	0,006	0,287
1B ^b	10	2	P2	-----	0,301
2	15	20	P5	0,005	0,369
3	15	20	P6	0,007	0,310

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 41% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (4,3 g/L). La inmovilización de HRPc (19,6 $\mu\text{g/mL}$) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y a una temperatura entre 0-4°C. (a) Fracción final de lavado. (b) Fracción incluida en la Tabla 3.1 mostrada en el apartado 3.2.2 anterior.

Estos resultados ponen de manifiesto que todos los lavados utilizados son igualmente aceptables, por lo que se desprende de la actividad enzimática mostrada por la fracción final de lavado. También se comprueba, observando las fracciones con igual masa de bolas de vidrio y tiempo de inmovilización, que la reproducibilidad de los resultados obtenidos es muy buena, a pesar de que el sistema de inmovilización empleado sea ligeramente diferente, como ocurre con las dos primeras fracciones mostradas. Además, todos los resultados finales son muy similares independientemente del tiempo de inmovilización y masa de bolas empleadas. Esto puede indicar, para el sólido de inmovilización utilizado, que el tiempo de inmovilización no es determinante para la actividad final medida consiguiéndose la saturación del sólido con tiempos de inmovilización muy cortos. Y, finalmente, la cantidad de enzima retenida y su actividad mostrada es lo suficientemente elevada, que en las condiciones de ensayo utilizadas, la utilización de 10 ó 15 g de bolas de vidrio no supone una variación drástica en las actividades enzimáticas a medir sobre ellas.

A pesar de lo adelantado en este apartado, factores como tipo de lavado, efecto del tiempo de inmovilización, naturaleza del sólido de inmovilización, etc., serán abordados en capítulos posteriores de esta Memoria.

3.2.3 Modo de aplicación sobre matrices inertes

Para la inmovilización de HRPc se emplearon, como ya ha sido dicho anteriormente, diferentes matrices inertes sobre las que posteriormente se depositó el sólido de inmovilización. La aplicación de los diferentes sólidos de inmovilización sobre estas matrices pudo ser por precipitación o por evaporación del disolvente tal y como se indicó en Materiales y Métodos. Para comprobar qué método ofrecía los mejores resultados en primera medida y después del almacenado, se prepararon diferentes fracciones utilizando como matriz inerte para la aplicación del sólido de inmovilización bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Inicialmente se prepararon dos fracciones por el método de evaporación del disolvente y posterior irradiación, empleando como sólido el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona y un derivado parcialmente cinamoilado (41% de cinamoilación) de inulina, mezclados al 50%. Una de las fracciones preparadas se utilizó para depositar una nueva capa de sólido de inmovilización, pero por el procedimiento de precipitación. Para ello se le hizo pasar una disolución clorofórmica del sólido de inmovilización arriba citado ya entrecruzado. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 3.4.

En los resultados mostrados en la tabla no se puede detectar diferencias apreciables entre las fracciones preparadas por evaporación del disolvente o por precipitación con hexano. Este hecho, por sí solo, llevaría a la utilización del primer método frente al segundo por su menor complejidad y por evitar, además, el uso de un disolvente orgánico que podrá afectar a la enzima si algún resto no es eliminado antes de la adición de ésta. Además, esta decisión viene apoyada por el hecho de que el lavado de las fracciones obtenidas por precipitación con hexano es menos efectivo que en aquellas en las que el sólido de inmovilización fue depositado por evaporación del disolvente. Además, tras el ensayo de actividad enzimática, los blancos mostrados por las jeringuillas obtenidas por precipitación son mayores que los obtenidos por evaporación del disolvente. Por último, cabe destacar el hecho que las fracciones tras ser almacenadas durante 12 días con 5 mL de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0), no se pudo apreciar, tampoco, diferencia alguna entre las diferentes preparaciones. Además, y aunque los resultados fueron despreciables en todos los casos, los valores mostrados por las fracciones de almacenado así como por los blancos mostrados por las jeringuillas

preparadas por precipitación fueron superiores a las preparadas por evaporación del disolvente.

TABLA 3.4

Efecto del modo de aplicación del sólido de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada.

Aplicación del soporte	Almacenado^a	V₀	Blanco^b	V_f	R
	<i>(ΔA/min.mL)</i>	<i>(ΔA/min)</i>	<i>(ΔA/min)</i>	<i>(ΔA/min)</i>	<i>(%)</i>
Evaporación	0,003	0,530	0,045	0,116	21,89
Precipitación	0,009	0,551	0,126	0,126	22,87

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 41% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona (2,9 g/L). La inmovilización de HRPc (19,6 μg/mL) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0) durante un tiempo de 20 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 1 indicado en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada en todos los casos fue medida en discontinuo. Fracciones almacenadas en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0) y a una temperatura de aproximadamente -18°C durante un tiempo de 12 días. La actividad enzimática del medio de almacenado se midió en continuo. (a) Actividad enzimática liberada al medio de almacenado. (b) Blanco mostrado por las jeringuillas tras el ensayo de actividad enzimática inicial.

Para comprobar qué método de preparar las extensiones de sólido de inmovilización ofrecía los mejores resultados, se utilizaron cubreobjetos previamente desengrasados con etanol. Como sólido de inmovilización se empleó el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, para lo cual se preparó una disolución clorofórmica con una concentración aproximada similar a la utilizada en los ensayos de inmovilización. Las extensiones fueron preparadas por inmersión del cubreobjetos en la disolución clorofórmica del soporte de inmovilización y posterior evaporación del disolvente o precipitación por inmersión en hexano. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio óptico, mediante la técnica de contraste de fases y objetivos de 40 ó 10 aumentos. Los resultados obtenidos son mostrados en las fotografías expuestas a continuación.

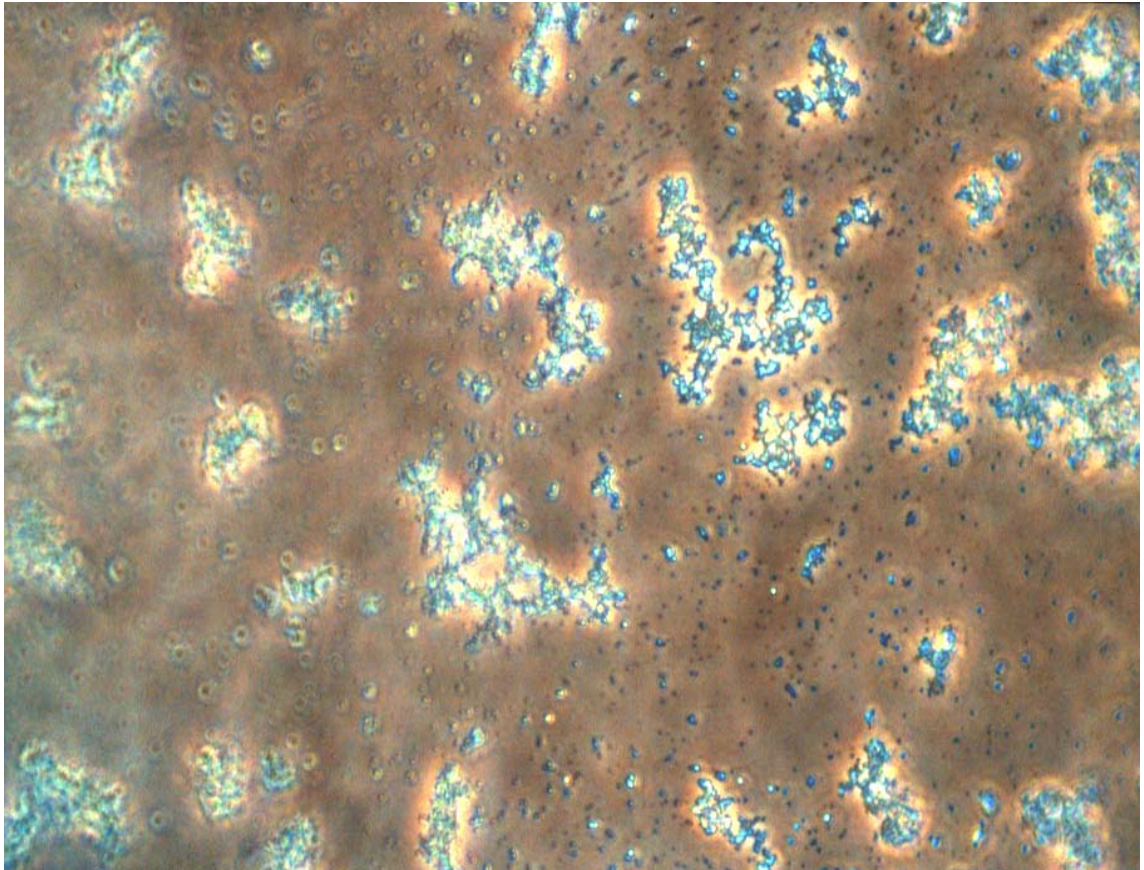


FIGURA 3.1

Precipitación del soporte de inmovilización. Objetivo x10.

Cuando las preparaciones se realizaron mediante precipitación del sólido de inmovilización, las extensiones se observaron, con un objetivo de 10 aumentos, muy irregulares con agrupaciones aisladas y estructura dendrítica. Esta observación fue confirmada mediante el objetivo de 40 aumentos (Figura 3.2). También pudo observarse por debajo del campo visual enfocado, como unas "sombras" que cuando se modificó el enfoque resultaron ser nuevas estructuras dendríticas de sólido de inmovilización, lo cual puede poner de manifiesto la formación de diferentes capas o estratos de éste.

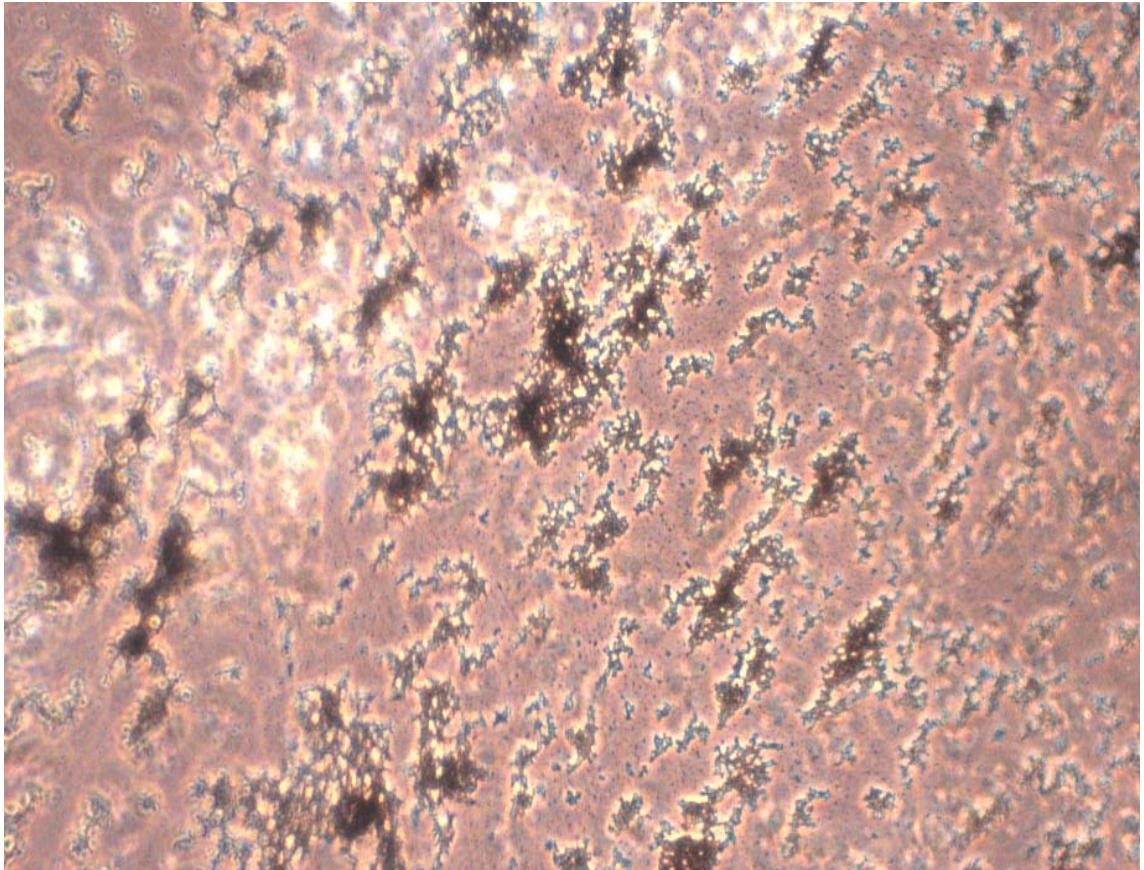
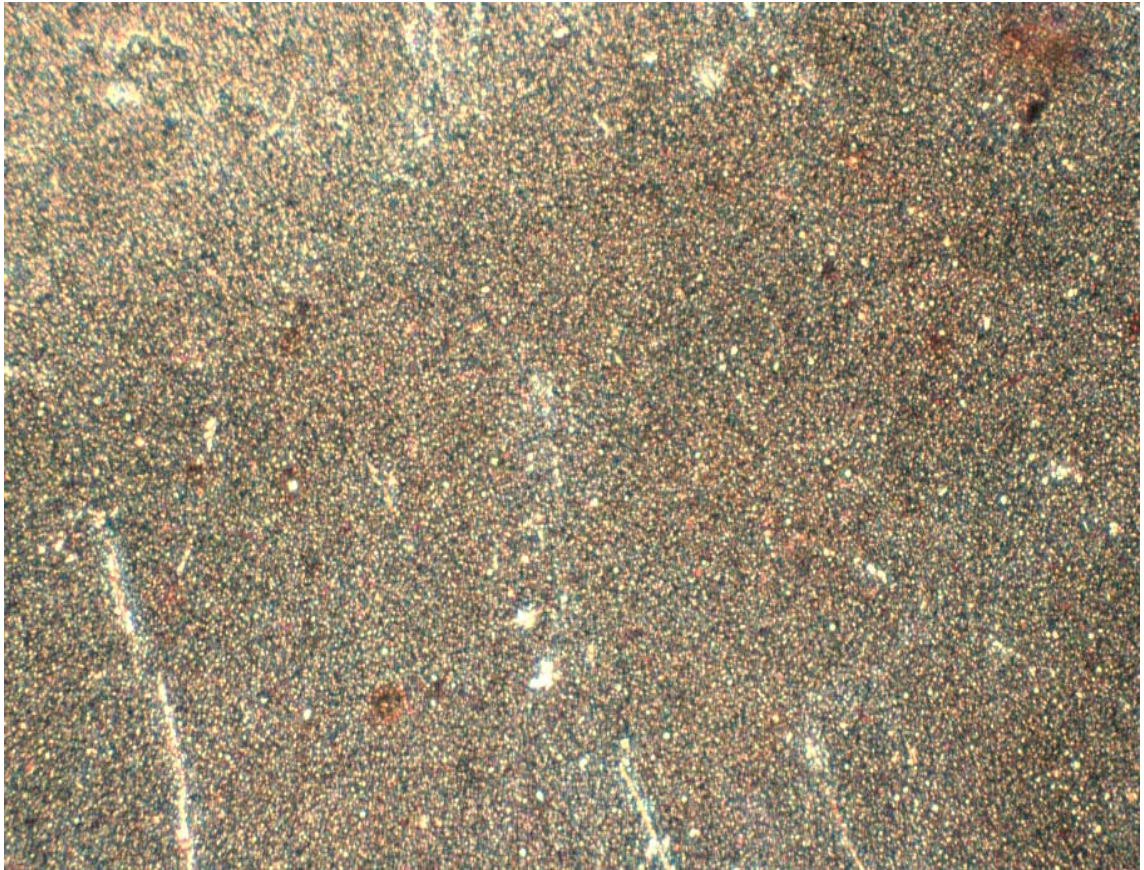


FIGURA 3.2

Precipitación del soporte de inmovilización. Objetivo x40.

Tanto la irregularidad de las preparaciones obtenidas, así como la posible formación de diferentes capas de sólido, no son aconsejables para nuestros propósitos, puesto que los resultados no podrán ser reproducibles por la posible inactivación enzimática que podría tener lugar por asociaciones heterogéneas de diversas moléculas de enzima y por las limitaciones difusionales que pueden afectar.

**FIGURA 3.3****Evaporación del disolvente. Objetivo x10.**

Cuando las preparaciones se realizaron mediante evaporación del disolvente, sobre las extensiones se depositó un colorante para provocar un contraste mayor en el campo visual enfocado. Con este propósito se empleó rojo de metilo, y la observación de las preparaciones mediante el objetivo de 10 aumentos permitió comprobar la gran uniformidad y homogeneidad de las extensiones obtenidas. Esto fue nuevamente corroborado mediante el enfoque de la extensión con el objetivo de cuarenta aumentos (Figura 3.4). En este tipo de preparaciones no aparecieron las estructuras dendríticas observadas cuando el soporte de inmovilización fue depositado por precipitación, así como tampoco se pudo poner de manifiesto que se formaran diferentes capas de soporte.

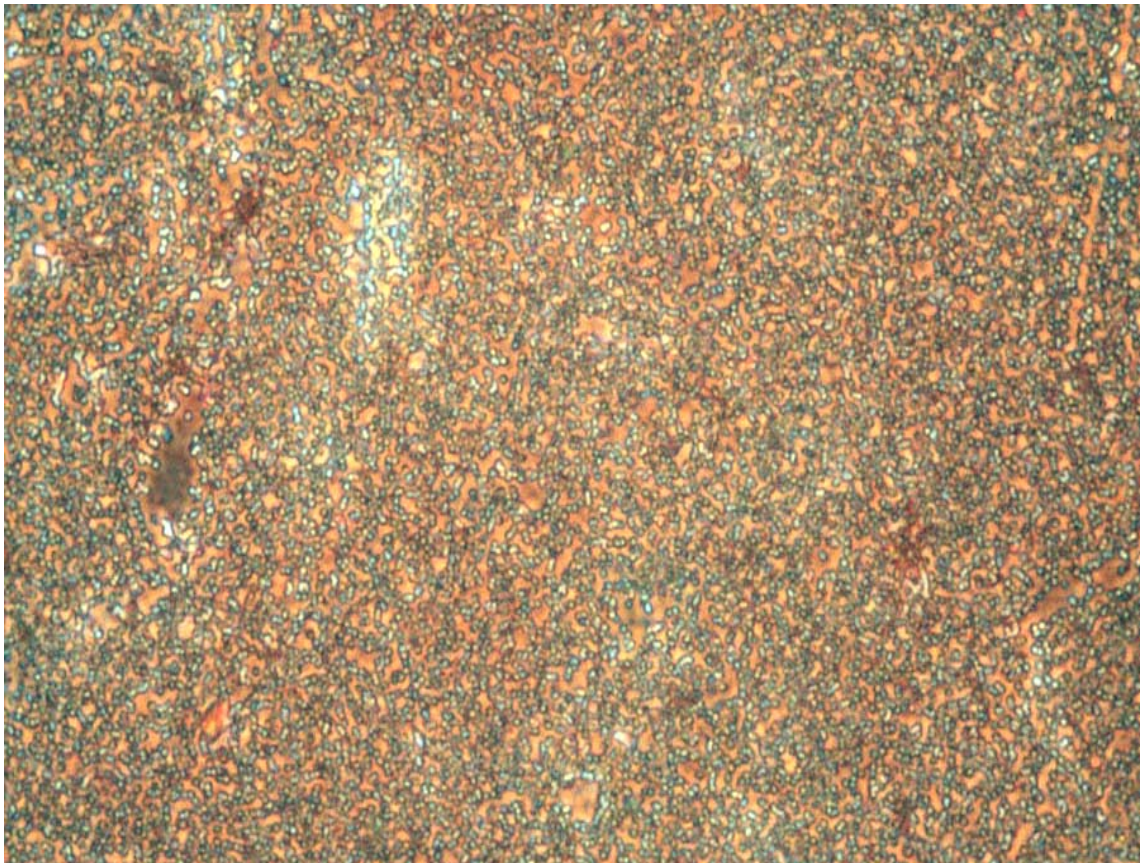
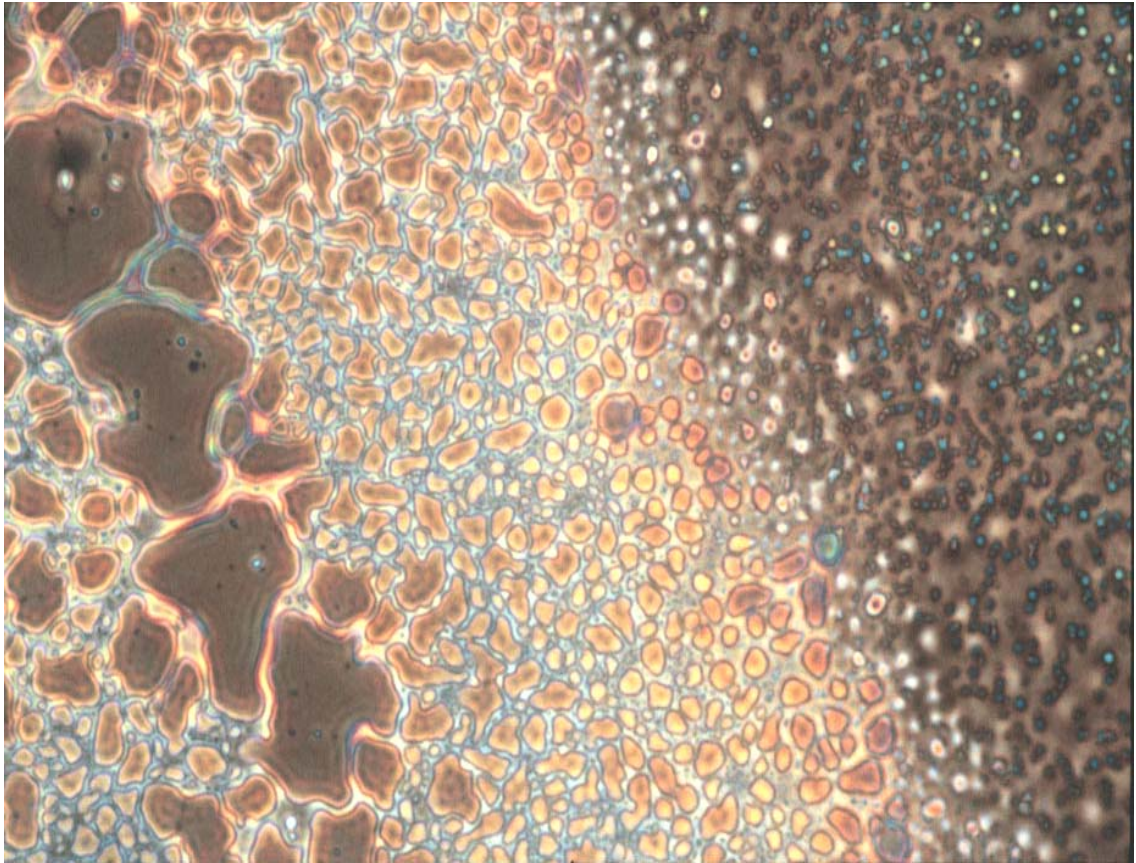
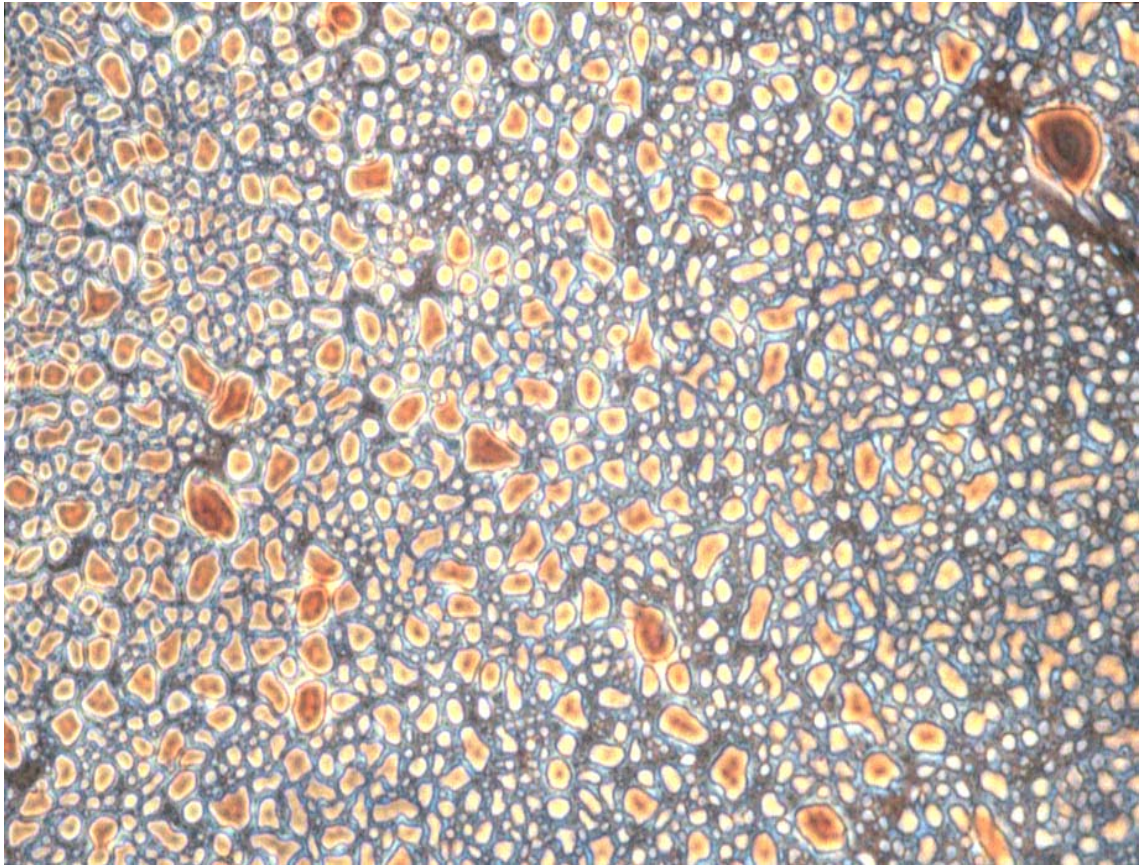


FIGURA 3.4

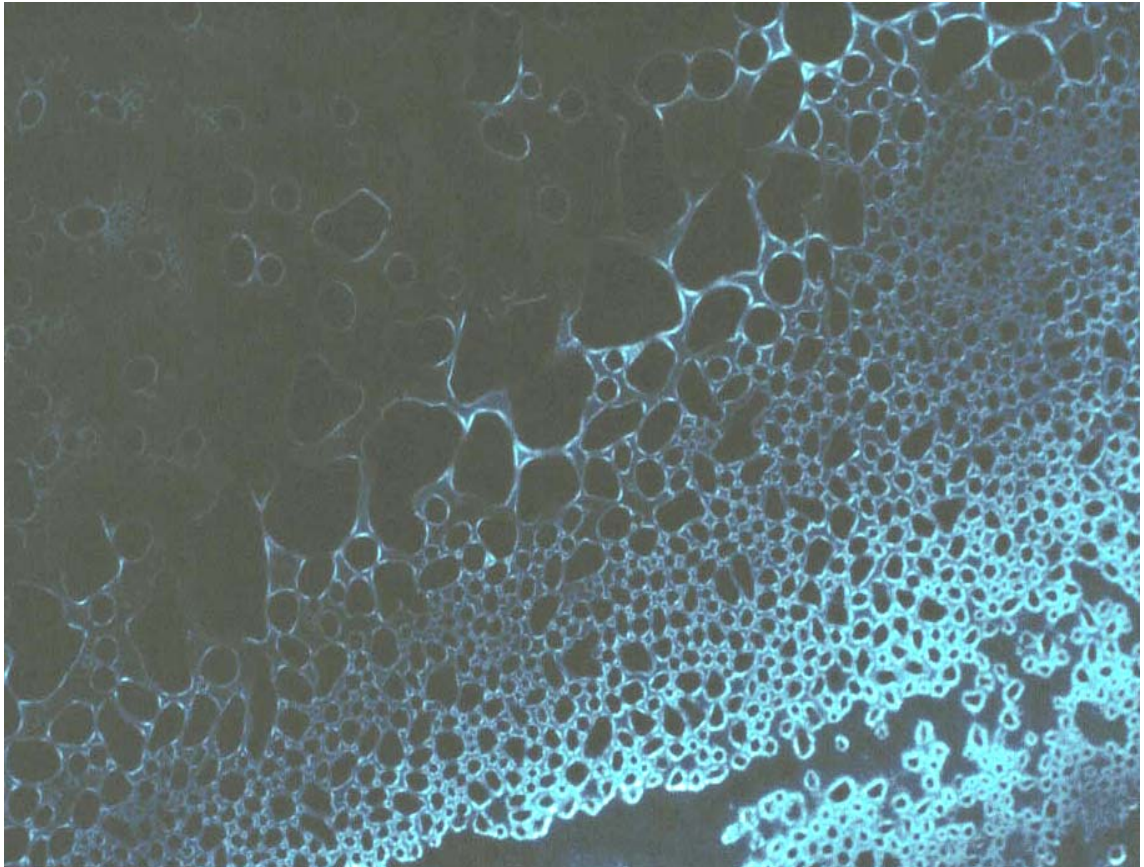
Evaporación del disolvente. Objetivo x40.

**FIGURA 3.5****Evaporación del disolvente. Objetivo x40. Zona heterogénea.**

Con el fin de reafirmar la observación hecha en la fotografía anterior, se decidió enfocar una zona donde mayor heterogeneidad de la extensión preparada pudiera observarse, con lo cual podríamos tener una aproximación de lo que ocurre en las zonas de contacto entre las bolas de vidrio, puesto que éstas serán las zonas donde mayor heterogeneidad podremos encontrar. Estas zonas fueron enfocadas con un objetivo de 40 aumentos, comprobándose una gradación del tamaño de las partículas depositadas.

**FIGURA 3.6****Evaporación del disolvente. Objetivo x40. Zona heterogénea.**

Cuando se enfocó una zona donde el tamaño de partícula fue intermedio, pudo comprobarse, sin embargo, que dentro de la heterogeneidad inicialmente observada, en esta región así como en las otras de este tramo heterogéneo, existe una gran regularidad y homogeneidad en el tamaño de las partículas depositadas.

**FIGURA 3.7****Evaporación del disolvente. Objetivo x40. Zona heterogénea.**

Para redundar en la observación hecha en las fotografías anteriores se decidió aumentar el contraste de la imagen obtenida mediante la adición de una disolución de fenol. Cuando la extensión fue enfocada con un objetivo de 40 aumentos e iluminada con luz violeta, la imagen obtenida corroboró plenamente la conclusión anterior.

Como resultado de este estudio se decidió usar el método de evaporación del disolvente y posterior irradiación de la película depositada como método para la preparación de las diferentes muestras a ensayar.

Para completar el estudio realizado, se decidió utilizar las bolas de vidrio recubiertas con el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa obtenidas tras el proceso de inmovilización con la enzima HRPc y preparadas en el apartado 3.2.4 siguiente. Las muestras preparadas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido y sometidas a análisis cuantitativo para estudiar su composición química inicial así como las variaciones que se producen cuando son recubiertas con el soporte de inmovilización y tras el proceso de inmovilización posterior.

Inicialmente, se observaron las bolas de vidrio limpias y se determinó la composición relativa de los elementos O, Na, Mg, Si y Ca. Como las muestras fueron espolvoreadas con carbono para su fijación al soporte de aluminio y posterior visualización, la cantidad inicialmente obtenida debería de ser omitida y los porcentajes obtenidos reajustados. Este hecho introdujo un factor de error en los análisis realizados y el modo en que afecta a las diferentes muestras preparadas es difícil de predecir. Además, los valores registrados para los diferentes elementos analizados se obtuvieron a partir de unos patrones virtuales muy alejados de la composición y estructura químicas de las muestras aquí analizadas. Por todo ello, los resultados aquí mostrados deben ser tomados con cierta cautela, sobre todo si quieren ser analizados desde un punto de vista estrictamente cuantitativo.

Tras visualizar y analizar las bolas de vidrio limpias, se repitió este estudio pero con las bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización así como las preparadas tras el proceso de inmovilización. Los resultados obtenidos para cada una de las preparaciones se muestran en la tabla siguiente.

Muestra	C	O	Na	Mg	Si	Ca	N
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Bolas de vidrio	20,65	40,51	6,94	1,98	24,95	4,96	-----
Bolas con soporte	54,18	30,38	2,98	0,80	9,74	1,92	-----
Bolas con soporte y enzima	36,01	39,83	2,13	0,53	4,05	0,35	17,11

Los resultados mostrados en la tabla se obtuvieron como valores medios de los datos obtenidos en diferentes zonas de las muestras analizadas.

Los datos registrados para carbono y oxígeno no aportan información concluyente puesto que, ambos elementos, están presentes en las bolas de vidrio, soporte de inmovilización y enzima. Si se observan los valores obtenidos para sodio, magnesio y silicio se observa una caída drástica de los valores inicialmente medidos en las bolas de vidrio limpias con respecto a los obtenidos tras ser recubiertas con el soporte de inmovilización, ya sea solo o con la enzima. Esto indica una elevada eficacia en cuanto al proceso de recubrimiento de las bolas de vidrio.

También debe ser considerado que sólo en las muestras obtenidas tras un proceso de inmovilización con la enzima HRPc, se pudo detectar la presencia de nitrógeno, lo cual puso de manifiesto la existencia de la enzima inmovilizada sobre nuestros soportes de inmovilización. De estos resultados no podemos, tampoco, sacar conclusiones cuantitativas, puesto que para el análisis cuantitativo de nitrógeno debió ser empleado un voltaje de 10 Kv, y se puso de manifiesto que los registros obtenidos a este voltaje fueron sensiblemente diferentes a los obtenidos a un valor de 20 Kv, que es el habitualmente utilizado en los ensayos anteriores.

Las imágenes de nuestras preparaciones, obtenidas en el microscopio electrónico de barrido se muestran en las Figuras 3.8 y 3.9. Un aspecto a destacar es la gran extensión en que el recubrimiento de las bolas de vidrio ha tenido lugar. Del mismo modo se mencionará la estructura polimérica, fibrosa y altamente entrelazada de las preparaciones finales, tal y como se desprende de las micrografías realizadas a 10 Kv.

En muestras preparadas utilizando otros soportes de inmovilización, como el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, se obtuvieron unas imágenes y conclusiones similares a las aquí redactadas para el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Para los elementos utilizados para el estudio de la evolución del proceso de recubrimiento de las bolas de vidrio, los valores obtenidos para los parámetros de corrección de la intensidad de los efectos inter-elementos y corrección estándar se encuentran dentro del intervalo considerado como aceptable para la realización del análisis. Del mismo modo, el error estadístico registrado en todos ellos fue muy pequeño e inferior al 1%. Para carbono y oxígeno, los citados parámetros estuvieron fuera del rango admitido y el error estadístico, aunque pequeño, fue superior al mostrado por los otros elementos. Este dato vuelve a apoyar las observaciones inicialmente hechas referentes a la no utilización de estos elementos para el estudio aquí realizado.

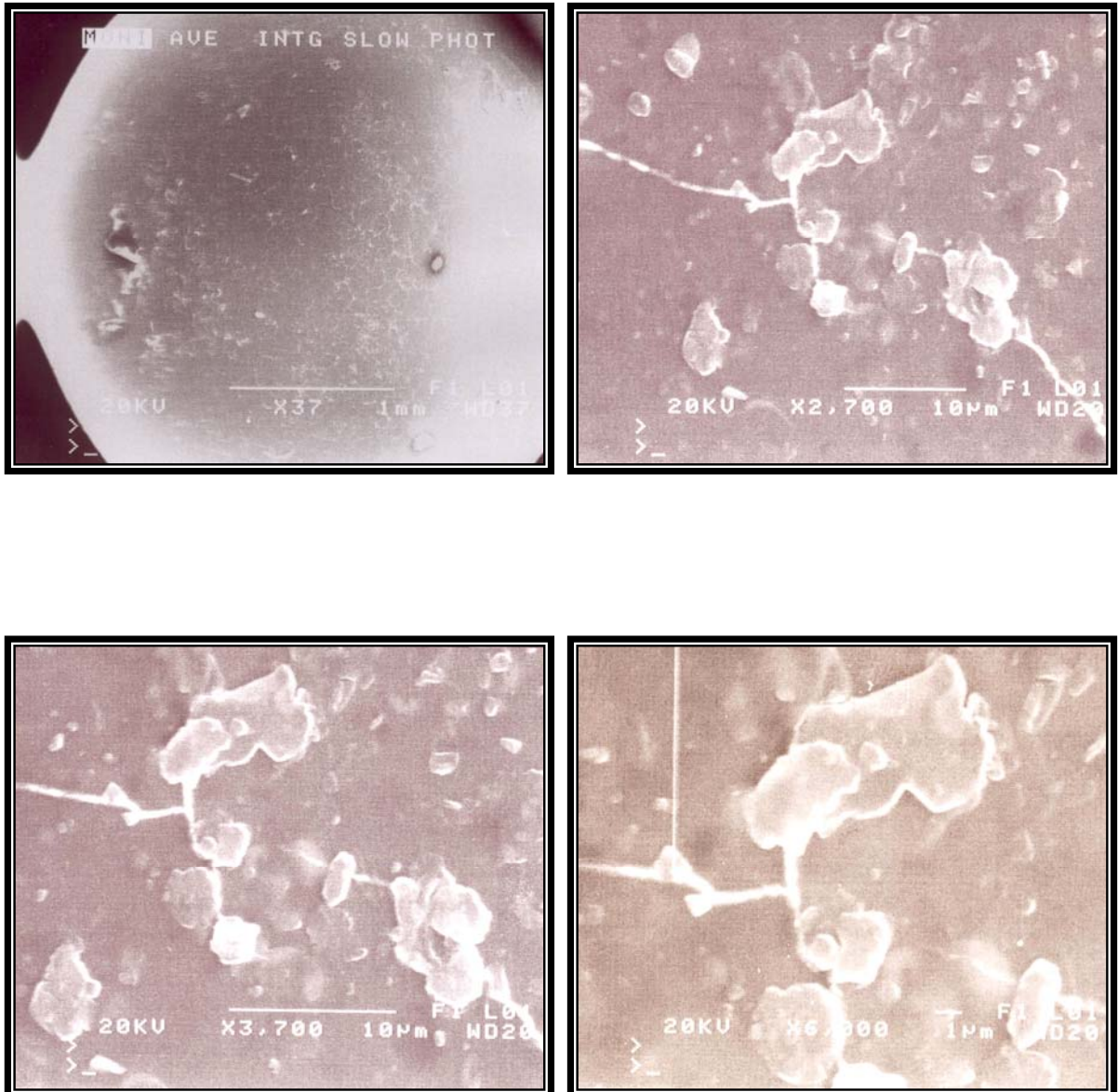


FIGURA 3.8

Bolas de vidrio de 3 mm de diámetro, recubiertas con el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa. Micrografías realizadas a 20 Kv.

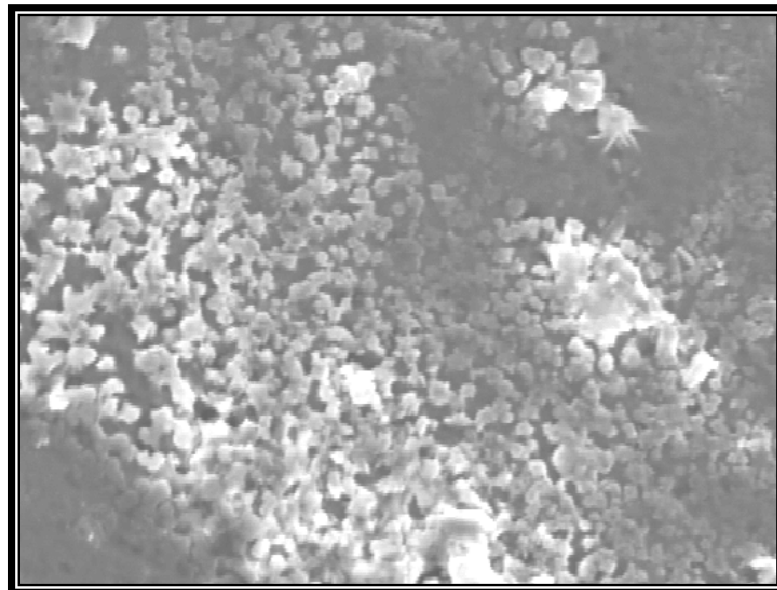
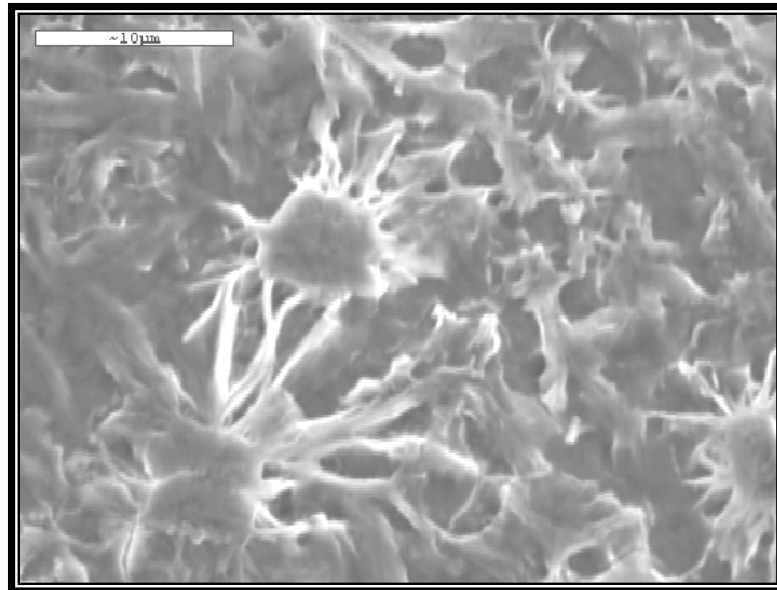


FIGURA 3.9

Bolas de vidrio de 3 mm de diámetro, recubiertas con el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa. Micrografías realizadas a 10 Kv.

3.2.4 Efecto del número de capas de sólido de inmovilización

El objetivo de este ensayo fue comprobar si la preparación del sólido de inmovilización con un número creciente de capas, afectaba de un modo significativo ya sea a la actividad enzimática inicialmente retenida o bien a su estabilidad durante el almacenado. Para garantizar la obtención de unos valores de actividad enzimática inicial elevados y reproducibles, se decidió utilizar, como soportes de inmovilización, los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona y sacarosa.

Para la realización de este ensayo, la deposición de las diferentes capas de sólido de inmovilización fue realizada de dos modos diferentes con la finalidad de verificar los resultados obtenidos. El método de preparación de las bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización fue por evaporación del disolvente.

- (a) En el primero de los casos, se prepararon cuatro fracciones. Una de las fracciones se preparó sin sólido de inmovilización, la segunda fracción con una sola capa de sólido de inmovilización, otra fracción con dos capas y una cuarta fracción con tres capas. La deposición de las diferentes capas de sólido de inmovilización fue realizada del modo indicado en el apartado 2.3.2.2 de Materiales y Métodos. Para este estudio se utilizó el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.
- (b) Para el segundo de los casos, a una jeringuilla se le cortó el extremo inferior, y se le adaptó un trozo de rejilla de fibra de vidrio para que hiciera la función de retención de las bolas de vidrio y además de filtro (Figura 3.10). De este modo se garantizó que el paso de la disolución clorofórmica a través de las bolas de vidrio fuera mucho más rápido. La disolución clorofórmica fue colocada en un tubo de centrifuga y la capa se depositó por inmersión y rápida salida de la jeringuilla que contiene las bolas de vidrio en el tubo de centrifuga que contiene la disolución clorofórmica. Tras cada paso, se deja secar durante veinte minutos, succionando ligeramente mediante el sistema de presión reducida transcurridos diez minutos. Para depositar una capa de sólido de inmovilización se realizaron tres inmersiones de la jeringuilla en la disolución clorofórmica, con un tiempo total de operación de una hora. Tras depositar una capa, se dejó secar durante toda una noche. De la jeringuilla se extrajeron 5 gramos de bolas de vidrio y se irradiaron con luz ultravioleta en las condiciones habituales indicadas en el apartado 2.3.2.2. Finalmente, las bolas de vidrio, ya irradiadas, se colocaron en una jeringuilla nueva con un trozo de rejilla de fibra de vidrio en su parte inferior. Con el resto de las bolas de vidrio, se repitió el proceso una vez más para depositar una segunda capa de sólido de inmovilización y, tras retirar la fracción

correspondiente, con los 5 gramos finales se repitió todo el proceso una tercera vez para obtener la tercera fracción que contenía tres capas de sólido de inmovilización. De este modo, sólo se irradiaron aquellas bolas de vidrio que fueron a constituir una determinada fracción, y, así, todas las bolas de vidrio sólo fueron irradiadas una vez. Para este estudio se utilizó el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Los resultados obtenidos son representados en la Tablas 3.5 y 3.6 para el primero y segundo de los métodos ensayados, respectivamente.

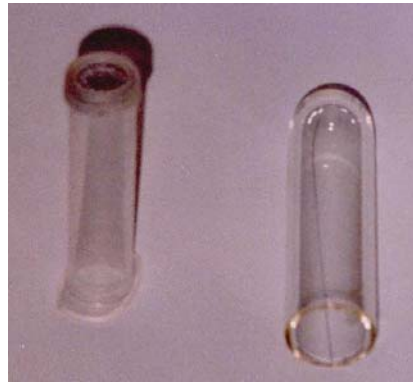


FIGURA 3.10

Tubo de centrífuga y jeringuilla de polipropileno recortada por su extremo inferior y a la que se le ha adaptado un trozo de rejilla de fibra de vidrio.

TABLA 3.5

Efecto del número de capas del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona sobre la actividad enzimática inicialmente retenida.

Nº de capas	V₀
	($\Delta A/min$)
0	0,081
1	0,652
2	0,342
3	0,224

Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona (15 g/L). Número de capas entre 0 y 3. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La medida de actividad se realizó en continuo.

TABLA 3.6

Efecto del número de capas del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa sobre la actividad enzimática inicialmente retenida.

Nº de capas	V₀
	($\Delta A/min$)
1	0,627
2	0,565
3	0,659

Matriz inerte: 5 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de sacarosa (15 g/L). Número de capas entre 0 y 3. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La medida de actividad se realizó en continuo.

Los resultados indican que el tiempo de irradiación tiene un efecto más importante que el número de capas de sólido de inmovilización preparadas. Así, se observa que a mayor tiempo de irradiación menor retención de actividad enzimática (probablemente por el mayor grado de entrecruzamiento alcanzado). En el segundo de los ensayos

realizados, en el que el tiempo de irradiación es similar para las tres fracciones, se observa, que a la concentración de sólido de inmovilización empleada, la deposición de diferente número de capas no afecta a la actividad enzimática inicialmente retenida de forma significativa. La representación gráfica de los datos representados en las tablas anteriores permitió obtener las Figuras 3.11 y 3.12, respectivamente.

Tras el ensayo de actividad enzimática inicial, descrito anteriormente, se pasó al estudio del efecto del número de capas sobre el almacenado de las muestras. Para ello las fracciones fueron almacenadas en agua destilada durante un mes a una temperatura de -18°C . Los resultados de este ensayo son presentados como tanto por cien de actividad residual con respecto a la actividad enzimática que inicialmente presentaba cada jeringuilla, antes de ser almacenada en las condiciones arriba citadas. Los resultados obtenidos para las disoluciones de almacenado muestran que no se libera al medio actividad enzimática tras el tiempo de almacenado indicado (Tablas 3.7 y 3.8).

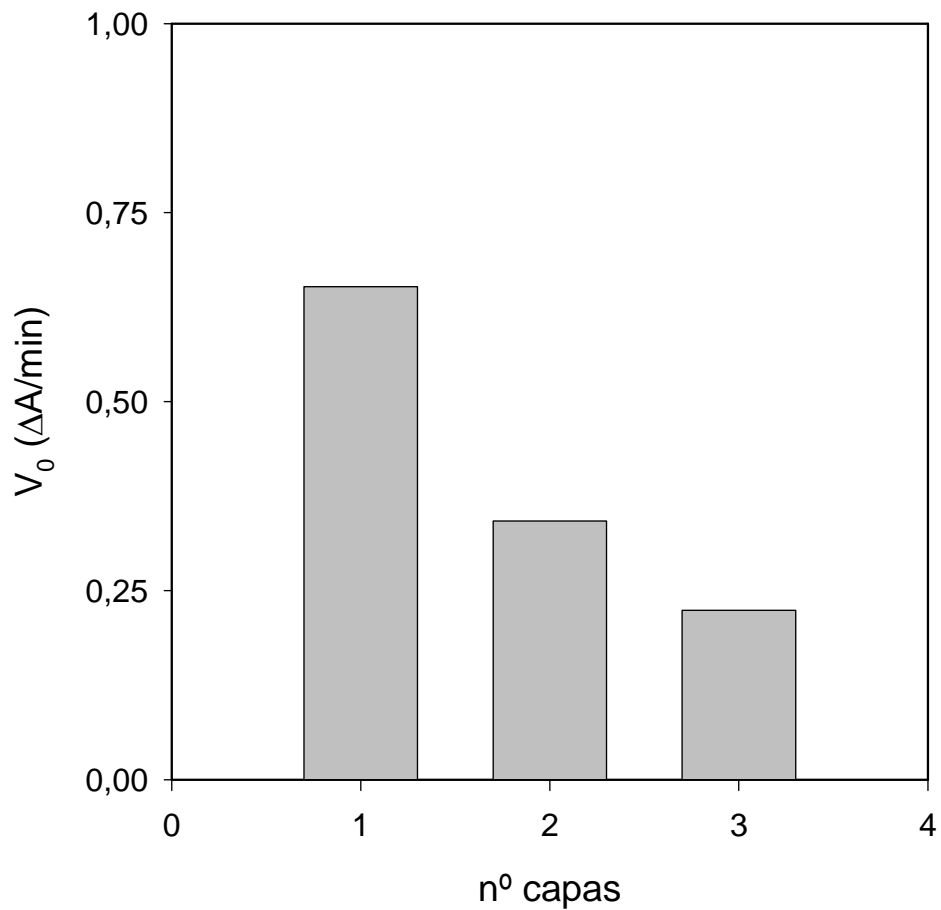
TABLA 3.7

Efecto del número de capas del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona sobre la actividad enzimática retenida tras un mes de almacenado.

Nº de capas	V_0	V_f	R
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
0	0,081	0,000	0
1	0,652	0,102	15,68
2	0,342	0,036	10,61
3	0,224	0,013	5,88

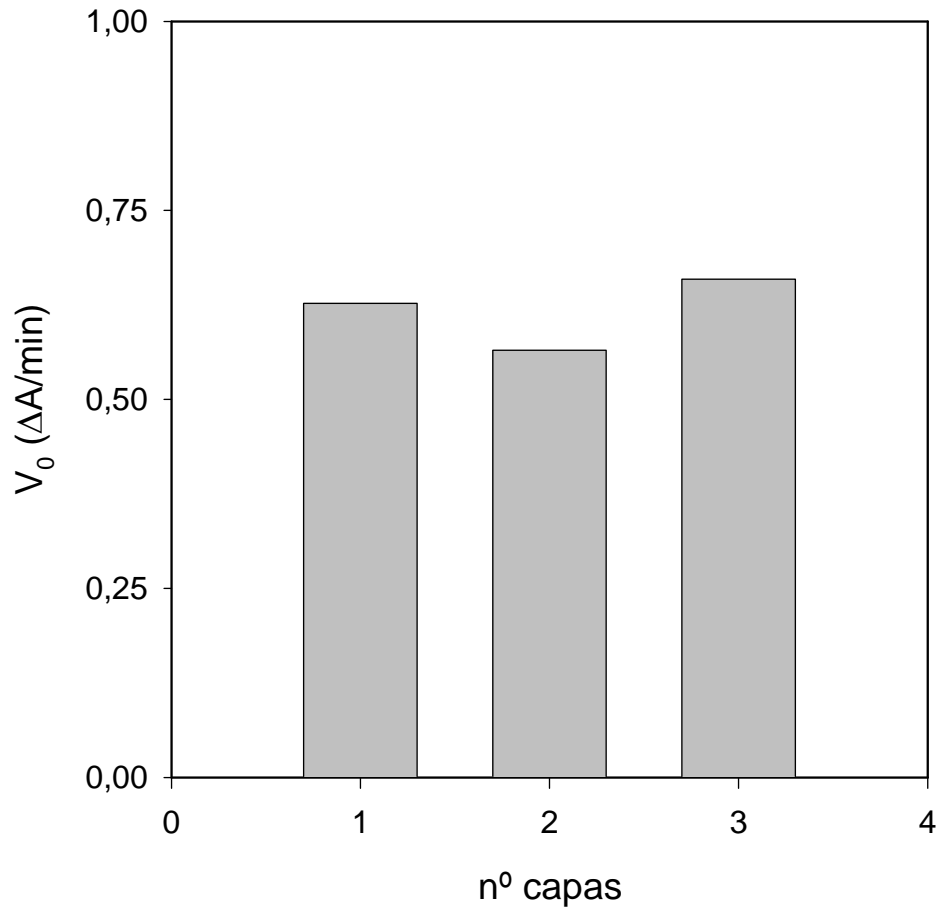
Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona (15 g/L). Número de capas entre 0 y 3. La concentración de HRPc fue de $4,9 \mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre $0-4^{\circ}\text{C}$. Almacenado en agua destilada a una temperatura de -18°C . La medida de actividad enzimática se realizó en continuo en todos los casos. R representa el tanto por ciento de actividad retenida durante el almacenado.

Estos resultados ponen de manifiesto que el tiempo de irradiación no sólo afecta a la actividad enzimática inicialmente retenida sino también a la estabilidad mostrada durante el almacenado. Además, este efecto es más importante al que pudiera mostrar el número de capas.

**FIGURA 3.11**

Efecto del número de capas del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona sobre la actividad enzimática inicialmente retenida.

Representación de la actividad enzimática inicial retenida, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente al número de capas de sólido de inmovilización.

**FIGURA 3.12**

Efecto del número de capas del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa sobre la actividad enzimática inicialmente retenida.

Representación de la actividad enzimática inicial retenida, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente al número de capas de sólido de inmovilización.

TABLA 3.8

Efecto del número de capas del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa sobre la actividad enzimática retenida tras un mes de almacenado.

Nº de capas	V ₀	V _f	R
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
1	0,627	0,114	18,18
2	0,565	0,093	16,46
3	0,659	0,107	16,24

Matriz inerte: 5 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de sacarosa (15 g/L). Número de capas entre 0 y 3. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Almacenado en agua destilada a una temperatura de -18°C. La medida de actividad enzimática se realizó en continuo en todos los casos. R representa el tanto por ciento de actividad retenida durante el almacenado.

Estos resultados ponen de manifiesto que, cuando el tiempo de irradiación fue similar en todas las fracciones, el número de capas depositadas de sólido de inmovilización, tampoco afecta de una manera significativa a la estabilidad mostrada por cada una de las fracciones durante el almacenado.

3.2.5 Efecto del tiempo de irradiación

3.2.5.1 Sobre la actividad inicial retenida y estabilidad frente al almacenado

Para este estudio se emplearon, como sólido de inmovilización, los derivados totalmente cinamoilados de glicerina, D-arabinosa, D-glucosona, sacarosa e inulina y los tiempos de irradiación estuvieron comprendidos entre 0 y 10 minutos. Los resultados obtenidos para todos los sólidos de inmovilización son representados en las Tablas A3.1, 3, 5, 7, 9 y en las Figuras A3.81, 83, 85, 87, 89 del Apéndice y se representan conjuntamente en la Figura 3.13.

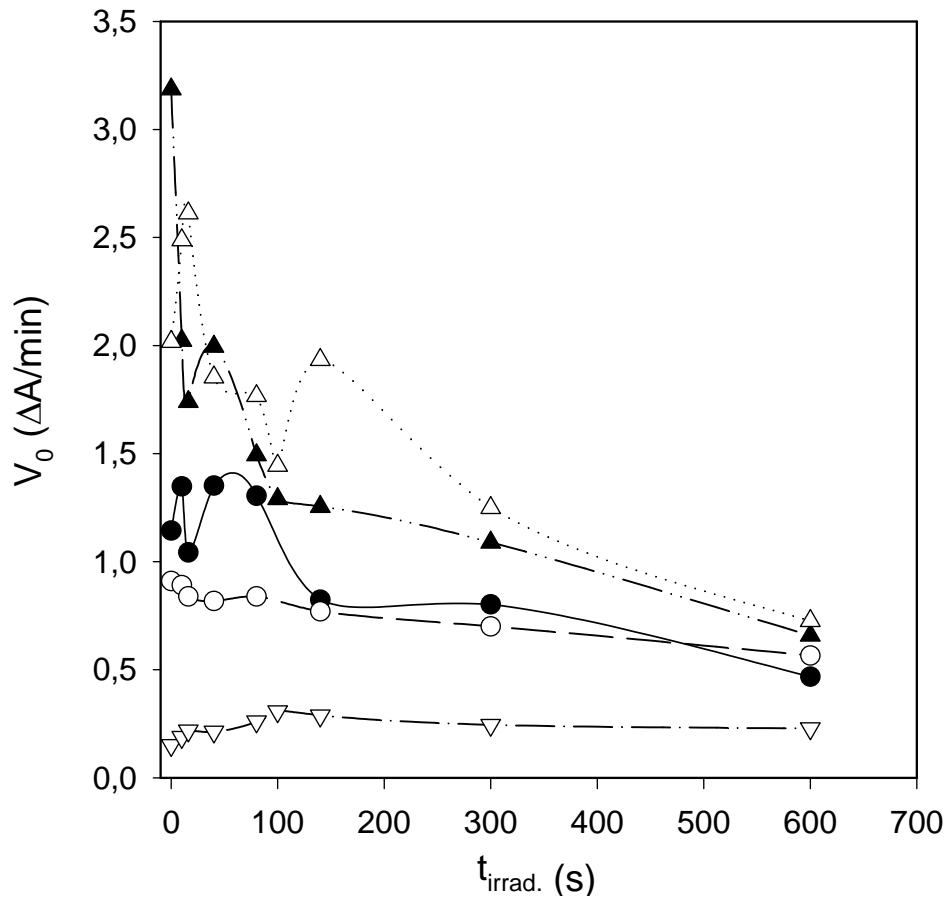


FIGURA 3.13

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por los derivados totalmente cinamoilados de (∇) glicerina, (Δ) D-arabinosa, (λ) D-glucosona, (σ) sacarosa e (O) inulina.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}}$ (s). Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 11,8 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas, y a una temperatura entre 0-4°C. El tiempo de irradiación osciló entre 0-600 segundos. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad enzimática fue medida en continuo.

Tras el ensayo de actividad enzimática inicial, descrito anteriormente, se pasó al estudio del efecto del tiempo de irradiación sobre el almacenado de las muestras. Para ello las fracciones fueron almacenadas en agua destilada durante 33 días a una temperatura de -18°C . Los resultados de este ensayo son presentados como tanto por cien de actividad residual con respecto a la actividad enzimática que inicialmente presentaba cada jeringuilla, antes de ser almacenada en las condiciones arriba citadas. Los resultados obtenidos para las disoluciones de almacenado muestran que no se libera al medio actividad enzimática tras el tiempo de almacenado indicado. Sin embargo para los derivados de inulina, sacarosa y D-arabinosa, cuando los tiempos de irradiación fueron bajos, se observa una cierta liberación de la enzima activa al medio de almacenado, que fue significativamente más importante para los derivados de sacarosa y D-arabinosa. Para tiempos de irradiación superiores a 10 minutos, esta actividad liberada fue imperceptible en todos los casos ensayados. Los datos obtenidos para las diferentes fracciones son representados en las Tablas A3.2, 4, 6, 8, 10 y en las Figuras A3.82, 84, 86, 88, 90. Los resultados obtenidos para todos los sólidos de inmovilización ensayados, son representados conjuntamente en la Figura 3.14.

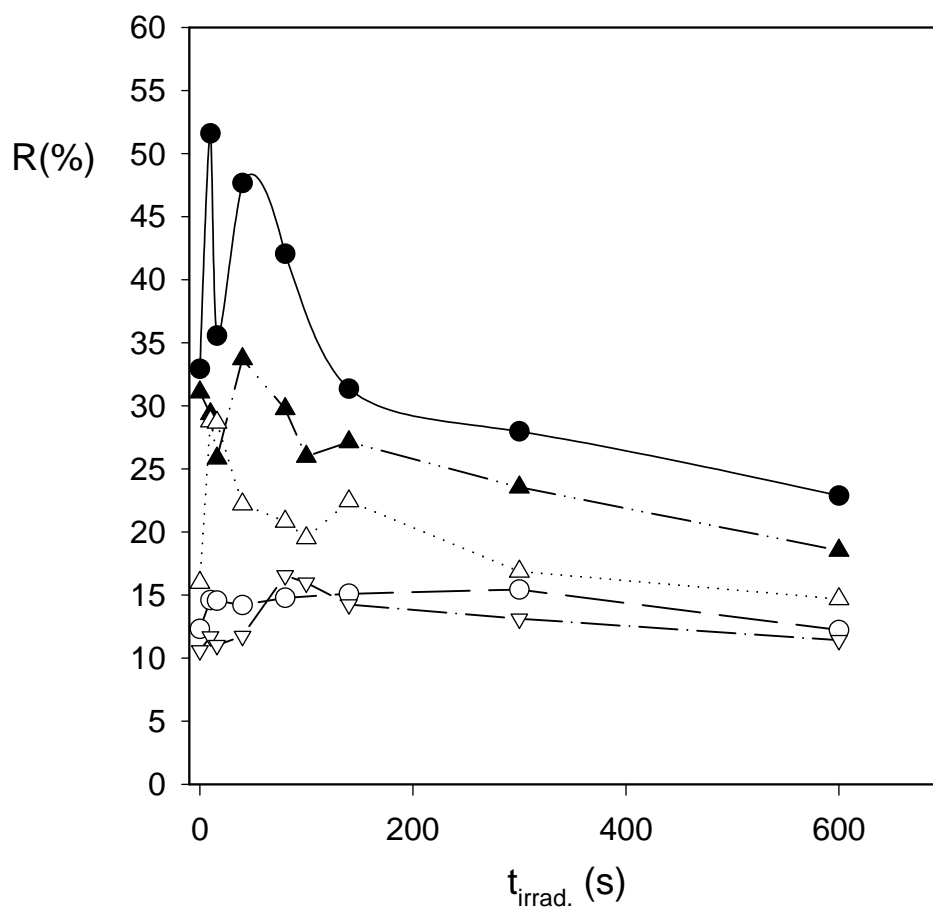


FIGURA 3.14

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por los derivados totalmente cinamoilados de (∇) glicerina, (Δ) D-arabinosa, (λ) D-glucosona, (σ) sacarosa e (O) inulina, tras un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, $R(\%)$, frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}} (s)$. Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue 11,8 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas, y a una temperatura entre 0-4°C. El tiempo de irradiación osciló entre 0-600 segundos. Almacenadas 33 días en agua destilada y a una temperatura de -18°C. En todos los casos las actividades enzimáticas se midieron en continuo.

3.2.5.2 Sobre la densidad de entrecruzamiento

De cada uno de los sólidos de inmovilización ensayados e indicados en el apartado anterior, se preparó una emulsión sobre una cubeta de cuarzo transparente. Para ello se preparó una disolución de dichos soportes en cloroformo, y se añadieron por goteo sobre la cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. Con la evaporación del disolvente se consiguió obtener la película de sólido deseada (Moliner, 1986). Posteriormente, se registraron los espectros de ultravioleta en el intervalo 240 a 340 nm, a distintos tiempos de irradiación (desde 0 hasta 10 minutos), para cada uno de los cinamatos. Los espectros obtenidos son mostrados en las Figuras A3.91, 94, 97, 100, 103.

En estas figuras se puede observar una mayor variación de la absorbancia a 280 nm durante los primeros tiempos de irradiación, mientras que tal variación es mucho menor para tiempos de exposición más largos. Este comportamiento es análogo para todas las muestras, y está en concordancia con los resultados relatados en trabajos anteriores (Moliner, 1986). A partir del valor de absorbancia correspondiente al máximo de absorción, obtenido para una λ de 280 nm, se calcularon los valores de densidad de entrecruzamiento (ρ), o tanto por uno de unidades de monómero entrecruzadas. La densidad de entrecruzamiento, en las condiciones de ensayo utilizadas (intensidad de irradiación constante y soporte transparente), es independiente de la concentración inicial de la muestra (Moliner, 1986), lo que facilitó la preparación de éstas con la garantía de poder ser comparables y reproducibles. Los valores de ρ fueron calculados en base a la siguiente expresión:

$$\rho = 1 - \frac{A_i}{A_0}$$

A_i : Absorbancia a 280 nm a cada tiempo de irradiación

A_0 : Absorbancia a 280 nm en la muestra no irradiada

Los valores de ρ calculados para cada uno de los sólidos ensayados son mostrados en las Tablas A3.11-15.

Como complemento a las gráficas representadas en el apartado anterior, se estudió el efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad enzimática

retenida en primera medida y la estabilidad frente al almacenado. Para ello, se utilizaron los valores de densidad de entrecruzamiento, aquí calculados, para ser representados frente a la actividad enzimática retenida inicialmente y tras un mes de almacenado por cada uno de los sólidos de inmovilización ensayados. Las gráficas obtenidas son representadas en las Figuras A3.92, 95, 98, 101, 104 y en las Figuras A3.106-109.

Las gráficas que se muestran en las Figuras A3.93, 96, 99, 102, 105 en las que se representa la densidad de entrecruzamiento (ρ) frente al logaritmo neperiano del tiempo de irradiación, permitieron obtener la sensibilidad umbral así como la velocidad global de reacción, que determinan la calidad como fotopolímeros de nuestros soportes de inmovilización, a partir de la ordenada en el origen y pendiente de dichas gráficas, respectivamente. Estos datos se muestran en la tabla siguiente.

TABLA 3.9

Valores de sensibilidad umbral (Ordenada en el origen) y velocidad global de reacción (Pendiente) de algunos de nuestros soportes de inmovilización.

Cinamato de:	Ordenada en el origen	Pendiente
Glicerina	0,4673	0,1182
D-arabinosa	0,4503	0,1397
D-glucosona	0,5172	0,1308
Sacarosa	0,4756	0,1143
Inulina	0,3653	0,1029

Los datos obtenidos corroboran los publicados en trabajos anteriores (Moliner, 1986) que indicaban que a menor tamaño molecular los valores a obtener de ambos parámetros deberán ser mayores indicando que la facilidad de polimerización es mayor, debido a que los derivados cinamoilados de menor tamaño molecular obtenidos presentarán menor rigidez estructural y menores impedimentos estéricos, por lo que facilitarán la dimerización de los grupos cinamoílo.

El orden obtenido sólo es roto por el derivado de glicerina que puede ser debido a que el bajo grado de sustitución de grupos cinamoílo que presenta limitará sus posibilidades de dimerización y polimerización.

El dato obtenido para el derivado totalmente cinamoilado de inulina está dentro del mismo orden de magnitud que el obtenido por Moliner (1986), aunque es sensiblemente inferior. No obstante, el resultado aquí obtenido es coherente con lo argumentado referente a la relación entre el tamaño molecular de los derivados cinamoilados estudiados y su facilidad para dimerizar por efecto de la radiación ultravioleta, ya que el derivado de inulina es el de mayor peso molecular de los soportes ensayados y además muestra los valores más bajos de sensibilidad umbral y velocidad global de reacción de los aquí obtenidos.

La consideración conjunta de todos los datos aportados en este apartado, justificaría la utilización de tiempos de irradiación largos (15 minutos) para la preparación general de las muestras durante los diferentes estudios realizados, basándose en las siguientes razones:

1. A pesar que a tiempos cortos de irradiación, los diferentes sólidos de inmovilización ensayados suelen mostrar un máximo de actividad enzimática retenida inicialmente, sin embargo, a tiempos largos se garantiza una muy buena, aunque menor, actividad enzimática retenida. Además, los valores mostrados no se verán afectados de un modo significativo por leves variaciones en el tiempo de irradiación, con lo que se asegura la reproducibilidad de las fracciones preparadas.
2. Salvo para el derivado totalmente cinamoilado de inulina, los demás soportes de inmovilización presentaron un máximo en los valores mostrados de actividad enzimática inicial y/o tanto por cien de actividad retenida tras el almacenado, para un valor de densidad de entrecruzamiento (ρ) comprendido entre 0,4 y 0,6 (Figuras A3.106-109). Para el derivado de sacarosa, este máximo se desplaza hacia el extremo inferior del intervalo de valores de ρ citado debido, quizá, al mayor tamaño molecular del monómero de partida, mientras que para el derivado de D-arabinosa el máximo se desplaza hacia el extremo superior del entorno, posiblemente debido a todo lo contrario. Esto pone de manifiesto la existencia de una densidad de entrecruzamiento óptima para la cual se obtienen los mejores resultados de actividad enzimática (Jayakumari y Rajasekharan-Pillai, 1991). Para el derivado de inulina, no se observa este máximo, posiblemente debido al grado de entrecruzamiento a esperar de este soporte en base a los valores de sensibilidad umbral y velocidad global de reacción arriba obtenidos.
3. Salvo para los derivados de sacarosa e inulina, la irradiación inicial genera un prepolímero de mayor tamaño molecular que el monómero inicial, formado por la

unión de unas pocas moléculas de monómero, en el cual el número de entrecruzamientos intracatenarios será despreciable. Este prepolímero será más insoluble en agua que el sólido inicial por lo que se evitará la pérdida de actividad enzimática por solubilización del soporte en el medio de reacción. Este hecho será reponsable del inicial aumento de actividad enzimática observado, y el punto final de este aumento puede considerarse como el inicio del estudio realizado.

4. Utilizando tiempos largos de irradiación se evita la liberación de la enzima inicialmente retenida al medio de almacenado, que en algunos casos, como ha sido nombrado para los derivados totalmente cinamoilados de sacarosa y D-arabinosa, supone una pérdida significativa de la enzima que afecta negativamente a la estabilidad de las muestras preparadas frente al tiempo de almacenado.
5. Con tiempos de irradiación superiores a 10 minutos se garantiza una buena formación de la película del sólido de inmovilización alrededor de las bolas de vidrio, por entrecruzamiento de las cadenas de monómero iniciales entorno a dicha matriz inerte. De esta manera se evita el deterioro, rotura o simplemente salida de monómeros no entrecruzados tanto al medio de ensayo como al de almacenado, con la consiguiente pérdida de las ventajas proporcionadas por el proceso de inmovilización.

3.3 APLICACIÓN DE SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE β -GALACTOSIDASA

3.3.1 Soporte sobre matrices inertes

Con la finalidad de extender nuestros sólidos de inmovilización a otras proteínas, se intentó realizar la inmovilización de β -galactosidasa en las mismas condiciones que como hasta ahora se había estado realizando para HRPc. Para este estudio se utilizó el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona (15 g/L) como sólido de inmovilización y se depositó sobre bolas de vidrio de 3 mm de diámetro como matriz inerte. La enzima tuvo una concentración en el medio de inmovilización de 14,9 U/mL y ésta se desarrolló durante 21 horas a una temperatura entre 0-4°C.

Después de lavar las muestras según el procedimiento 4.A descrito en el apartado 2.5.1, la actividad se determinó de forma continua. En ninguna de las fracciones ensayadas, se detectó actividad enzimática. Este resultado puede ser debido a la poca cantidad de sólido de inmovilización con la que quedan recubiertas las bolas de vidrio utilizadas en este ensayo, así como la pequeña actividad enzimática que muestra la

enzima β -galactosidasa en comparación con la presentada por HRPc a las concentraciones de ensayo respectivas utilizadas.

3.3.2 Soporte como sólido de inmovilización convenientemente pulverizado

Con el fin de observar actividad enzimática en inmovilizados de β -galactosidasa se recurrió al empleo de nuestros soportes en forma de sólido pulverizado para garantizar una mayor masa de soporte de inmovilización. Para estos estudios se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado totalmente cinamoilado de alcohol polivinílico (PVA) entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona y cloroformo como disolvente. La actividad enzimática en ambos inmovilizados, así como en el medio de almacenado fue determinada en discontinuo y los resultados se observan en la Tabla 3.10.

TABLA 3.10

Actividad enzimática de β -galactosidasa inmovilizada sobre sólido pulverizado.

Fracción	$m_{\text{sólido}}$	[E]	[ONF] ₀	Almacenado ^a
	(g)	(U/mL)	(mM)	($\Delta A/mL$)
1	0,5	52,84	0,48	0,000
2	1,0	63,01	1,05	0,000

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado totalmente cinamoilado de alcohol polivinílico (PVA) con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados. La inmovilización de β -galactosidasa (30 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 93 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 1 descrito en el apartado 2.5.2. Se realizó un almacenado previo en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) durante 12 horas a una temperatura entre 0-4°C. (a) Actividad enzimática medida en el medio de almacenado.

El uso de sólido pulverizado como soporte de inmovilización de β -galactosidasa mostró unos resultados óptimos como se muestran en la tabla anterior y confirman la necesidad de una gran cantidad de soporte para la obtención de unos resultados apreciables. Además, se comprueba que existe una proporcionalidad entre la masa de soporte empleada y el valor de absorbancia obtenido a 420 nm, lo que demuestra la reproducibilidad del método aquí empleado.

3.4 PROCEDIMIENTOS DE LAVADO PARA HRPc INMOVILIZADA

3.4.1 Enzima retenida por adsorción física

Cuando se quiso ensayar la actividad enzimática retenida por adsorción física, las fracciones fueron lavadas mediante el lavado 4.A mostrado en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos. El dispositivo de lavado empleado es el indicado en este mismo apartado. Este sistema de lavado mostró ser muy efectivo tal y como se pudo comprobar en diferentes ensayos en los cuales se observó que la actividad enzimática liberada a las fracciones finales de lavado e intermedias de almacenado, es despreciable o nula (Tablas 3.13, 3.16, 3.17 y 3.18). Además, se comprobó que procedimientos realizados en condiciones similares pero empleando tiempos de lavados superiores no permitieron liberar más actividad enzimática a las fracciones finales de lavado. Así, los valores de actividad enzimática obtenidos en las fracciones finales obtenidas en los lavados del tipo 4, son incluso inferiores a las medidas en las correspondientes fracciones obtenidas en los lavados 1, 2.A, 2.B, 3.A y 3.B, los cuales se caracterizan por ser más prolongados e intensos.

Para comprobar la naturaleza de la adsorción física responsable de la retención de la enzima sobre los sólidos de inmovilización empleados, se diseñaron diferentes métodos para liberar la enzima, empleando en cada caso diferentes agentes capaces, potencialmente, de extraerla, según se hace constar en la bibliografía. Así, se emplearon agentes liberadores de la enzima durante el lavado de cada fracción, tales como: (a) gradiente de concentración de NaCl comprendido entre 0,25 y 2 M; (b) empleo de agentes humectantes, por ejemplo, una disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1); (c) uso de detergentes como Tritón X-100, Tritón X-114 y SDS. Se buscará un detergente que libere el máximo posible de enzima adsorbida, y otro que haga que la enzima liberada lo sea en las mejores condiciones posibles tal que aunque se libere poca, ésta sea lo más activa posible. Con el primero intentaremos eliminar la enzima adsorbida, para ver si un sólido retiene enzima activa mediante enlace covalente. Con el segundo podremos hacer ensayos de desnaturalización de la enzima inmovilizada con urea, etc. y posterior replegamiento y liberación al medio, activa; y (d) empleo de una disolución acuosa 0,63 M de H_3BO_3 . Por otra parte, se pretendió liberar la enzima inmovilizando con el agente liberador de ésta y para ello se empleó una disolución de metanol al 50% en el tampón de inmovilización usado. Finalmente, también se intentó lavar nuestros soportes almacenando con una disolución acuosa 0,5 M de metil- α -D-manopiranosido.

3.4.1.1 Gradiente de concentración de NaCl

Este ensayo se realizó para comprobar si la utilización de un gradiente salino durante el lavado de las fracciones, permitía la liberación al medio de lavado de la enzima inicialmente retenida por adsorción física. Para ello fueron varios los sólidos empleados. Se empleó el derivado de inulina cinamoilado un 41% así como el formado por el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona y el derivado de inulina antes citado, mezclados al 50%. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.11.

TABLA 3.11

Efecto del lavado con una gradiente de concentración de NaCl sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada.

Cinamato de:	Lavado	NaCl	V_r (%)
Inulina (41%) + D-glucosona al 50%	2.A	NO	100
	2.B	SI	72,73
Inulina (41%)	3.A	NO	100
	3.B	SI	90,25

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Fracción 1: Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 41% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona (2,9 g/L). Fracción 2: Soporte de inmovilización: Derivado de inulina cinamoilado un 41% (2,9 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 µg/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 22 (Fracción 1) ó 20 horas (Fracción 2) y a una temperatura entre 0-4°C. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo. V_r representa el tanto por cien de actividad enzimática medida con respecto a la presente en los inmovilizados lavados sin gradiente de NaCl.

En los ensayos realizados con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona y el derivado de inulina cinamoilado un 41%, mezclados al 50% como sólido de inmovilización, aunque los resultados finales obtenidos son apreciablemente diferentes, sin embargo, en las fracciones intermedias de lavado no aparece más actividad enzimática liberada en aquellas en que se utilizó un gradiente salino. Por otro lado, en las fracciones en que se empleó el derivado de inulina cinamoilado un 41%, los resultados finales obtenidos son similares independientemente de la utilización de un gradiente salino o no durante el lavado. Asimismo, las fracciones intermedias en ambos

procedimientos de lavado presentan valores similares de actividad enzimática liberada durante el desarrollo de éste. Además, en cualquiera de los casos, los blancos mostrados por los medios de reacción fuera del contacto con los inmovilizados, son despreciables. En conjunto parece que el lavado con un gradiente de concentración de NaCl no es más efectivo que el lavado sólo con agua destilada fría.

La diferencia en los valores finales mostrados en algunas fracciones, puede deberse a la elevada fuerza iónica a que es sometida la enzima durante las fracciones intermedias de almacenado en presencia de disolución salina, que podría ser responsable de la inactivación de la enzima. Este efecto es más notorio en la Fracción 1 donde la presencia del derivado de D-glucosona proporciona un mayor carácter polar al soporte de inmovilización preparado y por lo tanto permitirá una mejor accesibilidad por parte del medio de lavado, altamente polar.

3.4.1.2 Almacenado con una disolución acuosa de metil- α -D-manopiranosido

Este ensayo se realiza para comprobar si la utilización de una disolución acuosa 0,5 M de metil- α -D-manopiranosido durante el almacenado de las fracciones, permitía la liberación al medio de almacenado de la enzima inicialmente retenida por adsorción física. Los sólidos empleados para ello son los mismos que se emplearon en el apartado anterior. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.12.

Los resultados obtenidos muestran que no se libera actividad enzimática al medio de almacenado. Además, los porcentajes de retención tras el almacenado, no muestran diferencias significativas entre las muestras almacenadas con o sin metil- α -D-manopiranosido. Esto demuestra que, en este caso, el empleo de metil- α -D-manopiranosido no es eficaz para liberar la enzima del sólido de inmovilización. En realidad, metil- α -D-manopiranosido es específico para interacciones de restos de manosa presentes en la parte hidrocarbonada de glucoproteínas como HRPc, con los restos funcionales de concanavalina-A.

Aquí se observa, además, que el porcentaje de retención, en las fracciones que fueron almacenadas tras el ensayo de actividad enzimática inicial, es superior al de aquellas obtenidas en fracciones inmovilizadas a pH 6,0 y mostradas en la Tabla 3.4. Además, parece que el pH al que se almacenan las fracciones también juega un papel determinante en la actividad finalmente medida.

TABLA 3.12

Efecto del almacenado con metil- α -D-manopiranosido sobre la actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada.

Cinamato de:	Lavado	V ₀ ($\Delta A/min$)	V _f ($\Delta A/min$)	R (%)
Inulina (41%) + D-glucosona al 50% (1)	1	0,652	0,288	44,17
Inulina (41%) (2)	3.A	0,677	0,229	33,83
Inulina (41%) (3)	3.B	0,611	0,295	48,28
Inulina (41%) (4)	1	0,707	0,283	40,03

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 2,9 g/L. La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 20 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Fracciones almacenadas en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0) (2) o tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 8,0) (3) durante 2 días a una temperatura de -18°C, o en una disolución acuosa 0,5 M de metil- α -D-manopiranosido (1 y 4) durante 13 horas a una temperatura entre 0-4°C. En todos los casos, la actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo. La actividad enzimática del medio de almacenado se midió en continuo. R representa el tanto por ciento de actividad retenida durante el almacenado.

3.4.1.3 Empleo de agentes humectantes

Este ensayo se realiza para comprobar si la utilización de una disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante el lavado de las fracciones, permitía la liberación al medio de lavado de la enzima inicialmente retenida por adsorción física. El procedimiento de lavado de las muestras fue diferente en cada preparación y corresponde a los lavados 4.A-D descritos en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos. Durante el lavado, algunas fracciones intermedias se almacenan con 5 mL de una disolución de glicerina al 50% en tampón de inmovilización. En el lavado 4.A no se emplea la disolución de glicerina. En los siguientes sí se emplea, y se diferencian en la intensidad con la que es utilizada la glicerina durante estos lavados. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.13.

Los resultados muestran que las fracciones finales de lavado e intermedias de almacenado no presentan actividad enzimática libre ninguna. Además, todas las fracciones ensayadas muestran unos valores de actividad enzimática inicial muy similares, independientemente del lavado realizado, así como que los blancos mostrados por las jeringuillas son despreciables en todas las fracciones. Estos resultados indican

que la utilización de una disolución de glicerina al 50% en tampón de inmovilización no es útil para liberar a la enzima.

TABLA 3.13

Efecto del lavado con glicerina sobre la actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada.

Lavado	H ₂ O _e ^{f a}	Almacenado1 ^b	Almacenado2 ^b	Almacenado3 ^b	V ₀
	($\Delta A/\text{min.mL}$)	($\Delta A/\text{min.mL}$)	($\Delta A/\text{min.mL}$)	($\Delta A/\text{min.mL}$)	($\Delta A/\text{min}$)
4.A	0,003	-----	-----	-----	0,478
4.B	0,001	0,002	-----	-----	0,419
4.C	0,000	0,002	0,000	-----	0,496
4.D	0,000	0,002	0,000	0,000	0,320

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 10 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,9 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 20 horas y a una temperatura entre 0-4°C. (a) Fracción final de lavado. (b) Fracciones intermedias de almacenado (disolución de glicerina al 50% en tampón de inmovilización). La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo y la actividad enzimática de las fracciones intermedias de almacenado y final de lavado se ensayaron en continuo.

Además, este ensayo pone de manifiesto la eficacia del lavado 4.A para liberar la enzima débilmente retenida, puesto que lavados más prolongados no consiguen sacar mayores valores de actividad enzimática en las correspondientes fracciones de lavado, y también, los valores de actividad enzimática final retenida sobre las bolas de vidrio no muestran cambios significativos.

3.4.1.4 Empleo de una disolución acuosa de H₃BO₃

Este ensayo se realiza para comprobar si la utilización de una disolución acuosa 0,63 M de H₃BO₃ durante el lavado de las fracciones, permitía la liberación al medio de lavado de la enzima inicialmente retenida por adsorción física. Tras el almacenado y lavado, se llenó la jeringuilla con una disolución acuosa 0,63 M de H₃BO₃ e inmediatamente después se recogió seis fracciones de aproximadamente 1 mL cada una en sendos Eppendorf. La jeringuilla se volvió a llenar con la disolución arriba citada y se almacenó durante una hora más. Finalmente, esta fracción de almacenado se recogió,

junto con las anteriores, para el ensayo de su actividad enzimática. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.14.

Los resultados obtenidos muestran que la actividad enzimática presente en el medio de almacenado y en la fracción final del lavado (antes y después del almacenado) es despreciable en ambos casos. Además, todas las fracciones de lavado con la disolución acuosa 0,63 M de H_3BO_3 muestran la ausencia completa de actividad enzimática libre. Este dato viene apoyado por el alto rendimiento mostrado por el sólido de inmovilización tras el almacenado que no habría sido posible obtener si la disolución de lavado utilizada hubiera extraído la enzima inicialmente retenida. Por todo ello parece poderse concluir que el uso de la disolución acuosa 0,63 M de H_3BO_3 no resulta eficaz para liberar la enzima retenida por el sólido de inmovilización por medio de adsorción física. Además, el porcentaje de retención final de actividad enzimática obtenido, viene a corroborar lo dicho en el apartado 3.4.1.2 de esta sección con respecto a que la actividad enzimática mostrada, tras el almacenado, por fracciones preparadas a pH 9,1 es superior a la mostrada por aquellas preparadas a pH 6,0.

TABLA 3.14

Efecto del lavado con H_3BO_3 sobre la actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada.

$t_{inmov.}$	$H_2O_e^{f a}$	Almacenado ^b	V_0	V_f	R
(h)	($\Delta A/min.mL$)	($\Delta A/min.mL$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
21	0,004	0,004	0,934	0,465	49,79

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,9 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu g/mL$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado previo 1 descrito en el apartado 2.5.1. Almacenado en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0) durante un tiempo de 42 días y a una temperatura de -18°C. En todos los casos, la actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones finales de lavado, del medio de almacenado y de las fracciones intermedias de almacenado con H_3BO_3 se ensayaron en continuo. (a) Fracción final de lavado previo a la medida de la actividad enzimática inicial. (b) Actividad enzimática liberada al medio de almacenado.

3.4.1.5 Inmovilización en presencia de metanol

Ante la poca efectividad de los métodos anteriormente utilizados para la liberación de la enzima, indujo a pensar que la adsorción producida tuviera lugar mediante intensas fuerzas hidrofóbicas, y condujo a la utilización de un tipo diferente de agentes liberadores de la enzima. Así, y en primer lugar, se usaron diferentes alcoholes capaces de interferir en la formación de tales interacciones entre el sólido de inmovilización empleado y la enzima. Este ensayo se realiza para comprobar si la utilización de metanol al 50% durante el proceso de inmovilización afectaba o no a la actividad enzimática retenida por los sólidos de inmovilización. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.15.

Los resultados finales mostrados por las fracciones indicadas en la tabla, muestran que aquella fracción en que no se utilizó metanol en el medio de inmovilización retiene inicialmente mayor cantidad de actividad enzimática cuando se compara con la que sí empleó este alcohol. Sin embargo este hecho podría ser debido a una ligera inactivación de la enzima debido a la presencia de metanol durante la inmovilización.

TABLA 3.15

Efecto de la inmovilización en presencia de metanol sobre la actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada.

Medio de inmovilización	H ₂ O _e ^{f a}	V ₀	Blanco ^b
	($\Delta A/min.mL$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)
Habitual	0,004	0,934	0,048
Metanol al 50%	0,024	0,770	0,303

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,9 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 μ g/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) o en una disolución de metanol al 50% en el tampón de inmovilización anterior durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 1 descrito en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones intermedias de lavado se ensayaron en continuo. (a) Fracción final de lavado. (b) Blanco mostrado por las jeringuillas tras el ensayo de actividad enzimática inicial.

Los resultados de las fracciones intermedias de lavado muestran que aquella en que se utilizó metanol durante la inmovilización libera mayor cantidad de enzima durante el lavado lo cual puede ser debido a que el alcohol facilita que se libere más fácilmente.

Por su parte, la fracción en que no se utiliza metanol durante la inmovilización muestra actividad enzimática despreciable en las fracciones intermedias de lavado. Además es importante resaltar los valores de los blancos mostrados por las muestras tras el ensayo de actividad enzimática inicial.

Por lo tanto y a la vista de los resultados obtenidos parece poderse concluir que aunque no de una manera importante, la utilización de metanol y probablemente de otro tipo de alcoholes durante la inmovilización disminuye la retención de actividad enzimática mostrada por los sólidos de inmovilización empleados en este trabajo.

3.4.1.6 Uso de detergentes para el lavado de la enzima inmovilizada

Para profundizar en la comprobación de si intensas fuerzas hidrofóbicas eran responsables de la retención de la enzima sobre los sólidos de inmovilización empleados, se ensayaron diferentes detergentes para intentar liberar la enzima inicialmente retenida durante el lavado de las fracciones preparadas. Se buscó un detergente que liberara el máximo posible de enzima adsorbida y otro que haga que la enzima liberada lo sea en las mejores condiciones posibles tal que aunque se libere poca, mostrara elevada actividad. Con el primero se intentaría eliminar la enzima adsorbida, para ver si alguno de los sólidos estudiados retiene enzima activa mediante la formación de enlaces covalentes. Con el segundo se podrán hacer ensayos de desnaturalización de la enzima inmovilizada con urea, etc., y, posterior replegamiento y liberación al medio, activa.

Tritón X-114

Este ensayo se realiza para comprobar si la utilización de Tritón X-114 durante el lavado de las fracciones, permitía la liberación al medio de lavado de la enzima inicialmente retenida por adsorción física. Fue diferente en cada preparación y corresponde a los lavados 5.A-C descritos en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos. Durante el lavado, algunas fracciones intermedias se almacenan con 5 mL de una disolución acuosa de Tritón X-114 al 1,5%. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.16.

Los resultados muestran que los almacenados con detergente se muestran especialmente efectivos pues sólo es preciso un almacenado para liberar prácticamente toda la enzima retenida por el sólido de inmovilización. En los siguientes almacenados con detergente, la actividad enzimática liberada es nula, así como en las fracciones intermedias de lavado en las que sólo agua destilada fue utilizada. Además, tras el almacenado, la actividad enzimática mostrada por las jeringuillas es despreciable en

todos los casos. Sin embargo la actividad enzimática presente en el medio de almacenado no es demasiado elevada, no superando el 40% de la inicialmente presente en las bolas de vidrio, como se desprende de los cálculos realizados a la primera fracción.

TABLA 3.16

Efecto del lavado con Tritón X-114 sobre la actividad enzimática retenida por HRPC inmovilizada.

Fracc.	H ₂ O _{e1} ^a	Almacenado1 ^b	Almacenado2 ^b	V ₀	V _f	R
	($\Delta A/min.mL$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
1	0,002	0,165 ^c	-----	0,456	0,006	1,32
2	-----	0,468	-----	-----	0,020	4,10
3	-----	0,549	0,000	-----	0,012	2,14

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,9 g/L). La concentración de HRPC fue de 19,6 μ g/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 12 horas y a una temperatura entre 0-4°C. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones intermedias de lavado y de almacenado se ensayaron en continuo. (a) Fracción intermedia de lavado tras un lavado de tipo 4.A. (b) Fracciones intermedias de almacenado con detergente (disolución acuosa de Tritón X-114 al 1,5%). (c) El tiempo de almacenado fue de 160 minutos.

La eficacia de los lavados realizados viene también corroborada por el hecho que los blancos mostrados por nuestros inmovilizados fue nulo en todas las fracciones preparadas. Del mismo modo, la actividad enzimática presente en la fracción final de lavado fue nula en todas las muestras. Previamente se verificó que el detergente no oxida al ABTS haciendo un ensayo en blanco del modo indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos para la enzima liberada a las aguas de lavado, utilizando para ello 1 mL de la disolución acuosa del detergente.

Tritón X-100

Este ensayo se realiza para comprobar si la utilización de Tritón X-100 durante el lavado de las fracciones, permitía la liberación al medio de lavado de la enzima inicialmente retenida por adsorción física. Fue diferente en cada preparación y corresponde a los lavados 5.A-C descritos en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos.

Durante el lavado, algunas fracciones intermedias se almacenan con 5 mL de una disolución acuosa de Tritón X-100 al 1,5%. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.17.

TABLA 3.17

Efecto del lavado con Tritón X-100 sobre la actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada.

Fracc.	H ₂ O _{e1} ^a	Almacenado1 ^b	Almacenado2 ^b	V ₀	V _f	R
	($\Delta A/min.mL$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
1	0,002	0,318	-----	0,545	0,117	21,47
2	-----	0,606	-----	-----	0,104	14,65
3	-----	0,678	0,012	-----	0,042	5,74

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,9 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 μ g/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 16 horas y a una temperatura entre 0-4°C. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones intermedias de lavado y de almacenado se ensayaron en continuo. (a) Fracción intermedia de lavado tras un lavado de tipo 4.A. (b) Fracciones intermedias de almacenado con detergente (disolución acuosa de Tritón X-100 al 1,5%).

Los resultados indican que los almacenados con este detergente se muestran, también, especialmente efectivos ya que después del primer almacenado con detergente, en los siguientes almacenados, la actividad enzimática liberada es muy baja, o nula, así como en las fracciones intermedias de lavado en las que sólo agua destilada fue utilizada. Sin embargo, tras el almacenado, la actividad enzimática mostrada por las jeringuillas es importante en todos los casos. En la primera fracción ensayada, de la actividad enzimática inicialmente presente, el almacenado libera aproximadamente el 59%, mientras que en los soportes queda casi el 22%, sumando ambas cantidades el 81% de la actividad inicialmente medida. Así, aunque en los soportes queda más actividad enzimática que al usar Tritón X-114, sin embargo la actividad enzimática mostrada por la enzima liberada es superior. El resultado parece poner de manifiesto que Tritón X-100 es peor detergente para extraer la enzima adsorbida, pero es más suave: libera menos enzima pero la liberada es más activa. Sin embargo, con un lavado más prolongado como el 5.C realizado para la tercera fracción, puede conseguirse que la

actividad enzimática que quede retenida sobre las bolas de vidrio sea tan baja como la conseguida tras emplear Tritón X-114.

La actividad enzimática total en la primera fracción ensayada en el inmovilizado es inferior a la mostrada por las dos fracciones siguientes en el medio de almacenado. Este hecho también puede observarse en los resultados mostrados en la Tabla 3.16 del apartado anterior. Esto puede indicar una modificación de algún parámetro cinético de la enzima por el sustrato o bien una peor accesibilidad de los sustratos al centro activo de la enzima al estar inmovilizada en comparación a estar soluble.

La eficacia de los lavados realizados viene también corroborada por el hecho que los blancos mostrados por nuestros inmovilizados fueron nulos en todas las fracciones preparadas. Del mismo modo, la actividad enzimática presente en la fracción final de lavado fue nula en todas las muestras.

Al igual que para Tritón X-114, se comprobó que el detergente no oxida al ABTS realizando un ensayo en blanco del modo indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos para la enzima liberada a las aguas de lavado, utilizando para ello 1 mL de la disolución acuosa del detergente.

SDS

Este ensayo se realiza para comprobar si la utilización de SDS durante el lavado de las fracciones, permitía la liberación al medio de lavado de la enzima inicialmente retenida por adsorción física. Fue diferente en cada preparación y corresponde a los lavados 5.A-C descritos en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos. Durante el lavado, algunas fracciones intermedias se almacenan con 5 mL de una disolución acuosa de SDS al 1,5%. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 3.18.

Los resultados indican que los almacenados con SDS se muestran, también, efectivos ya que después del primer almacenado con detergente, en los siguientes almacenados, la actividad enzimática liberada es nula, así como en las fracciones intermedias de lavado en las que sólo agua destilada fue utilizada. Sin embargo, la actividad enzimática mostrada por las fracciones de almacenado en detergente así como la que quedó sobre las bolas de vidrio tras el almacenado, son muy bajas en ambos casos. Así, en la primera de las fracciones ensayadas, de la inicialmente presente sobre las bolas de vidrio, el detergente sólo libera aproximadamente el 3%, mientras que en las bolas quedó retenido casi el 5%. Por lo tanto, el detergente, al menos en esta fracción, parece actuar a fondo, pero afecta negativamente a la enzima liberada, pues

prácticamente no se aprecia en la correspondiente fracción de almacenado. Si se toma como referencia el dato de actividad enzimática obtenido en la primera fracción para la enzima inmovilizada y se compara con el resto de resultados de esta fracción y los de la segunda fracción, se observa que la caída de la actividad enzimática retenida sobre las bolas de vidrio, en la segunda fracción, no es tan brusca como la observada en las fracciones de almacenado con detergente en las dos fracciones a las que se alude. Esto podría interpretarse que es debido a una estabilización de la proteína debido al proceso de inmovilización, con respecto a cuando se encuentra soluble. Por lo tanto, el lavado realizado es efectivo, pero la enzima liberada lo hace en condiciones no adecuadas. El resultado parece indicar que de los tres detergentes empleados es el que peores resultados, en general, proporciona.

TABLA 3.18

Efecto del lavado con SDS sobre la actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada.

Fracc.	H ₂ O _{e1} ^a	Almacenado1 ^b	Almacenado2 ^b	V ₀	V _f	R
	($\Delta A/min.mL$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
1	0,001	0,006	-----	0,248	0,012	4,84
2	-----	0,036	-----	-----	0,053	-----
3	-----	0,024	0,000	-----	0,021	-----

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,9 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 µg/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 20 horas y a una temperatura entre 0-4°C. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones intermedias de lavado y de almacenado se ensayaron en continuo. (a) Fracción intermedia de lavado tras un lavado de tipo 4.A. (b) Fracciones intermedias de almacenado con detergente (disolución acuosa de SDS al 1,5%).

La eficacia de los lavados realizados viene también corroborada por el hecho que los blancos mostrados por nuestros inmovilizados fueron nulos en todas las fracciones preparadas. Del mismo modo, la actividad enzimática presente en la fracción final de lavado fue nula en todas las muestras. Al igual que para los anteriores detergentes, se comprobó que el SDS no oxida al ABTS realizando un ensayo en blanco del modo

indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos para la enzima liberada a las aguas de lavado, utilizando para ello 1 mL de la disolución acuosa del detergente.

3.4.1.7 Efecto de los detergentes sobre la enzima soluble

Este ensayo sólo se realizó para la enzima soluble y el objetivo fue comprobar si los detergentes empleados durante los lavados 5.A-C indicados en el apartado 2.5.1 afectaban o no a la actividad enzimática de la enzima utilizada. El medio de ensayo se preparó con una concentración de enzima de 50 ng/mL. El medio de ensayo estuvo formado por agua destilada o bien por una disolución acuosa al 1,5% (p/v) de cada uno de los detergentes empleados. Cuando el medio de ensayo estuvo formado por agua destilada, la evolución de la actividad enzimática medida sirvió como ensayo de control. Cada uno de los medios de ensayo estudiados fue almacenado durante un tiempo máximo de una hora, que corresponde al tiempo de almacenado utilizado en los lavados arriba indicados. A diferentes instantes de tiempo fue sacada una alícuota del medio de ensayo y su actividad enzimática fue ensayada del modo indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos para comprobar la evolución experimentada por la actividad enzimática. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 3.19.

Los resultados muestran que tanto Tritón X-114 como Tritón X-100 no afectan a la actividad enzimática mostrada por HRPc soluble durante el tiempo de almacenado de una hora. Sin embargo un resultado totalmente opuesto a éste fue el obtenido para SDS. En este caso, el detergente inactivó completamente a la enzima desde los primeros instantes del almacenado. Para verificar este resultado, tras la fracción ensayada después de 60 minutos de almacenado, en el medio de ensayo se añadió 50 µL de la disolución enzimática inicial en que HRPc tuvo una concentración de 10^{-2} mg/mL. Inmediatamente después de esta adición fue ensayada la actividad enzimática mostrada por el medio de almacenado del modo indicado arriba, comprobándose que ésta era prácticamente nula (0,003 ΔA/min).

Por lo tanto, en lo sucesivo, serán utilizados detergentes no iónicos como Tritón X-100 y X-114, siendo desaconsejado el uso de detergentes iónicos como SDS. El efecto del detergente también es función del modo de lavado. Así, es más efectivo lavar 30 minutos en tres períodos de 10 minutos cada uno, que lavar 30 minutos seguidos. El sistema de lavado también se optimizó.

TABLA 3.19
Efecto de los detergentes empleados sobre la actividad enzimática de
HRPc soluble.

Tiempo	Medios de almacenado			
	H ₂ O	Tritón X-114	Tritón X-100	SDS
(min)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)
0	0,087	0,086	0,085	0,001
15	-----	0,090	0,086	0,000
30	-----	0,087	0,087	0,000
45	-----	0,088	0,087	0,000
60	0,084	0,086	0,086	0,000

El medio de ensayo estuvo formado por agua destilada o bien por una disolución acuosa al 1,5% (p/v) de cada uno de los detergentes empleados (Tritón X-114, Tritón X-100 o SDS). La enzima HRPc tuvo una concentración de 50 ng/mL. Para el ensayo de control el medio de reacción estuvo formado por agua destilada. Tiempo de almacenado total de 1 hora. La concentración de enzima durante el ensayo de actividad enzimática fue de 1,22 ng/mL. Medida realizada en continuo y a pH 4,5.

3.5 PROCEDIMIENTOS DE LAVADO PARA β -GALACTOSIDASA INMOVILIZADA

Cuando se empleó la enzima β -galactosidasa, los lavados iniciales supusieron la continua resuspensión del sólido de inmovilización en la disolución de lavado y agitación magnética durante un tiempo previamente establecido. Sin embargo, todo este proceso supuso una considerable pérdida de actividad enzimática posiblemente debida a la fractura del soporte en un polvo muy finamente dividido, que en los diferentes procesos de filtrado y resuspensión en la disolución de lavado iría perdiéndose retenido en los poros del papel de filtro, etc. También, y en este sentido, se ha descrito en la bibliografía (Manjón et al., 1985) un posible efecto del tipo de agitación empleada como responsable directo de la pérdida de actividad enzimática, y haciendo distinción entre si la agitación es magnética o mecánica.

Debido a la apreciación anterior, se decidió realizar un tipo de lavado que no supusiera la continua resuspensión del soporte de inmovilización en el medio de lavado, con lo cual éste se realizó añadiendo directamente las disoluciones sobre el sólido de inmovilización recogido en un filtro de papel Whatman nº1. Sin embargo, este sistema de

lavado mantenía el inconveniente que para el ensayo de actividad enzimática, el sólido debía ser resuspendido en el interior de un reactor termostataado a la temperatura deseada, y que tras el ensayo, el sólido debía ser nuevamente recogido. Además, se pudo comprobar lo lábil que era esta enzima a la temperatura, provocándose una gran pérdida de su actividad en su manipulación durante la inmovilización y lavados, puesto que todos ellos se realizaron a temperatura ambiente.

Para subsanar todos estos inconvenientes, se decidió emplear cartuchos de extracción de papel Whatman, en los cuales tras depositar el soporte con la enzima inmovilizada se realizaron todos los procesos de lavado, ensayos de actividad enzimática y almacenados. Además, el cartucho siempre fue colocado en un lecho con hielo triturado, y las disoluciones de lavado tuvieron una temperatura entre 0 y 4°C.

Capítulo 4

4 INMOVILIZACIÓN DE HRPc

4.1 CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN DE HRPc

Con el fin de optimizar y estandarizar las condiciones para la inmovilización de HRPc sobre diversos soportes, se ha estudiado el efecto de diversos factores entre los que se incluyen el pH de inmovilización, el tiempo de inmovilización, la concentración de sólido de inmovilización, la concentración de enzima y la naturaleza química del soporte empleado. A lo largo de todo el capítulo, el método empleado para la preparación del soporte fue por evaporación del disolvente y posterior irradiación. La inmovilización de la enzima se llevó a cabo según el método indicado para bolas de vidrio en Materiales y Métodos.

4.1.1 Efecto del pH de inmovilización

Los ensayos se realizaron a dos valores de pH (6,0 y 9,1) utilizando tampón fosfato potásico 0,1 M. La elección del pH 6,0 no fue al azar, sino que se empleó debido a que se ha descrito una alta estabilidad de HRPc en este valor de pH, sobre todo durante el almacenado. Si se considera que se emplearán altos tiempos de inmovilización esto podría ser importante. También se empleó un valor de pH de 9,1 ya que a estos valores de pH se obtienen las mejores condiciones para la formación de las bases de Schiff y, por lo tanto, se facilitaría la formación de enlaces covalentes en el caso de que en el soporte hubiera grupos aldehído libres (Ellis, 1959; Schacht et al., 1993a). Los sólidos empleados para este estudio fueron: el derivado de inulina cinamoilado un 41%, el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol y el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona mezclado al 50% con el derivado parcialmente cinamoilado de inulina arriba mencionado. Además, se emplearon bolas de vidrio sin ser recubiertas por sólido de inmovilización, para comprobar si el pH empleado afectaba o no a la adsorción de enzima mostrada por las bolas de vidrio utilizadas. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 4.1. Los resultados de la tabla anterior aconsejan la utilización de pH 9,1 en lugar de 6,0 como medio de inmovilización por las siguientes razones: las bolas de vidrio sin sólido de inmovilización adsorben mucha menos enzima a pH 9,1 que a pH 6,0. En todos los casos, y para un mismo sólido de inmovilización e iguales condiciones de ensayo, la actividad enzimática inicial mostrada por aquellas fracciones inmovilizadas a pH 9,1 fue superior a la de aquellas inmovilizadas a pH 6,0. Los blancos mostrados por

los inmovilizados de las jeringuillas en las que la enzima fue inmovilizada a pH 9,1 son nulos o despreciables. También apoya esta decisión el hecho de que la actividad enzimática retenida tras el almacenado en idénticas condiciones permitió obtener mejores resultados en aquellas fracciones preparadas a pH 9,1 que en aquellas en las que se hizo a pH 6,0, como fue comprobado a lo largo del apartado 3.4.1.

También está a favor el hecho que al preparar varias fracciones de la misma manera se obtiene una buena reproducibilidad en cuanto a los resultados obtenidos (resultados no mostrados). En una fracción preparada sin sólido de inmovilización, cuando la inmovilización se realizó a pH 9,1 durante un tiempo de unos pocos segundos, los resultados obtenidos son similares a los aquí mostrados. Esto parece indicar que la retención de la enzima tiene lugar por adsorción física ya que no afecta el tiempo de inmovilización empleado (resultados no mostrados).

TABLA 4.1
Efecto del pH sobre la inmovilización de HRPc.

Cinamato de:	V ₀	
	pH 6,0	pH 9,1
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)
D-manitol	0,753	0,934
Inulina (41%)	0,303	0,707
Inulina (41%) + D-glucosona al 50%	0,712	0,652
Control (Bolas de vidrio)	0,179	0,087

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 2,9 g/L. La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0 y 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 1 del apartado 2.5.1. La medida de la actividad enzimática se realizó en discontinuo.

4.1.2 Efecto del tiempo de inmovilización

4.1.2.1 Sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol

Este ensayo se realiza para estudiar el efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida. Inicialmente este estudio se centró sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol y se extendió a otros soportes como se describirá en el apartado siguiente. Los tiempos de inmovilización estuvieron comprendidos entre 2 y 21 h. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2 e indican que para el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol el tiempo de inmovilización no afecta significativamente a la actividad enzimática inicialmente retenida.

TABLA 4.2

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida por HRPc inmovilizada.

$t_{\text{inmov.}}$	V_0
(horas)	($\Delta A/\text{min}$)
2	0,074
4	0,081
8	0,068
12	0,074
21 ^a	0,076

Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,5 g/L). La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo entre 2-21 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad enzimática se midió en continuo. (a) Para esta fracción, la concentración del derivado totalmente cinamoilado de D-manitol fue de 15 g/L.

4.1.2.2 Sobre todos los sólidos de inmovilización

Este ensayo se realizó para comprobar si el resto de los sólidos de inmovilización se comportaban de forma similar a la arriba descrita. Para este estudio se emplearon todos los sólidos de inmovilización indicados en el apartado 4.2 de este capítulo y los resultados obtenidos son representados en la Tabla 4.3.

TABLA 4.3

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida por HRPc inmovilizada sobre cada uno de los derivados cinamoilados estudiados.

Cinamato de:	V ₀	
	2 horas	21 horas
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)
D-arabinosa	0,458	0,804
D-sorbitol	0,535	0,932
D-manitol	0,073	0,076
1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa	0,023	0,014
Etil-D-glucopiranósido	0,556	0,553
D-glucosa	0,328	0,361
Maltosa	0,380	0,375
Dextrina	0,210	0,388
Dextrano	0,144	0,285
D-fructosa	0,557	0,749
Sacarosa	0,481	0,880
Inulina	0,210	0,336
D-glucosona	0,705	0,673
Ácido D-gulónico	0,308	0,214
Ácido D-glucurónico	0,131	0,269
2,3,4,6-Tetracinaoil-D-glucopiranosa	0,062	0,100
3,5,6-Tricinaoil-D-glucofuranosa	0,004	0,009

Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 2 (tiempos cortos) y 21 horas (tiempos largos), y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad enzimática se midió en continuo.

Si bien se observa una cierta independencia del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida por HRPc, sin embargo, en alguno de estos soportes se comprueba una ligera tendencia a aumentar la actividad conforme aumenta el tiempo de inmovilización. Los casos más llamativos lo muestran los derivados de D-arabinosa y

sacarosa donde se observa un aumento de la actividad cercana al doble cuando se pasa de 2 a 21 horas de inmovilización. En todo caso el tiempo de inmovilización utilizado vendrá determinado por la aplicación industrial para la cual será empleada.

4.1.3 Efecto de la concentración de sólido de inmovilización

Este ensayo se realizó para estudiar el efecto de la concentración de sólido de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida sobre los inmovilizados ensayados. Las concentraciones de sólido en cloroformo ensayadas estuvieron comprendidas entre 2,5 y 50 g/L. Durante la deposición de la capa de sólido de inmovilización sobre las bolas de vidrio se observó que cuando la concentración de la disolución clorofórmica de éste es elevada, las bolas de vidrio quedaban pegadas y apelmazadas entre sí, apreciándose, al final, zonas donde la extensión fue irregular. Por lo tanto, es posible que la irregular distribución de la capa de sólido de inmovilización y la no deposición de éste en los puntos de contacto entre las bolas de vidrio sea responsable de resultados anómalos o en cualquier caso podrá afectar a la reproducibilidad de los ensayos realizados. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 4.4.

Estos resultados muestran una cierta tendencia a la saturación conforme aumenta la concentración de sólido empleado. Concentraciones de sólido de inmovilización alrededor de 25 g/L proporcionan una buena relación entre la actividad retenida y concentración de soporte utilizado. Sin embargo, a lo largo de esta Memoria se han utilizado concentraciones de sólido de 15 g/L, ya que a esta concentración los datos obtenidos de actividad enzimática retenida son suficientemente elevados y, además, no se observaron los problemas arriba mencionados a la hora de la aplicación del sólido de inmovilización sobre las bolas de vidrio. Por lo tanto la reproducibilidad de los resultados obtenidos no se verá afectada.

TABLA 4.4

Efecto de la concentración de sólido de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida por HRPc inmovilizada.

[Sólido]	V_0
(g/L)	($\Delta A/min$)
2,5	0,659
5	0,587
15	0,660
25	1,013
50	1,089

Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (2,5-50 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 2 y 4,5 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Estos resultados son obtenidos como los valores medios de los datos medidos inicialmente en las diferentes fracciones ensayadas. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad enzimática se midió en continuo.

4.1.4 Efecto de la concentración de enzima

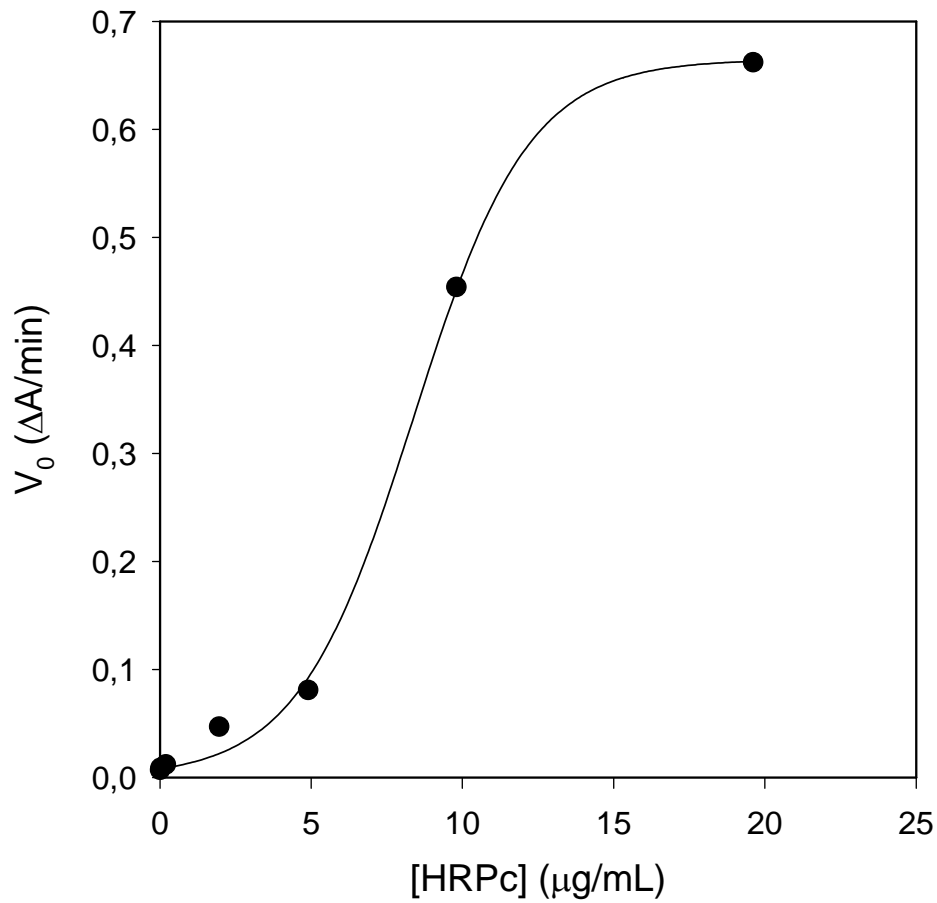
Este ensayo se realizó para estudiar el efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática inicialmente retenida sobre los sólidos de inmovilización ensayados. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 4.5. La representación gráfica de los datos mostrados en la tabla anteriormente citada permitió obtener la Figura 4.1. El ajuste por regresión no lineal de estos datos mostró un comportamiento sigmoideal para el efecto de la concentración de la enzima HRPc sobre la actividad enzimática inicialmente retenida sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol. Esta cinética puede ser coherente con el proceso de inmovilización propuesto, por el cual suponemos que la enzima queda retenida sobre este soporte. Es razonable que a bajas concentraciones de enzima, la cantidad de ésta que queda retenida, por adsorción, sobre el soporte será baja, siendo característico un cierto período de retardo o "lag" que será superado a partir de una determinada concentración de enzima a la que se produce un incremento brusco de la actividad enzimática retenida y tendiendo hacia un valor máximo de ésta, quizá, debido a la saturación de la capacidad de adsorción del soporte de inmovilización utilizado.

TABLA 4.5

Efecto de la concentración de HRPc sobre la actividad inicialmente retenida sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol.

[HRPc]	V ₀
($\mu\text{g/mL}$)	($\Delta A/\text{min}$)
0,002	0,007
0,02	0,009
0,2	0,012
2,0	0,047
4,9	0,081
9,8	0,454
19,6	0,662

Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Soporte de inmovilización: Derivado totalmente cinamoilado de D-manitol (15 g/L). La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 2 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad enzimática se midió en continuo.

**FIGURA 4.1**

Efecto de la concentración de HRPc sobre la actividad inicialmente retenida sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol.

Representación de la actividad enzimática inicial retenida, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la concentración de HRPc, $[\text{HRPc}]$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Las condiciones del ensayo son las descritas en la Tabla 4.5.

4.2 ACTIVIDAD EN DIFERENTES SOPORTES

En este apartado se estudiará el efecto de la naturaleza del sólido de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida. Se ensayaron los derivados totalmente cinamoilados de D-arabinosa, D-manitol, D-sorbitol, D-fructosa, D-glucosa, D-glucosona, ácido D-gulónico, ácido D-glucurónico, maltosa, sacarosa, inulina, dextrina, dextrano T40, etil-D-glucopiranosido, 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa, así como 2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa y 3,5,6-tricinaoil-D-glucofuranosa como sólidos de inmovilización de HRPc. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.6.

Se encontraron apreciables diferencias entre los valores mostrados por los diferentes sólidos de inmovilización, destacando por su alta actividad retenida los derivados totalmente cinamoilados de D-sorbitol, sacarosa, D-arabinosa, D-fructosa, D-glucosona y etil-D-glucopiranosido. Los valores mostrados en la tabla anterior permite clasificar a los sólidos de inmovilización en cuatro grupos diferentes, dependiendo de la actividad enzimática mostrada por la proteína cuando es inmovilizada sobre ellos. Así tendremos:

1. Inmovilizados que muestran una gran actividad enzimática: En este grupo se encontrarían los derivados totalmente cinamoilados de D-sorbitol, sacarosa, D-arabinosa, D-fructosa, D-glucosona y etil-D-glucopiranosido.
2. Inmovilizados que muestran valores de retención de actividad enzimática inicial intermedios: A este grupo pertenecerían los derivados totalmente cinamoilados de dextrina, maltosa, D-glucosa e inulina. Todos ellos muestran valores de retención de actividad enzimática muy parecidos.
3. Inmovilizados cuyos valores de retención de actividad enzimática son inferiores a los mostrados por los del grupo anterior, pero que no pueden ser considerados como bajos: Este grupo incluye a los derivados totalmente cinamoilados de dextrano, ácido D-glucurónico y ácido D-gulónico.
4. Por último, cabe mencionar los inmovilizados que presentan valores bajos de actividad enzimática retenida en primera medida: A este grupo pertenecen los derivados totalmente cinamoilados de D-manitol, 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa, así como los derivados parcialmente cinamoilados 2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa y 3,5,6-tricinaoil-D-glucofuranosa.

TABLA 4.6

Actividad enzimática inicial mostrada por HRPc inmovilizada sobre cada uno de los derivados cinamoilados estudiados.

Cinamato de:	V_0 ($\Delta A/min$)
D-sorbitol	0,907
Sacarosa	0,880
D-arabinosa	0,783
D-fructosa	0,726
D-glucosona	0,679
Etil-D-glucopiranosido	0,603
Dextrina	0,405
Maltosa	0,389
D-glucosa	0,343
Inulina	0,332
Dextrano	0,294
Ácido D-glucurónico	0,268
Ácido D-gulónico	0,218
2,3,4,6-Tetracinaoil-D-glucopiranososa	0,095
D-manitol	0,075
1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa	0,015
3,5,6-Tricinaoil-D-glucofuranosa	0,008

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en continuo. Los resultados aportados corresponden a la media aritmética de los datos obtenidos en diferentes ensayos (al menos seis medidas diferentes).

Los resultados mostrados en la Tabla 4.6 permiten sacar las siguientes conclusiones en cuanto a los factores que influyen en la actividad enzimática retenida inicialmente por los sólidos de inmovilización estudiados.

- 1. Presencia de grupos polares:** La presencia de grupos polares libres, como los grupos –OH, es determinante y hace disminuir la actividad mostrada, es decir, en los

ensayos realizados la actividad enzimática aumenta al hacerlo el grado de cinamoilación del sólido de inmovilización utilizado. Esta conclusión se extrae de los resultados mostrados por el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido en comparación con su forma hidrolizada (2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa), así como, por el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa al ser comparado con los derivados totalmente cinamoilados del ácido D-glucurónico y/o el ácido D-gulónico.

- 2. Tamaño molecular del monómero:** Se observa una disminución de la actividad enzimática inicialmente retenida al aumentar el tamaño molecular del monómero empleado para la preparación del sólido de inmovilización. Esta afirmación se puede verificar al comparar los resultados obtenidos para los derivados totalmente cinamoilados de dextrano frente a dextrina, inulina frente a D-fructosa o D-arabinosa frente a D-glucosa y/o D-fructosa. Los valores para el derivado de D-glucosa son más bajos de lo que correspondería a un monómero, probablemente por darse una incipiente hidrólisis del grupo cinamato del éster cinámico en el carbono anomérico durante el período de lavado con agua destilada. Este efecto de presencia de grupos polares es menor en el derivado de maltosa aunque ambos presentan valores inferiores a los que les correspondería comparados con los obtenidos para dextrina, de no ocurrir este efecto. Al margen de la excepción arriba citada, el comportamiento mencionado con anterioridad puede ser debido a que a menor tamaño molecular, en el proceso de entrecruzamiento se alcanza un mayor grado de ramificación en el polímero sintetizado, lo cual favorecerá su posterior capacidad de adsorción.
- 3. Flexibilidad de la cadena y tamaño de anillo del monómero:** Los derivados totalmente cinamoilados preparados a partir de monómeros lineales como D-sorbitol, presentan valores máximos de retención de actividad enzimática. Esto puede ser también debido, probablemente, a la mayor ramificación del producto final entrecruzado obtenido a partir de ellos, por la mayor flexibilidad de la cadena de monómero inicialmente empleada. Anillos de menor tamaño como los mostrados por los derivados de D-arabinosa, D-fructosa y D-glucosona, que presentan estructura *furanosa*, dan lugar a mayores valores de retención de actividad enzimática que sus análogos de seis miembros con estructura *piranososa*, como los obtenidos por los derivados de D-glucosa o etil-D-glucopiranosido. Los anillos *furanosa* tienen sus sustituyentes más alejados del plano del anillo, lo cual favorece la ramificación frente a anillos *piranososa* con la mayor parte de los sustituyentes en el mismo plano y coincidentes con el del anillo de tal modo que no favorecerá la ramificación. Por

último, el sólido de inmovilización obtenido a partir del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa presenta elevados valores de retención de actividad enzimática por carecer de grupos cinamato en el carbono anomérico susceptibles de incipiente hidrólisis durante el lavado.

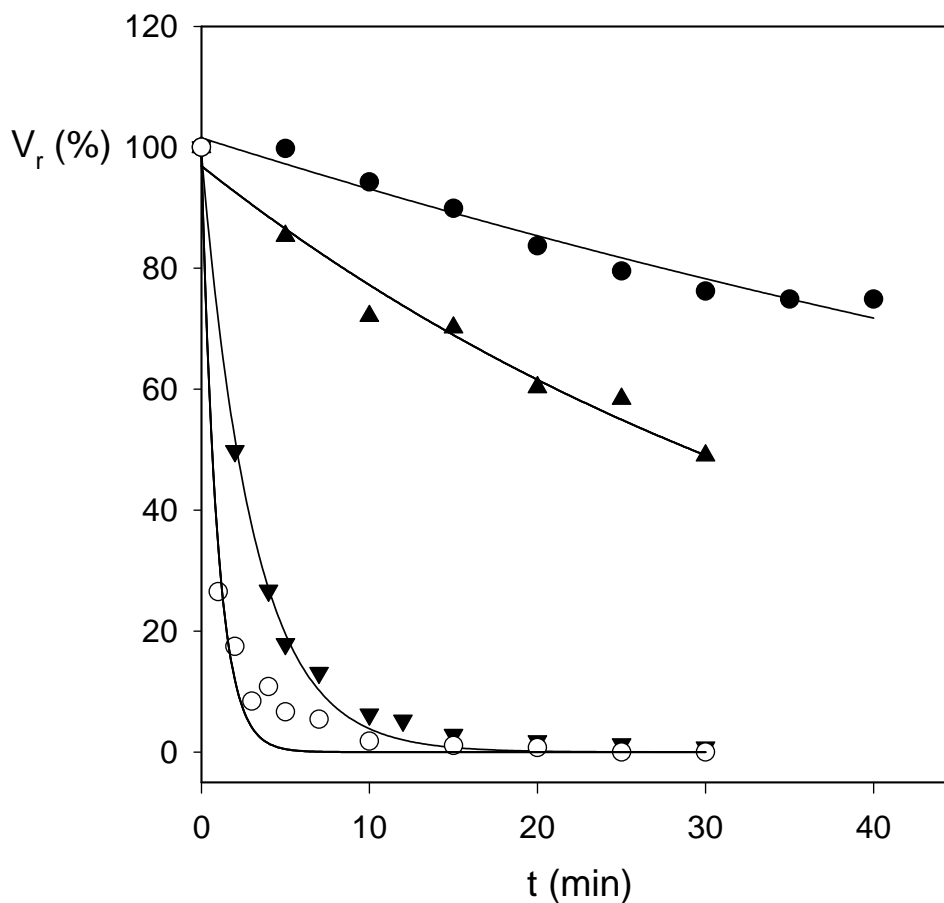
4.3 ENSAYOS DE INACTIVACIÓN

4.3.1 Inactivación por temperatura

4.3.1.1 HRPc soluble

Para la realización de estos ensayos, se dispuso de un baño de agua termostatado, con el cual ajustar las preparaciones realizadas a la temperatura deseada dependiendo del ensayo en estudio. La disolución enzimática se introdujo en una jeringuilla de polipropileno cerrada por su extremo inferior, y que se colocó en el baño de agua termostatado a la temperatura deseada, conteniendo 10 mL del tampón de ensayo. Inicialmente se realizó un ensayo control preparando un medio similar al del ensayo de inactivación térmica pero con disolución tampón frío. Las temperaturas seleccionadas para la realización de este estudio fueron 40°C, 50°C, 60°C y 70°C. Los datos obtenidos para cada una de las temperaturas ensayadas son representados en las Tablas A4.1-4 y Figuras A4.1-4 mostradas en el Apéndice de esta Memoria. Los resultados son representados conjuntamente en la Figura 4.2.

Los datos representados en la figura anterior, fueron ajustados mediante regresión no lineal a la ecuación correspondiente a una exponencial con dos parámetros. El ajuste de estas gráficas permitió obtener los valores correspondientes a la amplitud (**A**) y la constante de inactivación del proceso estudiado (**k_i**). Los valores obtenidos para cada una de las temperaturas ensayadas son mostrados en la Tabla 4.7. Estos datos serán utilizados como referencia en estudios comparativos con aquellos obtenidos para la HRPc inmovilizada sobre los diferentes soportes de inmovilización.

**FIGURA 4.2**

Inactivación térmica de HRPc soluble a diferentes temperaturas:

(λ) 40°C, (σ) 50°C, (τ) 60°C y (O) 70°C.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura deseada y 0,58 $\mu\text{g/mL}$ de HRPc. La actividad enzimática residual fue determinada en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5) y para una concentración de enzima de 21 ng/mL como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Se consideró como actividad enzimática inicial aquella que permaneció en las muestras tras un minuto de calentamiento a la temperatura y pH de ensayo.

TABLA 4.7
Constantes de inactivación térmica de HRPc soluble.

Parámetro	Temperatura de ensayo			
	40°C	50°C	60°C	70°C
A (%)	101,556	96,909	99,019	98,387
k_i (min ⁻¹)	0,009	0,023	0,324	1,059

4.3.1.2 HRPc Inmovilizada

Estudio sobre todos los inmovilizados obtenidos

Cada uno de los inmovilizados de las jeringuillas preparadas fueron previamente ensayados para conocer su actividad enzimática inicial. A continuación, fueron lavados a fondo haciendo recircular agua destilada a través de las jeringuillas mediante una bomba peristáltica, y finalmente fueron secados mediante succión a presión reducida. El ensayo de estabilidad térmica se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) y a una temperatura de 60°C. Para estos ensayos el baño de agua y el tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) fueron termostatados a la temperatura deseada. A continuación, a la jeringuilla se le añadió un volumen fijo del tampón ya atemperado y se depositó rápidamente en el baño de agua en el que permaneció durante los 10 minutos del ensayo. Finalizado este tiempo, se extrajo rápidamente el medio de ensayo y se enjuagó con abundante agua destilada para enfriar la muestra hasta temperatura ambiente. Tras secar las jeringuillas y su contenido con succión a presión reducida se volvió a ensayar su actividad enzimática.

Los resultados obtenidos son los indicados en la Tabla 4.8. La actividad enzimática residual se presenta como el tanto por ciento de la actividad enzimática inicial. Es de destacar que no se observaron grandes diferencias entre los valores mostrados por los diferentes inmovilizados tras ser calentados 30 segundos a 60°C. Estos valores oscilaron alrededor de un 24,4%. No obstante, cabe destacar el buen comportamiento mostrado por los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona, etil-D-glucopiranosido, ácido D-glucurónico, D-manitol y D-sorbitol frente al choque térmico a que fueron sometidos sus inmovilizados mostrando, en general, una retención superior al 30%. Tras el calentamiento durante 10 minutos a 60°C, todos los inmovilizados mostraron una actividad enzimática que osciló alrededor del 7,6%. Sin embargo, y al igual que

ocurrió durante el ensayo de choque térmico durante 30 segundos, arriba citado, vuelve a destacar la actividad enzimática retenida por los inmovilizados de los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona, D-sorbitol, etil-D-glucopiranosido, ácido D-glucurónico y D-manitol, y debiendo mencionar además aquí la actividad enzimática retenida por 2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa. En general, todos ellos mostraron una actividad enzimática superior a la media, siendo especialmente destacable el resultado obtenido para el derivado de D-glucosona.

En la columna correspondiente a R_2 (%) se tuvo en cuenta el efecto conjunto del choque térmico y el efecto de la temperatura. En este caso, se observa que la actividad inicialmente mostrada por los sólidos tras el choque térmico disminuyó por efecto de la temperatura hasta unos valores que oscilaron alrededor del 31%. Es especialmente importante la actividad retenida por el derivado de D-glucosona, próxima a un 40%. Además, vuelven a destacar, por mostrar valores de retención superiores a la media, los derivados mencionados arriba, así como el de maltosa.

Con respecto al rendimiento obtenido tras calentar 30 segundos a 60°C, los derivados cinamoilados preparados pueden ser ordenados de la siguiente manera: D-glucosona > etil-D-glucopiranosido > D-manitol > ácido D-glucurónico > D-sorbitol > D-arabinosa > inulina > 2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa > D-glucosa > D-fructosa > dextrano > sacarosa > dextrina > maltosa > ácido D-gulónico. Los valores mostrados por el derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa y por 3,5,6-tricinaoil-D-glucofuranosa, son tan bajos que no son representativos y por ello no serán considerados.

Esta ordenación clasifica a los sólidos de inmovilización de mejores a peores a la hora de albergar a la proteína en buenas condiciones para su actividad enzimática y/o estabilidad frente a la temperatura, pH e inactivadores, así como, quizá, su accesibilidad por parte del sustrato y fácil difusión del producto de reacción al medio. Este rendimiento será posteriormente tenido en cuenta como valor de partida para el estudio de la estabilidad térmica con tiempos de tratamiento más prolongados.

TABLA 4.8
Estabilidad térmica de HRPc inmovilizada sobre cada uno de los derivados
cinamoilados estudiados.

Cinamato de:	V ₀	V _{30'+60°C}	R ₁	V _{10'+60°C}	R ₂	R ₃ ^a
	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)	(ΔA/min)	(%)	(%)
D-sorbitol	0,925	0,266	28,74	0,104	39,10	11,24
Sacarosa	0,883	0,173	19,61	0,049	28,32	5,55
D-arabinosa	0,796	0,198	24,88	0,057	28,79	7,16
D-fructosa	0,776	0,177	22,75	0,041	23,16	5,28
D-glucosona	0,700	0,230	32,91	0,091	39,57	13,00
Etil-D-glucopiranosido	0,553	0,180	32,61	0,038	21,11	6,87
Dextrina	0,423	0,080	18,98	0,022	27,50	5,20
Maltosa	0,368	0,062	16,80	0,023	37,10	6,25
D-glucosa	0,375	0,089	23,63	0,029	32,58	7,73
Inulina	0,346	0,084	24,25	0,018	21,43	5,20
Dextrano	0,270	0,057	21,00	0,017	29,83	6,30
Ácido D-glucurónico	0,271	0,082	30,08	0,026	31,71	9,59
Ácido D-gulónico	0,231	0,035	15,23	0,009	25,71	3,90
2,3,4,6-Tetracinaoil-D-glucopiranososa	0,086	0,020	23,68	0,008	40,00	9,30
D-manitol	0,076	0,023	30,26	0,009	39,13	11,84

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 μg/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad inicial de la enzima inmovilizada se midió, en todos los casos, en continuo. Ensayo de estabilidad térmica realizado en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), a una temperatura de 60°C y durante un tiempo de calentamiento de 10 minutos para todas las muestras. Se consideró como actividad enzimática inicial aquella que permaneció en las muestras tras 30 segundos a la temperatura y pH indicados. (a) R₃ (%), caída global de la actividad enzimática.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para la actividad enzimática inicial retenida en función del sólido de inmovilización empleado, cabe destacar los siguientes aspectos:

1. El derivado totalmente cinamoilado de sacarosa retiene inicialmente una gran cantidad de enzima, pero la proteína retenida no se encuentra en buenas condiciones en cuanto a su estabilidad térmica. De hecho el rendimiento obtenido es de los más bajos.
2. Es importante destacar al derivado totalmente cinamoilado de D-manitol, que aunque la actividad enzimática inicialmente retenida es de las más bajas, sin embargo, la proteína presente se encuentra en buenas condiciones a la hora de someterla a choque térmico. Ambos datos pueden ser utilizados puesto que al tener valores de actividad enzimática iniciales muy bajos puede ser utilizado este sólido para el recubrimiento de las bolas de vidrio y así, evitar la adsorción inespecífica mostrada por éstas. Además, puede ser entrecruzado con algún otro cinamato que posea algún grupo reactivo seleccionado de interés con lo cual la capa inicial de cinamato de D-manitol proporcionará un lecho donde la enzima se encontrará estable y además la actividad enzimática que observaremos será debida en su mayor parte a la enzima retenida mediante el grupo reactivo seleccionado.
3. Los derivados totalmente cinamoilados de etil-D-glucopiranosido y D-glucosona retienen inicialmente una actividad enzimática importante y, además, también muestran los mayores rendimientos cuando son sometidos a un choque térmico.
4. Es importante destacar la estabilidad mostrada por HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado del ácido D-glucurónico, al ser sometida a choque térmico. Este sólido puede ser utilizado ya sea solo o entrecruzado con algún otro, como el arriba citado de D-manitol, para la inmovilización de la enzima mediante la formación de enlaces covalentes a través del grupo carboxilo del sólido de inmovilización y un grupo reactivo adecuado presente en las cadenas laterales de aminoácidos de la enzima.

Cuando la enzima inmovilizada en los diferentes sólidos de inmovilización fue sometida a un tratamiento térmico más prolongado, los rendimientos obtenidos permitieron clasificar a estos sólidos de la siguiente manera: D-glucosona > D-manitol > D-sorbitol > ácido D-glucurónico \cong 2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa > D-glucosa > D-arabinosa > etil-D-glucopiranosido > dextrano \geq maltosa > sacarosa > D-fructosa > inulina \cong dextrina > ácido D-gulónico. Esta clasificación dará información de la evolución de la

enzima cuando está expuesta a tratamiento térmico prolongado. Con estos resultados es posible destacar las siguientes observaciones:

1. El derivado totalmente cinamoilado de sacarosa vuelve a ser el que muestra peores rendimientos. A pesar de ser de los sólidos de inmovilización que más actividad enzimática retiene inicialmente es de los peores en que la enzima puede ser inmovilizada desde el punto de vista de la estabilidad térmica.
2. El derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido vuelve a mostrar un alto porcentaje de retención de actividad enzimática tras el tratamiento térmico. Es por ello que globalmente y desde el punto de vista de la estabilidad térmica es uno de los mejores sólidos de inmovilización aquí estudiados.
3. Los resultados obtenidos tras el choque térmico inicial y tras el tratamiento térmico más prolongado, permite concluir que el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona es el mejor de los soportes de inmovilización en cuanto a su bondad a la hora de inmovilizar a la enzima y posterior tratamiento térmico. Además, este sólido tiene la ventaja añadida de poseer un grupo especialmente reactivo, pues posee un grupo aldehído libre en su C₁ junto a un grupo cetónico vecino en su C₂ responsable del anillo furanosa 2,5. Este grupo podría dar lugar a la inmovilización covalente de la enzima mediante la formación inicial de una base de Schiff que, posteriormente, podría ser convenientemente reducida para la formación de un enlace covalente irreversible.
4. La consideración de la alta actividad enzimática inicialmente retenida, así como los elevados porcentajes de retención obtenidos tras el choque térmico inicial y tratamiento posterior más prolongado, hace del derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol el segundo mejor soporte de inmovilización aquí ensayado. Sin embargo, como los valores de actividad enzimática inicial mostrada por el derivado de D-sorbitol son mayores que los de D-glucosona, esto hace que en cualquier caso, los valores absolutos de actividades enzimáticas de HRPc inmovilizada sobre el primero sean mayores que sobre el segundo en cualquiera de los ensayos de estabilidad térmica realizados. Habrá que esperar a la realización del estudio cinético del comportamiento de la enzima inmovilizada sobre ambos soportes de inmovilización durante el tratamiento térmico, para decidir sobre cuál de estos dos sólidos ofrece las mayores ventajas.
5. Vuelve a ser destacable el alto rendimiento obtenido para el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol, así como para el derivado del ácido D-glucurónico. Estos

datos vuelven a corroborar lo indicado anteriormente con respecto a la utilización de estos sólidos de inmovilización.

6. El derivado totalmente cinamoilado del ácido D-gulónico presenta una baja retención de actividad enzimática inicial y, además, presenta los peores resultados con respecto al tratamiento térmico en ambas clasificaciones. Por lo tanto, este sólido podría, en principio, ser descartado como sólido de inmovilización.

La consideración conjunta de actividad enzimática retenida inicialmente, estabilidad frente a un choque térmico y frente a un tratamiento térmico prolongado de la enzima HRPc inmovilizada sobre cada uno de los soportes de inmovilización arriba citados permite agrupar las conclusiones obtenidas en los siguientes puntos.

1. Los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona, D-sorbitol y etil-D-glucopiranosido pueden considerarse buenos soportes para la inmovilización y confieren una cierta estabilidad térmica a la enzima unida, siendo, por lo tanto, útiles para procesos que requieran de condiciones térmicas extremas.
2. Subrayar las expectativas abiertas por la utilización de sólidos como los derivados totalmente cinamoilados de D-manitol y ácido D-glucurónico.
3. Descartar para su utilización, con estos fines, a los derivados totalmente cinamoilados de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa, ácido D-gulónico y sacarosa, así como a 3,5,6-tricinamoil-D-glucofuranosa.
4. Considerar con un interés moderado y, en algunos casos, escaso interés al resto de los sólidos de inmovilización estudiados.

Estudio de la inactivación térmica de HRPc inmovilizada sobre los cinamatos de D-sorbitol, D-glucosona, etil-D-glucopiranosido e inulina

Tras el ensayo descrito en el apartado anterior, se decidió estudiar con más detalle la cinética de inactivación térmica de HRPc inmovilizada sobre los soportes de inmovilización citados en el título de esta sección. Cada uno de los inmovilizados de las jeringuillas preparadas fueron previamente ensayados para conocer su actividad enzimática inicial. A continuación fueron lavadas a fondo haciendo recircular agua destilada a través de las jeringuillas mediante una bomba peristáltica y, finalmente fueron secadas mediante succión a presión reducida. Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) y a una temperatura de 60°C. Los tiempos de calentamiento estuvieron comprendidos entre 0,5 y 21 minutos. El ensayo de inactivación térmica se realizó como es descrito en el apartado anterior.

Los resultados fueron presentados tal y como se indica en el citado apartado. Los datos obtenidos para cada uno de los sólidos de inmovilización ensayados son representados en las Tablas A4.5-8 y Figuras A4.5-8. Los resultados son representados conjuntamente en la Figura 4.3.

La representación de los datos de actividad enzimática residual frente al tiempo de tratamiento térmico (Figura 4.3) mostró un patrón similar de comportamiento para todos los sólidos de inmovilización estudiados. En todos los casos las curvas obtenidas fueron ajustadas a una caída biexponencial. Este resultado está de acuerdo con los datos bibliográficos que asignan un comportamiento similar para HRPc inmovilizada sobre otros soportes de inmovilización (Sutherland y Aust, 1996; Weng et al., 1991; Husain y Jafri, 1995). Se observó un comportamiento similar para los derivados totalmente cinamoilados de D-sorbitol y D-glucosona. Algo parecido ocurrió entre los derivados de etil-D-glucopiranosido e inulina, diferenciándose de los anteriores en que los resultados obtenidos para aquellos son algo superiores.

Se observó que en todos los casos la enzima es más estable a 60°C cuando se encontraba inmovilizada que cuando el ensayo se realizó con la enzima soluble en condiciones de estudio similares. No sólo los resultados obtenidos para HRPc soluble son mucho más bajos, sino que además el patrón de comportamiento fue diferente ajustándose los datos representados a una caída uniexponencial. Ello pone de manifiesto que la inmovilización de HRPc sobre los soportes de inmovilización aquí estudiados debe inducir cambios conformacionales sobre la enzima que la harán más estable al tratamiento térmico.

Los datos representados en la figura anterior (Figura 4.3) fueron ajustados por regresión no lineal a la ecuación correspondiente a una doble exponencial con cuatro parámetros. El ajuste de estas gráficas permitió obtener los valores correspondientes a las amplitudes ($A_{(ij)}$) y a las constantes de inactivación del proceso estudiado ($k_{i(j)}$). Los valores obtenidos para cada uno de los sólidos de inmovilización ensayados son mostrados en la Tabla 4.9.

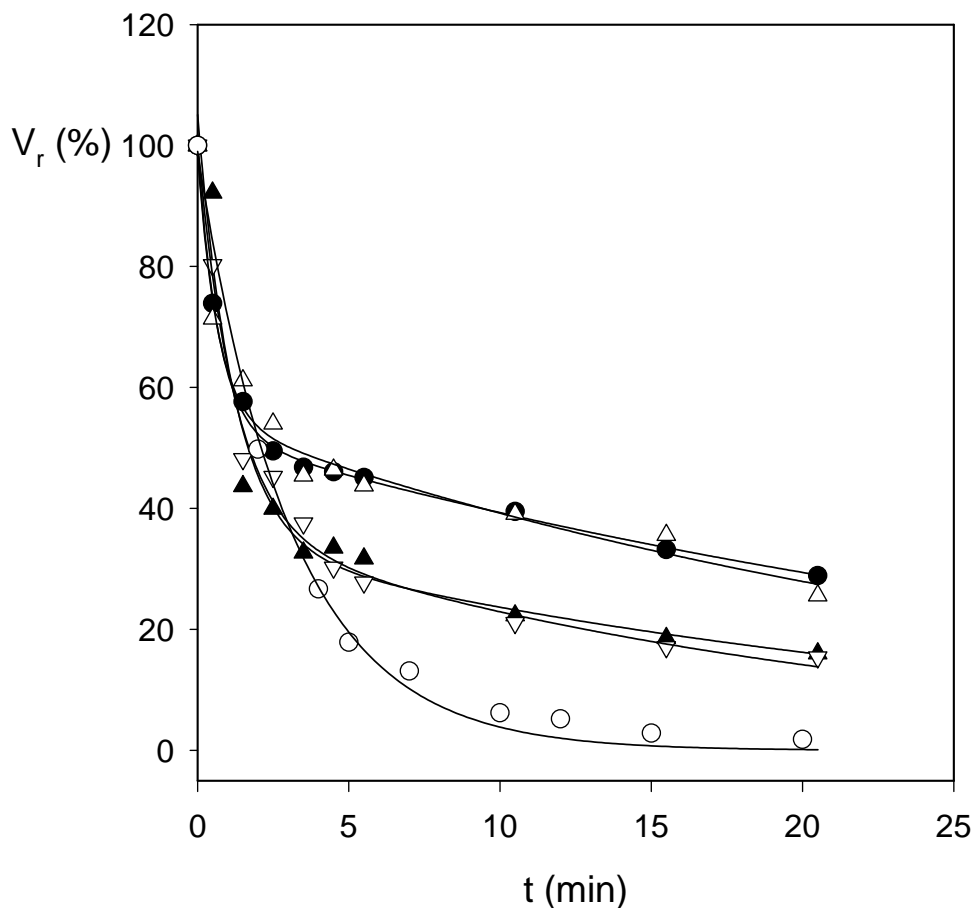


FIGURA 4.3

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de: (△) D-sorbitol, (λ) D-glucosona, (▽) etil-D-glucopiranosido e (σ) inulina; (○) HRPc soluble.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad inicial de la enzima inmovilizada se midió, en todos los casos, en continuo. Ensayo de estabilidad térmica realizado en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), a una temperatura de 60°C y durante un tiempo de calentamiento entre 0,5 y 21 minutos para todas las muestras. Se consideró como actividad enzimática inicial aquella que permaneció en las muestras tras 30 segundos a la temperatura y pH indicados.

TABLA 4.9
Constantes de inactivación térmica de HRPc inmovilizada.

Parámetro	Derivado totalmente cinamoilado de:			
	D-sorbitol	D-glucosona	Etil-D-glucopiranosido	Inulina
$A_{(1)} (\%)$	43,932	47,183	63,356	70,596
$k_{i(1)} (\text{min}^{-1})$	1,536	1,424	0,811	0,830
$A_{(2)} (\%)$	55,081	52,508	37,017	34,489
$k_{i(2)} (\text{min}^{-1})$	0,034	0,029	0,048	0,038

La cinética biexponencial observada para el tratamiento térmico de HRPc inmovilizada sobre los sólidos ensayados, indica que el proceso de inactivación térmica se ajusta a un comportamiento bifásico que implica que se trata de un proceso secuencial en dos pasos. Para explicar este comportamiento bifásico existen actualmente dos teorías diferentes. Por un lado, hay quienes mantienen la existencia de dos fracciones enzimáticas, una lábil responsable del proceso inicial de inactivación térmica rápido, y otra más estable a la temperatura que dará lugar al segundo proceso de inactivación más lento (Weng et al., 1991; López y Burgos, 1995). Por otro lado, otros grupos de investigación mantienen la existencia de dos etapas diferentes durante la inactivación térmica. La primera etapa rápida, corresponde a la salida de los iones Ca^{+2} , y la segunda etapa, más lenta, que correspondería a la pérdida del grupo hemo por parte de HRPc (Sutherland y Aust, 1996; Husain et al., 1996). Por otra parte, para HRPc soluble la cinética uniexponencial puso de manifiesto que el proceso de inactivación tuvo lugar en una sola etapa y esto puede ser debido al solapamiento de las dos fases de inactivación, debido, a que no se produce estabilización alguna de la proteína.

Estudio de la inactivación térmica de HRPc inmovilizada sobre el cinamato de D-glucosona

Los resultados obtenidos en el apartado anterior, junto con la posibilidad de que las bolas de vidrio recubiertas con cinamato de D-glucosona pudieran inmovilizar a la enzima por medio de enlaces covalentes, llevó a realizar un estudio más amplio de la cinética de inactivación térmica de HRPc inmovilizada sobre este sólido de inmovilización y a diferentes temperaturas de ensayo. Cada uno de los inmovilizados de las jeringuillas

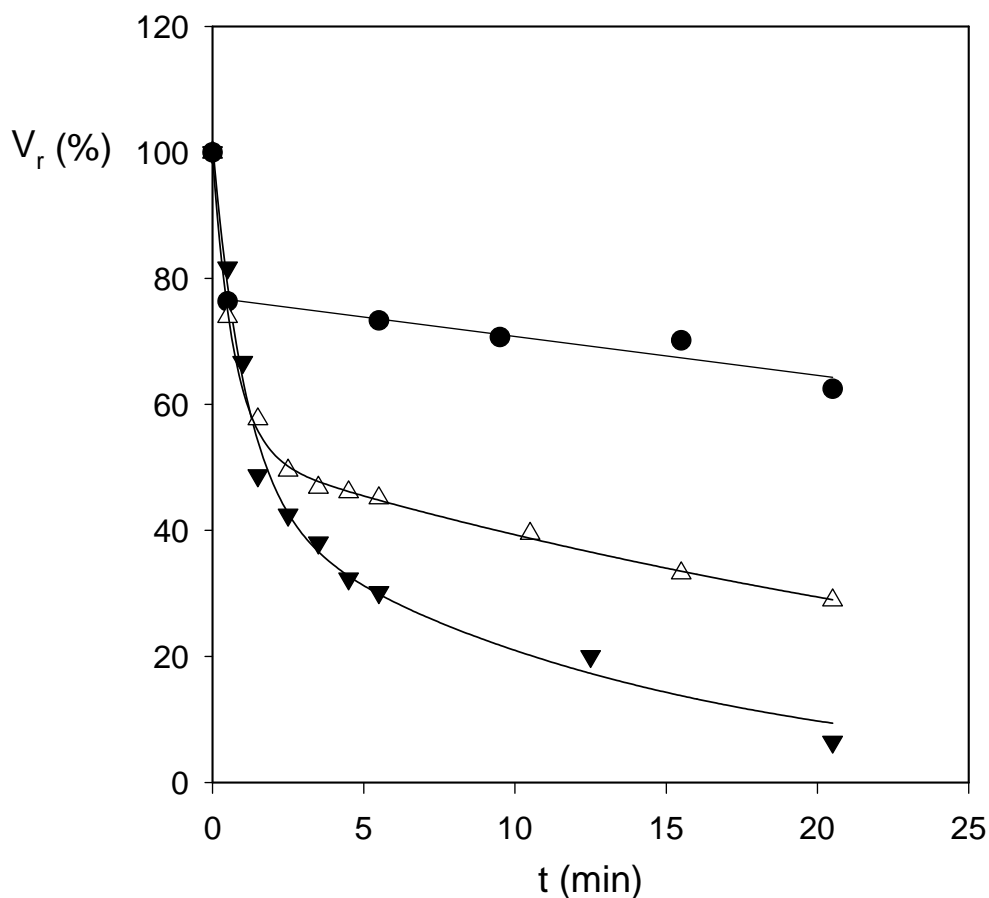
preparadas fueron previamente ensayados para conocer su actividad enzimática inicial. A continuación fueron lavados a fondo haciendo recircular agua destilada a través de las jeringuillas mediante una bomba peristáltica, y finalmente fueron secadas mediante succión a presión reducida. El ensayo de inactivación térmica se realizó como se indicó en el primer apartado de esta sección.

Los resultados fueron presentados tal y como se indicó en el citado apartado. Los datos obtenidos para cada una de las temperaturas ensayadas son representados en las Tablas A4.9-11 y Figuras A4.9-11. Los resultados son representados conjuntamente en la Figura 4.4. Los datos representados en esta figura fueron ajustados, en todos los casos, a la ecuación correspondiente a una doble exponencial con cuatro parámetros, salvo para los datos correspondientes a la temperatura de 40°C. El ajuste por regresión no lineal de estas gráficas permitió obtener los valores correspondientes a las amplitudes ($A_{(i)}$) y a las constantes de inactivación del proceso estudiado ($k_{i(i)}$). Los valores obtenidos para cada una de las temperaturas ensayadas son mostrados en la Tabla 4.10.

TABLA 4.10

Constantes de inactivación térmica de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Parámetro	Temperatura de ensayo		
	40°C	60°C	70°C
$A_{(1)}$ (%)	-----	47,183	56,536
$k_{i(1)}$ (min^{-1})	-----	1,424	0,925
$A_{(2)}$ (%)	-----	52,508	44,958
$k_{i(2)}$ (min^{-1})	0,009	0,029	0,076

**FIGURA 4.4**

Inactivación térmica a diferentes temperaturas de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona: (●) 40°C, (△) 60°C y (▼) 70°C.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad inicial de la enzima inmovilizada se midió, en todos los casos, en continuo. Ensayo de estabilidad térmica realizado en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), a la temperatura deseada y durante un tiempo de calentamiento entre 0,5 y 21 minutos para todas las muestras. Para cada tiempo de calentamiento se preparó un inmovilizado en una jeringuilla diferente. Se consideró como actividad enzimática inicial aquella que permaneció en las muestras tras 30 segundos a la temperatura y pH indicados.

Para el ensayo realizado a 40°C de temperatura se observó una caída inicial brusca de la actividad enzimática, que pudo ser debida a una fracción de enzima débilmente enlazada al soporte de inmovilización y que posteriormente se liberó durante el ensayo de inactivación térmica. Tras esta caída inicial, la actividad enzimática fue disminuyendo lentamente con el tiempo de ensayo, de una manera lineal. Por ello, los datos fueron sometidos a un ajuste por regresión lineal, y la constante de inactivación del proceso se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida tras representar el logaritmo neperiano de la actividad enzimática residual frente al tiempo de ensayo. Esta constante de inactivación calculada se entendió que correspondía a la etapa lenta del proceso global.

Si se comparan los resultados aquí obtenidos con los calculados para el ensayo de estabilidad térmica de HRPc soluble, puede observarse que a 40°C ambas formas enzimáticas muestran similar valor de constante de inactivación. Sin embargo, al aumentar la temperatura de ensayo las diferencias empiezan a ser apreciables. Así, cuando la temperatura fue de 60°C la constante de inactivación de la forma inmovilizada fue más de un orden de magnitud inferior que la mostrada por la forma soluble, mientras que a 70°C la enzima inmovilizada fue catorce veces más estable que cuando se encontró en disolución.

4.3.2 Inactivación de HRPc por peróxido de hidrógeno

Uno de los aspectos que caracteriza al mecanismo de acción de las peroxidasas es su inactivación suicida por exceso de sustrato oxidante (Rodríguez-López et al., 1997). El peróxido de hidrógeno induce a la inactivación de peroxidasa mediante un mecanismo enzimático descrito ampliamente en la bibliografía (Arnao et al., 1990; Hiner et al., 1995). Este proceso de inactivación supone un problema cuando se trata de usar a las peroxidasas como enzimas con fines industriales, ya sea en reactores enzimáticos o en su utilización en biosensores. Por lo tanto, el estudio de soportes de inmovilización que produzcan una estabilización de esta enzima frente al peróxido de hidrógeno es de gran interés académico y económico. En este apartado, se ha estudiado la estabilidad de HRPc frente a peróxido de hidrógeno usando la enzima soluble o inmovilizada a distintos soportes, así como a distintos valores de pH.

4.3.2.1 Enzima soluble

La inactivación de HRPc soluble por una alta concentración de H₂O₂ a distintos valores de pH se describe en las Tablas A4.12 y 17 y Figuras A4.12 y 16. Los datos

recogen la cinética de inactivación de HRPc soluble con el tiempo de ensayo y servirán como referencia para su comparación con los valores obtenidos para los distintos inmovilizados preparados.

4.3.2.2 Enzima inmovilizada

Cuando el efecto inactivador de H_2O_2 sobre HRPc inmovilizada se estudió a pH 4,5 se utilizaron todos los sólidos de inmovilización. Para ello se emplearon los inmovilizados de las jeringuillas preparadas para estudiar el efecto de la naturaleza química del sólido de inmovilización sobre la actividad enzimática inicial retenida. Sin embargo, cuando esta inactivación se realizó a pH 7,0 se seleccionaron una serie de soportes entre los que se incluyeron los derivados totalmente cinamoilados de D-fructosa, inulina, D-glucosa, dextrina, D-sorbitol, D-glucosona y etil-D-glucopiranosido. Tras el lavado de las fracciones, el medio de ensayo se hizo recircular en continuo del modo indicado para la enzima inmovilizada en Materiales y Métodos. La reacción enzimática se siguió a 414 nm durante 30 minutos y los datos obtenidos se representan en las Tablas A4.13-16 y A4.18-19, y en las Figuras A4.13-15 y A4.17. Los valores obtenidos para las constantes de inactivación obtenidas a ambos valores de pH son representados en la Tabla 4.11.

La constante de inactivación de HRPc soluble, por una concentración 10 mM de H_2O_2 , fue aproximadamente tres veces mayor a pH 7,0 que a pH 4,5. Uno de los resultados más sorprendentes es la protección de HRPc por su inmovilización sobre los soportes ensayados a pH 7,0. En todos los casos se observó un valor de k_i inferior al determinado para HRPc soluble. Si bien es difícil encontrar una explicación molecular a este efecto, se podría especular con que la fijación de HRPc a un soporte impediría su reacción con los posibles agentes inactivadores generados durante la reacción. Especies de oxígeno reactivo como $\cdot OH$, superóxido, etc., generados durante la catálisis, pueden ser absorbidas por el soporte en lugar de atacar a residuos esenciales de la enzima. Además, debe destacarse los bajos valores de constante de inactivación, obtenidos para D-glucosona y etil-D-glucopiranosido. Este resultado viene a apoyar las conclusiones obtenidas en otros apartados de este capítulo, que hacen referencia a estos sólidos como buenos soportes para la inmovilización de HRPc.

Un efecto diametralmente opuesto fue observado cuando los ensayos se realizaron a pH 4,5. A este valor de pH se observa una mayor inactivación que a pH 7,0 sobre todo en aquellos soportes que contienen grupos carbonilo oxidables a pH ácido (derivado de D-glucosona), o bien que posean grupos carboxilo (derivados de los ácidos

D-gulónico y D-glucurónico) que en presencia de H_2O_2 dan lugar a perácidos, altamente inactivadores. Este efecto es más marcado en monosacáridos que en otros compuestos polihidroxílicos, debido al enlace glicosídico que presentan.

Para el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, la disminución en el valor de la constante de inactivación a pH 4,5 en un 50% al pasar a un medio de pH 7,0 puede ser debido a que en medio neutro los grupos aldehído liberados no sufrirán oxidación por efecto del H_2O_2 y por lo tanto el soporte de inmovilización final no provocará la inactivación de la enzima adsorbida.

Los soportes que no contienen grupos fácilmente oxidables que pueden verse afectados por el pH del medio de ensayo (derivados de D-arabinosa, D-sorbitol y D-manitol), muestran los valores más bajos de constante de inactivación a pH 4,5. En este sentido, es significativo observar que el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido cuyo C_1 se encuentra bloqueado por la formación de un enlace glicosídico con un grupo etilo, posee un valor de constante de inactivación a pH ácido sensiblemente inferior al mostrado por el soporte obtenido a partir de su hidrólisis y liberación del C_1 (2,3,4,6-tetracinoil-D-glucopiranososa) con la consiguiente posibilidad de sufrir una posterior oxidación. Además, el derivado de etil-D-glucopiranosido muestra un valor de constante de inactivación similar a los dos valores de pH ensayados, posiblemente, debido a que al encontrarse dicho C_1 bloqueado, no será sensible a los cambios de pH del medio.

Para el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol, al pasar a un medio de pH neutro, se observa una tendencia similar a la encontrada para la enzima soluble. Es decir, la constante de inactivación se hace mayor que a pH ácido aunque no llega a alcanzar el valor mostrado para la enzima soluble.

TABLA 4.11

Constantes de inactivación por efecto del H₂O₂ a pH 4,5 y 7,0 de HRPc inmovilizada sobre cada uno de los derivados cinamoilados estudiados y de HRPc soluble.

Cinamato de:	k_i ; pH 4,5 (min^{-1})	k_i ; pH 7,0 (min^{-1})
D-arabinosa	0,0830	
D-sorbitol	0,0818	0,1058
D-manitol	0,0828	
1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa	0,1084	
3,5,6-Tricinamoil-D-glucofuranosa	0,0743	
Etil-D-glucopiranósido	0,0818	0,0760
2,3,4,6-Tetracinamoil-D-glucopiranosa	0,1001	
D-glucosa	0,1020	0,0730
Maltosa	0,1073	
Dextrina	0,1099	0,0928
Dextrano	0,1130	
D-fructosa	0,1271	0,1057
Sacarosa	0,0913	
Inulina	0,1009	0,0804
D-glucosona	0,1237	0,0663
Ácido D-gulónico	0,1225	
Ácido D-glucurónico	0,1287	
HRPc soluble	0,0529	0,1498

El medio de reacción incluyó H₂O₂ 10 mM y ABTS 0,75 mM en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5) o tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). HRPc soluble: La enzima tuvo una concentración de 0,99 ng/mL (pH 4,5) ó de 9,9 ng/mL (pH 7,0). HRPc inmovilizada: Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad inicial de la enzima inmovilizada se midió en continuo. Ensayo de inactivación: Registro de absorbancias medidas a 414 nm durante 30 minutos a intervalos de 1 segundo.

4.3.3 Inactivación por tiempo de almacenado

4.3.3.1 Almacenado de HRPc soluble

Este ensayo se realizó para comprobar si la enzima perdía actividad enzimática con el tiempo de almacenado en los diferentes medios de ensayo empleados, sobre todo durante el tiempo empleado para la inmovilización de la enzima. Los medios de almacenado empleados fueron agua destilada, tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5), tampón fosfato sódico 0,1 M de pH 7,0 y tampón fosfato potásico 0,1 M de pH 9,1 a una temperatura que osciló entre 0 y 4°C. Las medidas de actividad enzimática fueron realizadas a tiempo cero, 2 horas y 21 horas. La concentración de enzima en el medio de almacenado (4,9 µg/mL) fue similar a la empleada durante los ensayos de inmovilización. Para controlar la actividad enzimática, el medio de almacenado se ensayó tal y como se indica en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos.

Apenas pudieron observarse diferencias entre los valores iniciales de actividad enzimática para las disoluciones preparadas en agua destilada, pH 7,0 y 9,1. Sin embargo, se detectó menor actividad enzimática que en los casos anteriores cuando la enzima se preparó a pH 4,5. No se detecta que se produzca pérdida de actividad enzimática ni tras las dos primeras horas de almacenado ni en el ensayo que se realizó tras las 21 horas de almacenado, en todas las condiciones de almacenado ensayadas. Por lo tanto, no se produce una pérdida de actividad enzimática significativa durante el tiempo empleado para la inmovilización.

4.3.3.2 Almacenado de HRPc inmovilizada

Como se estableció en el capítulo de Introducción, un factor de gran interés a tener en cuenta, desde un punto de vista industrial y económico, es la estabilidad de los inmovilizados enzimáticos frente al tiempo de almacenado, por la posibilidad de su reutilización. Para ello, en este apartado se estudiará el efecto de las condiciones y tiempo de almacenado sobre la estabilidad de los inmovilizados de HRPc.

Condiciones de almacenado

Como sólido de inmovilización se empleó el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido. Tras un ensayo de actividad enzimática inicial, las fracciones fueron lavadas a fondo haciendo recircular agua destilada a través de las jeringuillas mediante la bomba peristáltica y, finalmente, fueron secadas mediante succión a presión reducida. Por último, las jeringuillas fueron cerradas por su extremo inferior, se le añadió

el medio de almacenado correspondiente y se almacenaron a una temperatura de -18°C . Las condiciones de almacenado ensayadas fueron las indicadas en la Tabla 4.12.

Después del tiempo de almacenado, las jeringuillas con sus contenidos se sacaron del congelador y descongelaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El medio de almacenado se recogió y se midió su actividad enzimática para controlar la enzima liberada al medio durante su almacenado del modo indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. La reacción enzimática fue iniciada mediante la adición de 1 mL de medio de almacenado. El dato obtenido fue corregido por el correspondiente factor de dilución para que la medida fuera comparable a la obtenida para la enzima inmovilizada. Tras lavar y secar las fracciones mediante succión a presión reducida, se volvió a ensayar su actividad enzimática tal y como se indicó arriba. Los datos obtenidos son representados en la Tabla A4.20 así como en la Tabla 4.12.

TABLA 4.12

Efecto de la composición del medio de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Condiciones de almacenado	$t_{\text{almacenado}}$	V_r (%)
Agua destilada	1h30minutos	100
Agua destilada	7 días	72,55
Seca con P_2O_5 2 horas + Agua destilada	7 días	66,25
Seca con P_2O_5 2 horas	7 días	58,92
Tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5)	7 días	9,82
Tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0)	7 días	8,82
Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1)	7 días	51,65

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de $4,9 \mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C . Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. Almacenado (5 mL) a una temperatura de -18°C . La actividad de la enzima inmovilizada, en todos los casos, así como la liberada al medio de almacenado se midió en continuo. Los resultados de este ensayo se presentan como tanto por cien de la actividad residual con respecto a la actividad enzimática que inicialmente mostraba el inmovilizado de cada jeringuilla, antes de ser almacenada en las condiciones arriba citadas.

El tiempo mínimo necesario para que una fracción se congele completamente fue de una hora y treinta minutos. Con este ensayo se intentó comprobar el efecto de la congelación y descongelación sobre la actividad enzimática mostrada por las preparaciones en primera medida. Así se comprobó que debido a este hecho la actividad enzimática cayó hasta un 47,76%. Este dato fue tomado como 100%, a partir del cual se dieron el resto de porcentajes mostrados en las tablas y apéndices arriba indicados.

La actividad enzimática medida en los medios de almacenado fue nula en todos los casos ensayados. Además, de todos los medios de almacenado ensayados, el agua destilada ofreció los mejores resultados.

Tiempo de almacenado

Tras el estudio realizado en el punto anterior se determinó elegir como medio de almacenado para la enzima inmovilizada, agua destilada. En este apartado se empleó como tiempo de almacenado tiempos comprendidos entre 1 hora y 9 meses. Por lo tanto, de cada sólido de inmovilización se preparó una jeringuilla de inmovilizado para cada tiempo de almacenado estudiado. Como sólido de inmovilización se emplearon los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona, D-sorbitol, inulina y etil-D-glucopiranosido. La medida de la actividad enzimática inicial de cada fracción, así como su seguimiento durante y tras el almacenado se realizó tal y como se indicó en el apartado anterior.

Los datos obtenidos son representados en las Tablas A4.21-24 y en las Figuras A4.18-21. Los resultados son representados conjuntamente en la Tabla 4.13 así como en la Figura 4.5. El ensayo realizado tras una hora de almacenado en las condiciones arriba citadas, se tomó como ensayo inicial (100%) a partir del cual representar los datos mostrados en las tablas y apéndices arriba indicados. Con este ensayo se comprobó el efecto de la congelación y descongelación sobre la actividad enzimática mostrada por diferentes preparaciones ensayadas en primera medida. Así se comprobó que debido a este hecho la actividad enzimática cayó hasta un 44,5%, 57,3%, 45% y 30,1% para los derivados totalmente cinamoilados de D-sorbitol, D-glucosona, etil-D-glucopiranosido e inulina, respectivamente.

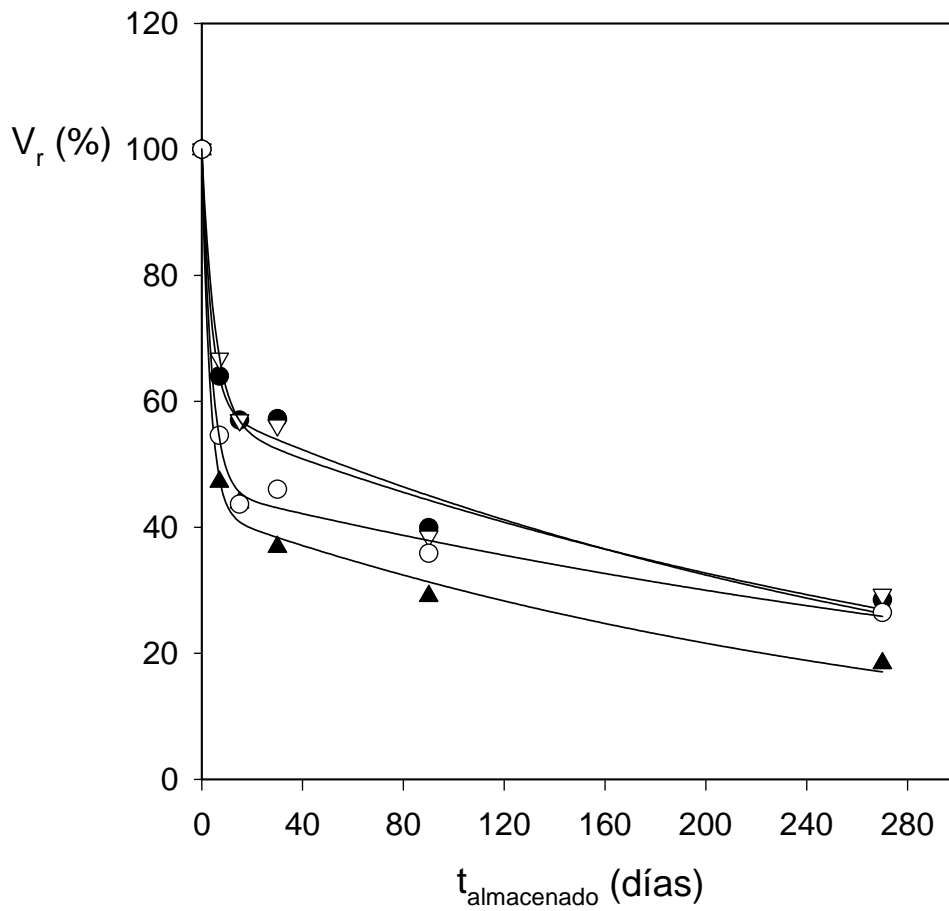
La actividad enzimática medida en los medios de almacenado fue despreciable en todos los casos ensayados.

TABLA 4.13

Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de D-sorbitol, D-glucosona, etil-D-glucopiranosido e inulina.

Cinamato de:	Tiempo de almacenado					
	1 hora	7 días	15 días	30 días	90 días	270 días
D-sorbitol	100	64,00	57,00	57,24	39,93	28,48
D-glucosona	100	47,22	43,95	36,89	29,09	18,43
Etil-D-glucopiranosido	100	66,79	57,00	56,20	38,58	29,32
Inulina	100	54,59	43,65	46,04	35,86	26,48

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 µg/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. Almacenado (5 mL) en agua destilada a una temperatura de -18°C. La actividad de la enzima inmovilizada, en todos los casos, así como la liberada al medio de almacenado se midió en continuo. Los resultados de este ensayo son presentados como el tanto por ciento de la actividad residual con respecto a la actividad enzimática que inicialmente presentaba el inmovilizado de cada jeringuilla, antes de ser almacenada en las condiciones arriba citadas.

**FIGURA 4.5**

Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de (λ) D-sorbitol, (σ) D-glucosona, (∇) etil-D-glucopiranosido e (O) inulina.

Representación de la actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de almacenado, $t_{almacenado}$ (días). En todos los casos el almacenado se realizó con 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -18°C , durante el tiempo arriba citado.

El ajuste por regresión no lineal de los datos representados en la Figura 4.5 permitió obtener los resultados correspondientes a las constantes de inactivación debidas al tiempo de almacenado mostradas en la Tabla 4.14 que se indica a continuación.

TABLA 4.14

Constantes de inactivación por efecto del almacenado de HRPc inmovilizada.

Parámetro	Derivado totalmente cinamoilado de:			
	D-sorbitol	D-glucosona	Etil-D-glucopiranosido	Inulina
$A_{(1)} (\%)$	40,946	57,497	43,229	54,147
$k_{i(1)} (\text{min}^{-1})$	0,270	0,317	0,191	0,258
$A_{(2)} (\%)$	59,051	42,473	56,730	45,895
$k_{i(2)} (\text{min}^{-1})$	0,003	0,003	0,003	0,002

Uno de los resultados más interesantes de este apartado muestra el menor efecto de la congelación-descongelación sobre la actividad enzimática de HRPc cuando se había inmovilizado sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona. También se puede observar cómo HRPc pierde una gran actividad durante la primera semana de almacenado y que corresponde con la primera fase de inactivación. Posteriormente, HRPc sufre una pérdida mínima de actividad enzimática en los sucesivos tiempos de almacenado ensayados. Este hecho se soporta mediante el valor de las constantes de inactivación obtenidas en las dos etapas, siendo la primera de ellas hasta dos órdenes de magnitud mayor que la segunda. En general, los valores de actividad enzimática retenidos a los 270 días de almacenado fueron de aproximadamente un 30% del valor inicial, lo cual supone un alto grado de estabilización.

4.4 CÁLCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS

La actividad enzimática viene determinada por una serie de parámetros cinéticos que definen la actuación de una enzima. Entre ellos la velocidad máxima de la reacción y la constante de Michaelis dan una idea general de la eficacia de la catálisis y la afinidad de una enzima por sus sustratos correspondientes. En un primer lugar se calcularon las constantes cinéticas de HRPc soluble, para que sirvieran de referencia a la hora de

comparar con los valores obtenidos para la enzima inmovilizada. Además, se estudió el efecto de los diversos soportes de inmovilización sobre estos dos parámetros cinéticos.

4.4.1 Caracterización cinética de HRPc soluble

Usando una concentración fija de H_2O_2 (150 μM) se determinó la velocidad inicial de la reacción a distintas concentraciones de ABTS (25-500 μM) en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La actividad enzimática se midió como es indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos para la enzima soluble. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla A4.25 y en la Figura A4.22, y muestran una dependencia hiperbólica de la velocidad inicial de la enzima con la concentración de ABTS. Estos datos fueron ajustados por regresión no lineal a la ecuación de una hipérbola con dos parámetros, $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ y la K_m^{app} para el ABTS (Rodríguez-López et al., 2000). Estos datos se muestran en la Tabla 4.15.

Para determinar las constantes cinéticas respecto al otro sustrato de la reacción, peróxido de hidrógeno, se fijó una concentración de ABTS de 500 μM mientras que la concentración de H_2O_2 osciló entre 25-250 μM en el mismo tampón indicado anteriormente. En este caso también se observó una dependencia hiperbólica de la velocidad inicial de la enzima con respecto a la concentración de peróxido de hidrógeno (Tabla A4.26 y Figura A4.23). Analizando de la manera indicada anteriormente se calcularon los valores correspondientes a la $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ y K_m^{app} para el H_2O_2 . Los resultados se muestran en la Tabla 4.15.

4.4.2 Caracterización cinética de HRPc inmovilizada

4.4.2.1 Determinación de constantes cinéticas aparentes

Este apartado se diseñó con la finalidad de realizar un primer estudio orientativo sobre la bondad de los soportes de inmovilización en cuanto a su efecto cinético sobre la enzima y de proponer un método sencillo y reproducible, aplicable a enzimas inmovilizadas, para el cálculo de las constantes cinéticas. Para ello se utilizaron como soportes de inmovilización los derivados totalmente cinamoilados de D-fructosa, D-glucosa, dextrina e inulina. De cada sólido se prepararon dos jeringuillas para la realización de este estudio.

Para cada jeringuilla se prepararon siete fracciones de disolución de ABTS y H_2O_2 en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). Para calcular la K_m^{app} para ABTS, la

concentración de H_2O_2 se fijó en $400 \mu\text{M}$ para todas las fracciones, mientras que la concentración de ABTS osciló entre $25\text{-}500 \mu\text{M}$. Por su parte, para calcular la K_m^{app} para H_2O_2 , la concentración de ABTS se fijó en $500 \mu\text{M}$ para todas las fracciones, mientras que la concentración de H_2O_2 osciló entre $50\text{-}400 \mu\text{M}$. En los casos en que la enzima se inmovilizó sobre los cinamatos de inulina y dextrina, cuando se estudió la K_m^{app} para este sustrato, su concentración se varió entre $25\text{-}250 \mu\text{M}$ para garantizar un buen seguimiento de la cinética de saturación. El ensayo se inició con una medida de control, que es el mismo para los inmovilizados de todas las jeringuillas, donde la concentración de H_2O_2 fue $100 \mu\text{M}$ y la concentración de ABTS fue $200 \mu\text{M}$. Así se estimó la actividad enzimática inicial de los inmovilizados de cada una de las jeringuillas y los valores obtenidos fueron corregidos teniendo en cuenta este resultado inicial. La absorbancia fue registrada a 414 nm durante 30 minutos.

Como es mencionado en el párrafo anterior, el ensayo se inició con la disolución de control, se siguió por la disolución con menor concentración del sustrato ensayado y se acabó con la que contenía la mayor concentración de dicho sustrato. Para cada fracción de disolución de sustratos se registró su absorbancia correspondiente durante 2 minutos tras los cuales, se retiró el medio de reacción y se le añadió rápidamente la siguiente fracción de disolución de sustratos. Para la fracción de disolución de sustratos con menor concentración del sustrato estudiado se requirió un tiempo de registro de 3 minutos debido a un período de retardo o “lag” que presentó su medida.

El registro de absorbancias tuvo diferentes pendientes. Una para cada disolución de sustratos ensayada. Los resultados de actividad enzimática fueron medidos en el tramo recto inicial de cada una de las pendientes registradas. Los resultados obtenidos son mostrados en las Tablas A4.27-34 y en las Figuras A4.24-39, así como en la Tabla 4.15.

4.4.2.2 Determinación de constantes cinéticas absolutas

Una vez establecido y perfeccionado el método de determinación de las constantes cinéticas de HRPc presente en nuestros inmovilizados, se decidió realizar un estudio cinético completo correspondiente a un mecanismo ping-pong ordenado (dos sustratos, dos productos) (García-Moreno et al., 1999; Rodríguez-López et al., 2000), para los casos de HRPc inmovilizada en aquellos sólidos de inmovilización con los cuales se obtuvieron mejores resultados en los apartados precedentes (D-glucosona, D-sorbitol y etil-D-glucopiranosido). De cada sólido se prepararon seis jeringuillas para la realización

de este estudio. Para cada jeringuilla se prepararon siete fracciones de disolución de ABTS y H_2O_2 en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). Para cada fracción, la concentración de H_2O_2 es fija y la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM . Las concentraciones de H_2O_2 empleadas oscilaron entre 50-400 μM . El ensayo se inició con una medida de control, que es el mismo para los inmovilizados de todas las jeringuillas, donde la concentración de H_2O_2 fue 100 μM y la concentración de ABTS fue 200 μM . Así se estimó la actividad enzimática inicial de los inmovilizados de cada una de las jeringuillas y los valores obtenidos fueron corregidos teniendo en cuenta este resultado inicial. El registro de absorbancias fue recogido a 414 nm durante 30 minutos.

Como es mencionado en el párrafo anterior, el ensayo se inició con la disolución de control, se siguió por la disolución con menor concentración de ABTS y se acabó con la que contenía la mayor concentración de ABTS. Para cada fracción de disolución de sustratos se registró su espectro correspondiente durante 2 minutos tras los cuales, se retiró el medio de reacción y se le añadió rápidamente la siguiente fracción de disolución de sustratos. Para la fracción de disolución de sustratos con menor concentración de ABTS se requirió un tiempo de registro de 3 minutos debido al período de retardo o “lag” que presentó su medida.

El registro de absorbancias que se recogió tuvo diferentes pendientes. Una para cada disolución de sustratos ensayada. Los resultados de actividad enzimática fueron medidos en el tramo recto inicial de cada una de las pendientes registradas. Los tres sólidos ensayados mostraron un patrón de rectas paralelas que tienden a la saturación. El ajuste por regresión lineal de los resultados inicialmente obtenidos permitió calcular los valores de K_m para H_2O_2 y para ABTS, así como el correspondiente valor de $V_{m\acute{a}x}$.

Los resultados obtenidos son mostrados en las Tablas A4.35-37 y Figuras A4.40-66. El conjunto de los resultados obtenidos es representado en la Tabla 4.15.

Los valores de K_m^{app} y $V_{m\acute{a}x}^{app}$ para los sustratos ABTS y H_2O_2 , tanto para la enzima soluble como para la inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de D-fructosa, D-glucosa, inulina y dextrina, han sido calculados mediante ajuste por regresión no lineal de las gráficas iniciales mostradas en las Figuras A4.22-23, 26-27, 30-31, 34-35 y 38-39 respectivamente, obtenidas para la representación de la velocidad de reacción inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración del sustrato correspondiente, (μM). Por otro lado, los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de D-sorbitol, D-glucosona y etil-D-glucopiranosido, han sido calculados

mediante ajuste por regresión lineal de las gráficas finales mostradas en las Figuras A4.48, 57 y 66.

TABLA 4.15

Valores de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de HRPc soluble e inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de D-sorbitol, D-fructosa, D-glucosa, D-glucosona, etil-D-glucopiranosido, inulina y dextrina.

Cinamato de:	$K_m^{H_2O_2}$	K_m^{ABTS}	$V_{m\acute{a}x}$
	(μM)	(μM)	($\mu M/min$)
D-glucosona	108,58	126,63	7,37
Etil-D-glucopiranosido	154,26	139,33	8,34
D-sorbitol	176,12	189,02	20,45
D-fructosa	28,99	124,51	7,99
D-glucosa	25,63	88,62	3,92
Inulina	24,31	64,91	4,08
Dextrina	37,83	67,90	4,42
HRPc soluble	51,48	92,75	13,95

Los datos relacionados en la tabla muestran que, para el caso de la enzima soluble, los valores de las constantes de Michaelis para H_2O_2 y ABTS obtenidas se encuentran dentro del orden de magnitud de los valores anteriormente publicados por otros autores y que fueron de 42 μM (Rodríguez-López et al., 2000) y 100 μM (Hiner et al., 1996), respectivamente.

Para el caso de la enzima inmovilizada sobre nuestros soportes deberemos citar que se ha descrito en la bibliografía, que la cantidad de enzima inmovilizada y/o actividad enzimática mostrada por ésta, dependen de diferentes factores relacionados con la estructura de la matriz polimérica utilizada como soporte de inmovilización (Jayakumari y Rajasekharan-Pillai, 1991). Entre estos factores mencionaremos la naturaleza hidrofóbica-hidrofílica del soporte y, la naturaleza y extensión del entrecruzamiento producido, por la especial importancia que presentarán en los derivados cinamoilados sintetizados. Así, el soporte deberá tener un balance hidrofóbico-hidrofílico adecuado

para la enzima a inmovilizar, y también se ha relatado que la actividad y extensión de la inmovilización disminuyeron cuando la densidad del entrecruzamiento aumentó.

La velocidad máxima de la enzima inmovilizada depende directamente de la cantidad de ésta fijada al soporte. Si bien es difícil obtener conclusiones a partir de este parámetro cinético, sin embargo, los resultados obtenidos son coherentes con los mostrados en la Tabla 4.6 (apartado 4.2), que hacen referencia a la actividad enzimática inicial mostrada por HRPc inmovilizada sobre los soportes preparados.

Una información independiente de la cantidad de enzima inmovilizada puede obtenerse utilizando los datos de las constantes de Michaelis.

El derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol presenta una estructura abierta con total libertad de giro de sus grupos cinamoilo y por lo tanto la facilidad para orientar los grupos cinamoilo y dimerizar será mayor que en los demás. Esto dará lugar, además de un excesivo carácter hidrofóbico, a una red polimérica muy entrecruzada y rígida responsable de que la enzima retenida se encuentre en condiciones desfavorables y de ahí los valores mostrados por sus constantes de Michaelis.

Para el derivado de etil-D-glucopiranosido, el grado de sustitución de grupos cinamoilo es inferior, en dos unidades, al mostrado por el derivado de D-sorbitol. Además ya se parte de una estructura rígida debido a la imposibilidad del anillo a abrirse y establecer un equilibrio entre los anómeros α y β a través de una estructura abierta. Por lo tanto la dimerización de sus grupos cinamoilo también dará lugar a una estructura rígida responsable de los valores mostrados para sus constantes de Michaelis.

Por otro lado, el derivado de D-glucosona, que muestra unos elevados valores de sensibilidad umbral y velocidad global de reacción (apartado 3.2.5.2) tendrá una gran facilidad para dimerizar y polimerizar. Esto hace que los valores obtenidos en sus constantes de Michaelis también sean superiores a los obtenidos para la enzima soluble, como ocurre con los anteriores soportes estudiados, pero debido, posiblemente, a una mayor polaridad del soporte (quizá por hidratación de los grupos carbonilo), que facilitará la difusión de los sustratos y/o productos de reacción a través de la red, hace que los valores obtenidos para sus constantes de Michaelis, aunque dentro del mismo orden de magnitud, sean ligeramente inferiores.

El resto de soportes de inmovilización aquí estudiados mostraron unos valores de constantes de Michaelis inferiores a los correspondientes a la enzima soluble, y entre 3 a 6 veces menores que los obtenidos para la enzima retenida sobre los anteriores soportes

de inmovilización. Esto supone una adecuada acomodación y orientación de la enzima en estos soportes de inmovilización que hacen que la afinidad de la enzima por sus sustratos aumente y que la reacción enzimática transcurra de un modo más favorable, tal y como se desprende de los valores de las constantes de Michaelis obtenidas. Debe destacarse el caso del derivado de inulina de la que ya se afirmó que mostró los valores más bajos de sensibilidad umbral y velocidad global de reacción (apartado 3.2.5.2), por lo que junto con su elevado tamaño molecular dará lugar a soportes poliméricos menos entrecruzados y por lo tanto más porosos, lo que facilitará la acomodación de la enzima en su estructura. Esta posibilidad puede estar justificada por los bajos valores de las constantes de Michaelis obtenidas para ambos sustratos, que son las más bajas de todas las determinadas, lo que indica que en estas condiciones la enzima HRPc muestra mayor afinidad por H_2O_2 y ABTS que en las otras ensayas.

4.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RESIDUAL DEBIDA A INTERACCIONES NO HIDROFÓBICAS

La presencia de grupos reactivos en los soportes de inmovilización utilizados, especialmente en aquellos que mostraron unos buenos resultados en los ensayos realizados en apartados anteriores de este capítulo, llevó a intentar la inmovilización de HRPc mediante la formación de enlaces covalentes, ya sea directamente o tras la acción de un agente reductor adecuado. Además, la sencillez del método de deposición de la capa de soporte de inmovilización, así como la uniformidad de las extensiones obtenidas, permitió ensayar la retención de la enzima por el método de atrapamiento.

4.5.1 Contribución de la actividad enzimática retenida covalentemente

4.5.1.1 Ensayos con monómeros reactivos

El proceso previo de preparación de las bolas de vidrio con el soporte de inmovilización y posterior inmovilización de la enzima y lavado de la débilmente retenida, es similar a como se ha venido indicando en capítulos anteriores de esta Memoria. Tras eliminar la enzima débilmente enlazada, cada fracción fue lavada, a fondo, con un detergente no iónico para eliminar la enzima retenida por las fuertes interacciones hidrofóbicas descritas en capítulos anteriores (3.4.1).

Para este estudio se utilizaron los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona, etil-D-glucopiranosido, 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa y *p*-hidroxibenzaldehído. En los primeros ensayos realizados, las diferentes fracciones a

estudiar se prepararon con tres capas de sólido de inmovilización. En las fracciones cuyo sólido de inmovilización contenía el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido, éste fue hidrolizado a pH 3,0 del modo indicado en el apartado 2.2.3.1 de Materiales y Métodos, dando lugar a 2,3,4,6-tetracinamoil-D-glucopiranososa que contenía un grupo aldehído hemiacetalico (libre en su estructura abierta). Por otra parte, la hidrólisis en condiciones similares (2 horas, en dos períodos de 1 hora cada uno) de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa (del modo indicado en el apartado 2.2.3.2 de Materiales y Métodos) generó el 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa, tras hidrolizar los grupos 1,2-O-isopropilidén y formar grupos OH- libres. Este segundo sólido debe ser susceptible de sufrir reagrupamiento de Amadori (Schacht et al., 1993a; Ellis, 1959) y dar lugar a un enlace covalente irreversible (amina secundaria).

Tras la inmovilización de la enzima y lavado inicial, las diferentes muestras a ensayar fueron secadas succionando con succión a presión reducida y lavadas, a fondo, con sucesivas fracciones de una disolución acuosa al 1,5% de Tritón X-114, hasta que las fracciones de lavado finales no mostraron actividad enzimática significativa. Después del lavado con detergente, las muestras fueron enjuagadas haciendo pasar agua destilada fría en contracorriente durante 10 minutos más. La actividad enzimática de las fracciones de almacenado con detergente se ensayó del modo indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 4.16.

TABLA 4.16

Actividad enzimática retenida de HRPc inmovilizada sobre monómeros reactivos.

Cinamato de:	V_0	Almacenado^a
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)
2,3,4,6-Tetracinamoil- D-glucopiranososa	0,051	0,261
D-glucosona	0,090	1,866
3,5,6-Tricinamoil-D-glucosa	0,014	0,264

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 15 g/L y se prepararon con tres capas de soporte. La concentración de HRPc fue de 19,6 μ g/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada así como la liberada al medio de almacenado con detergente se midió en continuo. (a) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-114).

Con objeto de lograr una inmovilización adecuada con monómeros como el derivado totalmente cinamoilado de *p*-hidroxibenzaldehído o el que resulta de la hidrólisis del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa, se pretendió mejorar los resultados arriba obtenidos preparando un sólido de inmovilización formado por el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol entrecruzado en una relación 1:1 con cada uno de los monómeros arriba indicados. Tras un proceso de preparación de las bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización, proceso de inmovilización, lavado y medida final similares en método y cantidades a las arriba descritas se obtuvieron unos resultados mostrados en la Tabla 4.17.

TABLA 4.17

Actividad enzimática retenida de HRPc inmovilizada sobre monómeros reactivos entrecruzados con un monómero base.

Cinamato de:	V₀	Almacenado^a
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)
D-manitol + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	0,017	0,245
D-manitol + <i>p</i>-hidroxibenzaldehído	0,025	0,307

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 15 g/L y se prepararon con tres capas de soporte. La concentración de HRPc fue de 19,6 μ g/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada así como la liberada al medio de almacenado con detergente se midió en continuo. (a) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-114).

Se puede comprobar que los resultados mostrados en esta última tabla no mejoran significativamente los resultados inicialmente obtenidos. Tras investigar el efecto del tiempo de irradiación sobre la capacidad de retención de actividad enzimática, por parte de nuestros sólidos de inmovilización, se concluyó que realmente las muestras aquí ensayadas están principalmente afectadas por este factor, debido al modo en que las muestras fueron preparadas, que supuso un tiempo de irradiación total de 45 minutos. Por ello, en los ensayos siguientes, se decidió recubrir las bolas de vidrio con una sola capa de sólido de inmovilización.

4.5.1.2 Ensayos con mezclas de soportes de inmovilización

Para este estudio se empleó, inicialmente, como sólido de inmovilización, el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol entrecruzado, en una relación 1:1, con los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona, *p*-hidroxibenzaldehído y 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa. En las fracciones cuyo sólido de inmovilización contenía el derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa, el sólido fue hidrolizado a pH 5,0, del modo indicado en el apartado 2.2.3.2 de Materiales y Métodos. Tras la inmovilización se procedió al lavado de los inmovilizados usando Tritón X-100 y siguiendo los lavados 6.A y 6.B descritos en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos, dependiendo de si las fracciones son ensayadas antes de ser lavadas con detergente o no, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.18.

TABLA 4.18

Actividad enzimática retenida de HRPc inmovilizada sobre una mezcla de sólidos de inmovilización.

Cinamato de:	V_0	Almacenado ^a	V_f	R
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
D-manitol + <i>p</i> -hidroxibenzaldehído	0,459	0,372	0,024	5,23
D-manitol + <i>p</i> -hidroxibenzaldehído	-----	1,353	0,057	4,04
D-manitol + D-glucosona	1,446	1,614	0,106	7,33
D-manitol + D-glucosona	-----	3,807	0,184	4,61
D-manitol + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	0,284	0,156	0,019	6,69
D-manitol + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	-----	0,783	0,073	8,53

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 2,5 g/L. La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo que osciló entre 12-18 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones de almacenado con detergente se ensayó en continuo. (a) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-100).

Si se observa las fracciones en las que no se determinó inicialmente la actividad enzimática inmovilizada y fueron sometidas a un lavado, a fondo, con el detergente, se

comprueba que la actividad enzimática retenida por los sólidos de inmovilización en que están presentes los derivados totalmente cinamoilados de *p*-hidroxibenzaldehído y de D-glucosona, respectivamente, es similar aunque ligeramente superior para el que contiene al derivado de D-glucosona. Por otro lado, el sólido formado con el hidrolizado del derivado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa mostró un superior porcentaje de retención de actividad enzimática tras el lavado con detergente, en comparación con los dos anteriores. Estos datos son coherentes con el hecho que los dos primeros son similares por la presencia, en ambos, de un grupo aldehído reactivo, aunque el de D-glucosona es ligeramente más reactivo debido a la presencia en posición C-2 de otro grupo carbonilo. Por su parte, el tercero de los sólidos estudiados, tras ser hidrolizado para formar grupos -OH libres, es susceptible de sufrir reagrupamiento de Amadori y por lo tanto formar un enlace covalente irreversible que daría lugar a unos porcentajes de retención superiores en comparación con los otros dos sólidos de inmovilización. El esquema de la reacción que tendría lugar es mostrado en la Figura 4.6.

Al observar las fracciones en que inicialmente es medida la actividad enzimática retenida en las bolas de vidrio y, después son lavadas, a fondo, con el detergente, una discusión similar puede realizarse. Sin embargo, en este caso parece que los porcentajes obtenidos para los sólidos formados con el derivado de D-glucosona y 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa son similares. Es de destacar que tras el lavado con detergente, la fracción que contiene el derivado de D-glucosona, libera una actividad enzimática superior a la inicialmente presente en las bolas de vidrio. Esto podría indicar algún tipo de interacción de la enzima con el soporte de inmovilización que conduciría a una disminución de la actividad enzimática con respecto a la actividad mostrada por la enzima soluble (Husain y Jafri, 1995; Husain et al., 1996). Esta circunstancia no se ha producido con ningún otro soporte de inmovilización.

Es también destacable el hecho de que el sólido formado con el hidrolizado del derivado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa posee los mayores porcentajes finales de retención de actividad enzimática, a pesar de que los valores iniciales retenidos son bastante inferiores a los mostrados por los otros dos soportes de inmovilización, debido, entre otras causas, a la mayor polaridad de este soporte tras su hidrólisis, en comparación con los otros dos sólidos utilizados.

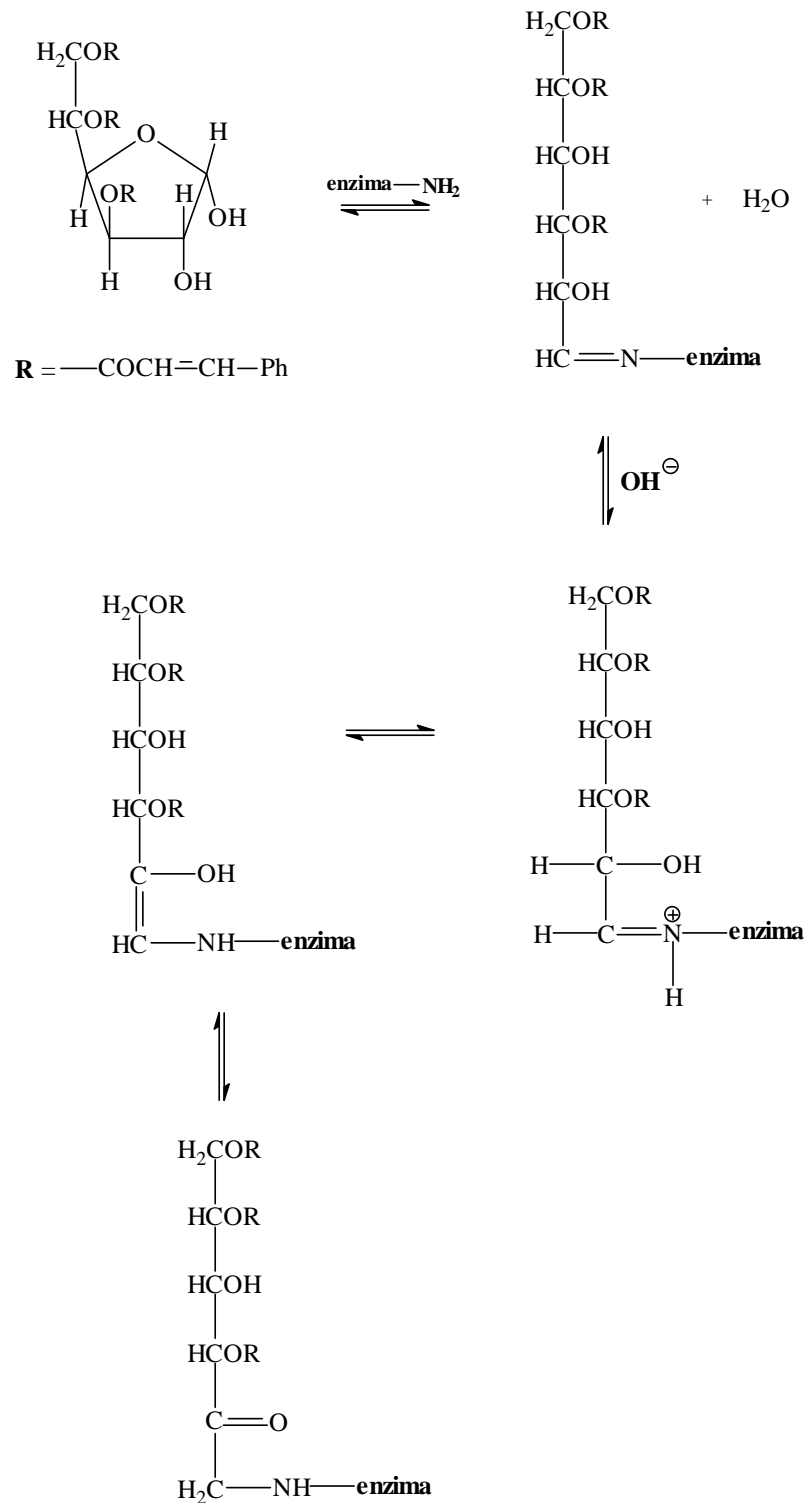


FIGURA 4.6

Transposición de Amadori de las bases de Schiff.

4.5.1.3 Empleo de agentes reductores durante tiempos cortos de inmovilización

Con la finalidad de mejorar los resultados obtenidos en el apartado anterior, se decidió utilizar NaBH_4 y NaBH_3CN como agentes reductores, con el propósito de reducir los posibles enlaces covalentes reversibles inicialmente formados (bases de Schiff) entre la enzima y el sólido de inmovilización para formar un enlace covalente irreversible (amina secundaria) (Stowell y Lee, 1980; Trüeb et al., 1982). Para este estudio se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.19.

TABLA 4.19

Efecto de la presencia de agentes reductores durante la inmovilización de HRPc.

Agente reductor	V_0	Almacenado ^a	V_f	R
	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	(%)
(NaBH_4)	0,245	0,117	0,019	7,76
(NaBH_4)	-----	0,222	0,017	7,11
(NaBH_3CN)	0,130	0,054	0,024	18,46
(NaBH_3CN)	-----	0,129	0,036	21,82

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. El sólido de inmovilización empleado fue el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona (2,5 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 2 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Concentración de los agentes reductores 0,24 M. Las muestras fueron lavadas y ensayadas de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. (a) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-100).

Los valores de actividad enzimática mostrados por la enzima inmovilizada y las disoluciones de almacenado con detergente, son superiores cuando se empleó NaBH_4 como agente reductor que cuando se empleó NaBH_3CN . Sin embargo, los valores mostrados tras el lavado con detergente fueron inferiores. La combinación de ambos efectos hace que los porcentajes de retención de actividad enzimática por interacciones no hidrofóbicas sean superiores cuando se usó NaBH_3CN que cuando fue empleado NaBH_4 .

Aunque en los dos casos aquí ensayados se mejora los porcentajes de retención obtenidos, en comparación a los mostrados en el apartado 4.5.1.2 anterior, en que este mismo sólido fue empleado, sin embargo los valores de actividad enzimática absolutos son muy inferiores a los entonces obtenidos. Este hecho puede ser debido a la acción de los agentes reductores empleados sobre la enzima usada, que podrá originar reducciones tanto sobre su parte proteica como sobre su parte hidrocarbonada estimada en aproximadamente un 20% (Welinder, 1985; Tams y Welinder, 1998). Además, puede ocurrir que el efecto negativo sobre HRPc sea más intenso por parte de NaBH_3CN que de NaBH_4 , quizá debido a la posible interacción de los grupos CN^- del primero con los átomos de Fe^{+3} de ferriperoxidasa y/o Fe^{+2} de la forma ferrosa tras su reducción, presentes en el grupo hemo de la proteína (Meunier et al., 1995; Phelps et al., 1971). Esto último sería la causa de que los valores de actividad enzimática obtenidos, tanto inicialmente inmovilizada sobre las bolas de vidrio como la liberada a las disoluciones de almacenado con detergente, sean menores cuando se empleó NaBH_3CN que cuando fue empleado NaBH_4 .

Además del efecto de los reductores empleados sobre la enzima utilizada, deberá mencionarse, también, un efecto de éstos sobre el propio proceso de inmovilización. Es decir, ambos agentes reductores provocarán la reducción de los grupos carbonilo presentes en el sólido de inmovilización, a alcoholes, con la consiguiente pérdida de grupos reactivos y un simultáneo aumento de la polaridad del sólido, que afectará negativamente, y por doble motivo, a la retención de enzima por parte de éste. Sin embargo, los valores finales obtenidos por la enzima inmovilizada son superiores, en cualquiera de los casos ensayados, cuando se empleó NaBH_3CN que cuando se empleó NaBH_4 . Esto puede ser debido a que el NaBH_4 es un reductor típico del grupo carbonilo, tanto de aldehídos como de cetonas. Sin embargo, el NaBH_3CN reduce a los grupos imino más rápidamente que a los grupos carbonilo, por lo que aunque ambos procesos tengan lugar cuando se emplee NaBH_3CN , la reducción de los enlaces imino formados entre la enzima y el sólido de inmovilización estará favorecida cinéticamente y tendrá lugar en una mayor extensión que la reducción de los grupos carbonilo presentes en el sólido y por lo tanto pérdida de grupos reactivos para la inmovilización de la proteína ensayada (Stowell y Lee, 1980; Trüeb et al., 1982).

4.5.1.4 Empleo de agentes reductores durante tiempos largos de inmovilización

Para intentar verificar las afirmaciones realizadas en el párrafo anterior, se repitió el ensayo, empleando el mismo sólido de inmovilización, y utilizando las mismas condiciones tanto de preparación de las bolas de vidrio con el soporte como para la inmovilización de la enzima HRPc. En dos de las fracciones la enzima fue inmovilizada en presencia de cada uno de los reductores citados. En las otras dos fracciones, la enzima fue inicialmente inmovilizada durante un tiempo de 21 horas y posteriormente fue añadida una disolución del reductor correspondiente, en el tampón de inmovilización y se dejó reaccionar durante 2 horas más. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.20.

TABLA 4.20

Efecto de la presencia de agentes reductores durante la inmovilización de HRPc.

Agente reductor	V ₀	Almacenado ^c	V _f	R
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
(NaBH ₄) ^a	-----	0,468	0,044	8,59
(NaBH ₄) ^b	-----	0,195	0,022	10,14
(NaBH ₃ CN) ^a	-----	0,639	0,050	7,26
(NaBH ₃ CN) ^b	-----	0,087	0,025	22,32

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. El sólido de inmovilización empleado fue el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona (2,5 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 23 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Concentración de los agentes reductores 0,24 M. Lavado 6.C descrito en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones de almacenado con detergente se ensayó en continuo. (a) Muestras inmovilizadas en ausencia de reductor, y adición posterior de éste durante dos horas más. (b) Muestras inmovilizadas en presencia del reductor correspondiente. (c) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-100).

Los datos obtenidos para las fracciones en que el agente reductor correspondiente estuvo presente en el medio durante todo el tiempo de inmovilización muestran que el NaBH₄ no indujo cambios significativos sobre la actividad enzimática ni a las dos ni a las 23 horas de inmovilización. Sin embargo, cuando se empleó NaBH₃CN se observó una caída significativa de la actividad en función del tiempo de inmovilización

empleado. Esto puede ser debido a que realmente, el NaBH_3CN esté afectando a la proteína, tal que a mayor tiempo de actuación mayor inactivación le provocará.

Si se presta atención a los resultados obtenidos en las fracciones en que inicialmente la enzima fue inmovilizada sin la presencia del agente reductor, se comprueba que los valores de actividad obtenidos, tanto en la disolución de almacenado con detergente como finalmente retenida sobre el sólido de inmovilización, son superiores a los presentes en los ensayos anteriormente realizados. Esto puede significar una estabilización de nuestra proteína cuando está retenida sobre el soporte frente a la acción de los reductores empleados, puesto que el tiempo que la proteína está en presencia de éstos, en ambos ensayos, es similar. Además, el porcentaje de retención final sobre el sólido de inmovilización, cuando se empleó NaBH_4 es ligeramente mayor a cuando se empleó NaBH_3CN . Este resultado puede ser razonable si se considera que ambos actuarán, tras la inmovilización inicial, como reductores de los enlaces imino inicialmente formados, tal que como el primero es un reductor más potente que el segundo, dará lugar a una mayor retención.

4.5.1.5 Efecto del tiempo de inmovilización en ausencia de reductores

Ensayando diferentes fracciones con igual sólido de inmovilización, se pudo comprobar que el tiempo utilizado para la inmovilización afecta a los resultados obtenidos. Para este estudio se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa. El sólido fue hidrolizado a pH 5,0, del modo indicado en el apartado 2.2.3.2 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.21.

Se observa que las fracciones en que el tiempo de inmovilización fue de 35 horas, la actividad enzimática mostrada, tanto inicialmente retenida en el sólido de inmovilización como en la disolución de almacenado con detergente, es significativamente inferior a cuando se empleó un tiempo de inmovilización de 12 horas. Además, en la fracción con un tiempo de inmovilización de 35 horas y en la que fue medida la actividad inmovilizada antes de lavar con detergente, la medida mostró un blanco que fue significativamente grande. Este efecto puede ser debido a una solubilización del sólido de inmovilización, sobre todo si éste está formado por monómeros pequeños y que además, requieren un elevado tiempo de irradiación para alcanzar un determinado grado de entrecruzamiento. Por lo tanto, al aumentar el tiempo

de inmovilización, la pérdida de sólido de inmovilización será mayor y, en consecuencia, la actividad enzimática retenida será menor.

TABLA 4.21

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida.

$t_{\text{inmov.}}$	V_0	Almacenado ^a	V_f	R
(horas)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	(%)
12	0,284	0,156	0,019	6,69
12	-----	0,783	0,073	8,53
35	0,138	0,045	0,011	7,97
35	-----	0,216	0,041	15,95

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. El sólido de inmovilización empleado fue el derivado totalmente cinamoilado de D-manitol entrecruzado, en una relación 1:1, con el 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa (2,5 g/L). La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 12 ó 35 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavados 6.A y 6.B descritos en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones de almacenado con detergente se ensayó en continuo. (a) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-100).

4.5.1.6 Efecto del tamaño del prepolímero de inmovilización

Este ensayo fue realizado para confirmar si realmente puede atribuirse a una solubilización del sólido de inmovilización, los bajos valores de actividad enzimática obtenidos en el apartado anterior, cuando se empleó un tiempo de inmovilización de 35 horas, en comparación a cuando se inmovilizó durante 12 horas. Para este estudio se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado totalmente cinamoilado de alcohol polivinílico (PVA) entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa. El sólido fue hidrolizado a pH 5,0, del modo indicado en el apartado 2.2.3.2 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.22.

TABLA 4.22

Efecto del tamaño del prepolímero de inmovilización.

Cinamato de:	V ₀	Almacenado ^a	V _f	R
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
D-manitol + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	0,284	0,156	0,019	6,69
D-manitol + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	-----	0,783	0,073	8,53
PVA + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	0,836	0,513	0,120	14,35
PVA + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	-----	0,927	0,217	18,97

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración de los sólidos de inmovilización fue de 2,5 g/L. La concentración de HRPc fue de 19,6 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 12 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavados 6.A y 6.B descritos en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada se midió en discontinuo, y la actividad enzimática de las fracciones de almacenado con detergente se ensayó en continuo. (a) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-100).

Se observa que al utilizar un polímero para la síntesis del sólido de inmovilización, los valores de actividad enzimática obtenidos en todas las medidas, tanto inmovilizada inicial y final, como en las disoluciones de almacenado con detergente son superiores a las obtenidas cuando se utilizó un monómero. Además, los porcentajes de retención final obtenidos son también bastante mejores a los obtenidos cuando el sólido de inmovilización fue de pequeño tamaño molecular. En general, sólo cuando el sólido de inmovilización estuvo constituido por un polímero de peso molecular elevado como PVA (Schacht et al., 1993a) o intermedio como inulina, pero con buen valor de densidad de entrecruzamiento (ρ) para un tiempo de irradiación determinado (Moliner, 1986), los valores de actividad enzimática obtenidos en cualquiera de las fracciones ensayadas son elevados, así como los porcentajes de retención final calculados, como puede comprobarse en la Tabla 4.23.

Sin embargo, y con respecto a lo indicado en el párrafo anterior, debe ser notado que sólo cuando en el sólido de inmovilización formado por un monómero como D-manitol también estuvo presente el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, entonces los valores obtenidos de actividad enzimática en todas las fracciones ensayadas, ya sea enzima inmovilizada como libre en disoluciones de almacenado con detergente, fueron también elevados, como se pudo poner de manifiesto en el apartado 4.5.1.2.

Este hecho podría indicar que cuando D-glucosona estuvo presente en el soporte de inmovilización, alguna interacción adicional pudo tener lugar con la enzima, que fuera responsable de estos altos valores de actividad enzimática, en comparación a los obtenidos con otros soportes de inmovilización similares.

TABLA 4.23

Efecto del tamaño del prepolímero de inmovilización.

Cinamato de:	V_0	Almacenado ^a	V_f	R
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
PVA + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	0,836	0,513	0,120	14,35
PVA + 3,5,6-tricinamoil-D-glucosa	-----	0,927	0,217	18,97
Inulina (41%) + D-glucosona	-----	0,885	0,115	11,5

(a) Fracciones de almacenado con detergente.

4.5.2 Actividad enzimática retenida mediante el método de atrapamiento

Con este ensayo se pretende comprobar si el método de atrapamiento podría ser adecuado para la retención de actividad enzimática en nuestros sólidos de inmovilización. El derivado totalmente cinamoilado de inulina fue empleado para este estudio. Tras la inmovilización, se retiró el medio conteniendo la enzima y se hizo pasar una disolución en acetona o cloroformo del sólido de atrapamiento, formado por una mezcla del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona y un derivado parcialmente cinamoilado de inulina ya entrecruzados. Tras el lavado inicial, las diferentes muestras a ensayar fueron secadas mediante succión a presión reducida y lavadas, a fondo, con sucesivas fracciones de una disolución acuosa al 1,5% de Tritón X-114, hasta que las fracciones de lavado finales no mostraron actividad enzimática significativa. Después del lavado con detergente, las muestras fueron enjuagadas haciendo pasar agua destilada fría en contracorriente durante 10 minutos más. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4.24.

TABLA 4.24
Actividad enzimática retenida por HRPc inmovilizada por el método de atrapamiento.

Disolvente	Atrapamiento	Detergente	V₀ <i>(ΔA/min)</i>	Almacenado^a <i>(ΔA/min)</i>
Acetona	SI	SI	0,048	0,296
Acetona	SI	NO	0,121	-----
Cloroformo	SI	SI	0,096	0,598

Fracciones preparadas utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. El sólido de inmovilización fue el derivado totalmente cinamoilado de inulina (15 g/L). El sólido de atrapamiento estuvo formado por una mezcla al 50% del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona y el derivado de inulina cinamoilado un 41%, ya entrecruzados (2,5 g/L). Disolvente de atrapamiento: cloroformo o acetona. La concentración de HRPc fue de 4,9 μg/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado previo 4.A descrito en el apartado 2.5.1. La actividad de la enzima inmovilizada así como la liberada al medio de almacenado con detergente se midió en continuo. (a) Fracciones de almacenado con detergente (Tritón X-114).

Si se tiene en cuenta que lo que suele quedar retenido sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina, en condiciones similares de ensayo y lavado normal, supone una actividad enzimática aproximada de 0,332 ΔA/min, la actividad aquí observada tras el atrapamiento, usando acetona como disolvente, y lavado normal supone aproximadamente un 37% de la obtenida por un mecanismo de simple adsorción. Esto pone de manifiesto lo agresivo que resulta ser, en general, este método de inmovilización en comparación con el resto de métodos disponibles, sobre todo si consideramos que los disolventes orgánicos como cloroformo, o como en este caso, acetona, juegan un papel fundamental (Chibata, 1978).

Cuando se empleó acetona como disolvente, la actividad enzimática que quedó retenida en el sólido de inmovilización tras el lavado con la disolución jabonosa supuso aproximadamente un 40% de la que quedó tras un lavado normal sin detergente en la otra fracción también sometida a atrapamiento. Además, la enzima que queda finalmente retenida sobre las bolas de vidrio muestra una actividad enzimática que representa el 14,46% con respecto a la que quedó para la enzima simplemente adsorbida y lavada de modo normal. Por su parte, cuando se empleó cloroformo como disolvente, la enzima que quedó finalmente retenida supuso el 28,92% con respecto al mismo dato de referencia.

De los resultados aquí mostrados se desprende que, a pesar de lo agresivo del método de inmovilización empleado hacia la enzima HRPc, los porcentajes de retención finales de actividad enzimática sobre los sólidos de inmovilización son del orden de los obtenidos en los mejores casos de los estudiados en el apartado 4.5.1 anterior, aunque por encima de ellos se encuentra el aquí obtenido cuando se empleó cloroformo como disolvente para la extensión del sólido de atrapamiento. A pesar de esto, no ahondaremos más en la posibilidad de utilizar este método de inmovilización pues parece tener menor aplicabilidad.

Capítulo 5

5 INMOVILIZACIÓN DE β -GALACTOSIDASA

5.1 CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN DE β -GALACTOSIDASA

Como se ha indicado en el apartado 3.3.1, cuando se comenzó a utilizar la enzima β -galactosidasa para su inmovilización sobre nuestros soportes de inmovilización, se pretendió ensayar en condiciones similares a las utilizadas para la enzima HRPc. Inicialmente se utilizó como soporte de inmovilización el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona a una concentración con la que se obtuvieron buenos rendimientos de inmovilización, para el caso de HRPc. A pesar de que se utilizó un tiempo de inmovilización elevado y una concentración de β -galactosidasa que resultará habitual en los ensayos siguientes de este capítulo, sin embargo, no se detectó actividad enzimática alguna. La poca cantidad de sólido de inmovilización que queda adherida a las bolas de vidrio utilizadas, junto con la poca actividad enzimática que muestra la enzima β -galactosidasa en comparación con HRPc a las respectivas concentraciones de ensayo utilizadas, nos llevó a utilizar como soporte de inmovilización nuestros sólidos sintetizados y convenientemente pulverizados. Así se garantizó la utilización de una mayor cantidad de soporte de inmovilización, así como, probablemente, una mejor accesibilidad de la enzima al mismo, en las condiciones de ensayo utilizadas. La preparación del soporte se realizó como se indica en el apartado 2.3.3 de Materiales y Métodos. Para la preparación de las extensiones, se empleó dioxano-1,4 como disolvente porque se pudo comprobar que, al emplear este disolvente durante su preparación, el sólido de inmovilización obtenido, se mezcla mucho más fácilmente con el agua que cuando se empleó cloroformo para la preparación de las extensiones a irradiar. Esto permitirá una más adecuada dispersión del sólido en el medio de inmovilización y por lo tanto, una mayor accesibilidad por parte de la enzima a su superficie. Por otra parte, el método de inmovilización fue el indicado en el apartado 2.4.2.1.

En algunos ensayos, después de medir la actividad enzimática retenida sobre el sólido de inmovilización, las fracciones preparadas fueron recogidas mediante un filtro de papel Whatman n^o1, lavadas y almacenadas a una temperatura entre 0 y 4°C durante un tiempo previamente fijado. Tras el proceso de almacenado, el medio de reacción fue nuevamente filtrado y lavado. En todos los casos, la actividad de la enzima inmovilizada así como la liberada al medio de almacenado se midió en discontinuo.

5.1.1 Utilización de iones Mg^{+2} como activadores de β -galactosidasa

En la bibliografía, ha sido extensamente argumentado la conveniencia de la utilización de diferentes cationes, mono y divalentes, para el mantenimiento de la actividad de la enzima β -galactosidasa durante los procesos de extracción del interior celular y posterior purificación, en los procesos de inmovilización, o simplemente en el medio de ensayo de la actividad enzimática (Mahoney y Whitaker, 1978; Khare y Gupta, 1990; Huber et al., 1994). También se ha estudiado la conveniencia de estos cationes para preservar la actividad durante el almacenado, así como en diferentes ensayos de inactivación. Entre éstos, son de especial importancia los iones Mg^{+2} , por lo que para aprovechar su efecto activador y conservador de la actividad enzimática, se decidió utilizarlo en una concentración que así lo permitiera, y procurar no utilizarlo a una concentración demasiado elevada en las cuales, también se ha descrito que produce un efecto contrario (Mahoney y Adamchuk, 1980; Voget et al., 1994).

Para la medida de la actividad enzimática se realizaron muestras comparativas sin y con efecto de los iones Mg^{+2} conteniendo el medio de ensayo de estas últimas $MgSO_4$ 0,5 mM. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 5.1. Si se compara la actividad enzimática en ambos ensayos se observa que los iones Mg^{+2} , en las condiciones de ensayo especificadas, aumenta de manera significativa la actividad enzimática del sólido ensayado.

TABLA 5.1

Efecto de los iones Mg^{+2} sobre la actividad enzimática medida en muestras de β -galactosidasa inmovilizada.

Fracción	Mg^{+2}	$[ONF]_0$	Almacenado ^a
		(mM)	($\Delta A/mL$)
1	NO	0,34	0,000
2	SI	>1,22	0,000

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% de los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona (0,22 g), ya entrecruzados. La inmovilización de β -galactosidasa (40 U/mL; 30 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 96 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado previo 2 descrito en el apartado 2.5.2. Almacenado previo en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) durante 12 horas a una temperatura entre 0-4°C. La medida de la actividad enzimática inmovilizada y del medio de almacenado se realizó en discontinuo. (a) Actividad enzimática medida en el medio de almacenado.

5.1.2 Utilización de dioxano-1,4 durante el proceso de inmovilización

Se ha utilizado dioxano-1,4 debido a la observación general de que el sólido de inmovilización obtenido con el empleo de este disolvente es mucho más accesible por el agua que el que fue preparado con la utilización de cloroformo. Además, es conocido que se trata de un disolvente orgánico que permite la elaboración de disoluciones acuosas con un elevado porcentaje de agua. Con la finalidad de mejorar los resultados de inmovilización se decidió utilizar dioxano-1,4 durante este proceso. De este modo se podría facilitar la estabilidad de la enzima debido al carácter mayoritariamente acuoso de la mezcla, pero también su acceso al sólido de inmovilización por la presencia del dioxano-1,4. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 5.2.

TABLA 5.2

Efecto del uso de dioxano-1,4 durante el proceso de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida en muestras de β -galactosidasa inmovilizada.

Fracción	dioxano (%)	[ONF]		R (%)
		Inicial (mM)	Final (mM)	
1	0	1,46	0,56	38,08
2	7	0,23	0,06	24,30

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% de los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona (0,12 g), ya entrecruzados. La inmovilización de β -galactosidasa (26,9 U/mL; 30 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 18 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.a descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.a del mismo apartado. Almacenado en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en MgSO₄ durante 60 días a una temperatura entre 0 y 4°C. La actividad enzimática inicial y final se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después de 60 días de almacenado.

Se observa que el empleo de dioxano-1,4 directamente en el medio de inmovilización, no sólo disminuye a la enzima retenida inicialmente sobre el sólido de inmovilización, sino que también a la retenida tras el almacenado. Debido a los efectos negativos observados, este disolvente no será en lo sucesivo empleado como componente del medio de inmovilización, aunque sí para la preparación previa del sólido de inmovilización.

5.1.3 Efecto del tiempo de inmovilización

5.1.3.1 En muestras de β -galactosidasa inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona entrecruzados al 50%

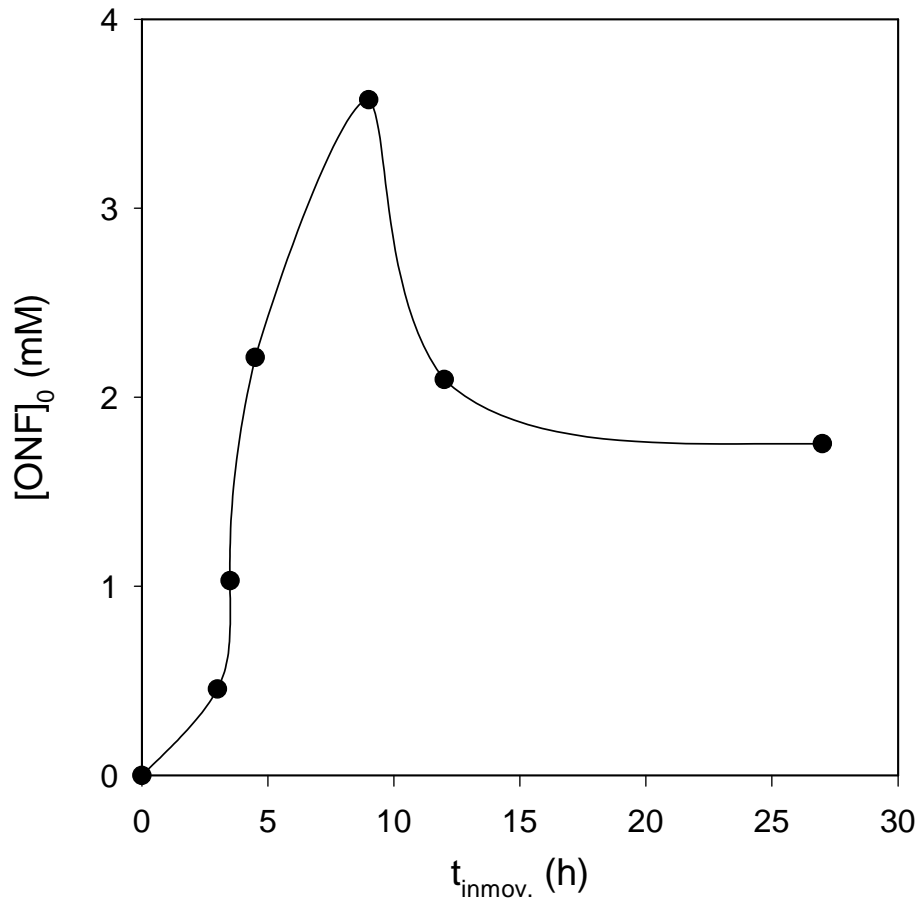
Para este estudio se empleó, como sólido de inmovilización, al igual que en los ensayos anteriores, el derivado totalmente cinamoilado de alcohol polivinílico (PVA) entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona. Se ha estudiado el efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicial retenida. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 5.3 y en la Figura 5.1 siguientes.

TABLA 5.3

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente medida en muestras de β -galactosidasa inmovilizada.

$t_{\text{inmov.}}$	$[\text{ONF}]_0$
(h)	(mM)
3	0,46
3,5	1,03
4,5	2,21
9	3,57
12	2,09
27	1,75

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% de los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona (0,12 g), ya entrecruzados. La inmovilización de β -galactosidasa (26,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo que osciló entre 3-27 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 3.a descrito en el apartado 2.5.2. La actividad enzimática inicial se midió en discontinuo.

**FIGURA 5.1**

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida sobre el derivado totalmente cinamoilado de PVA entrecruzado en una relación 1:1 con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de la concentración de ONF medida a 420 nm tras una hora de reacción, $[ONF]_0$ (mM), frente al tiempo de inmovilización, $t_{inmov.}$ (h). Las condiciones del ensayo se especifican en la Tabla 5.3.

5.1.3.2 En muestras de β -galactosidasa inmovilizada sobre los derivados cinamoilados de inulina y D-glucosona entrecruzados al 50%

Para este estudio se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado parcialmente cinamoilado de inulina entrecruzado, en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, empleando cloroformo como disolvente. En concreto se usó un derivado de inulina cinamoilado en un 49% de sus grupos -OH disponibles, para la fabricación del sólido que será utilizado para la inmovilización. A partir de este momento, se decidió utilizar glicerina como componente del medio de inmovilización, para facilitar la humectación del sólido de inmovilización y, por lo tanto, obtener una mejor accesibilidad de la enzima a éste. Además, debido a la manipulación a la que es sometido el sólido tras la inmovilización, para su lavado, medida de actividad enzimática y, en su caso, posterior lavado para un almacenado final, parte del sólido puede ser perdido a lo largo de este proceso, lo cual afectará de modo negativo a las medidas a realizar y a su reproducibilidad. Por lo tanto, y para reducir, en lo posible, estos problemas de pérdida de soporte, se decidió utilizar cartuchos de extracción de papel Whatman que, tras depositar el sólido después de la inmovilización, será el lugar donde lavar, medir la actividad enzimática y almacenar al soporte.

Tras el proceso de inmovilización, el medio de reacción fue filtrado en un cartucho de papel Whatman, y el sólido recogido lavado a fondo hasta eliminar la enzima débilmente retenida. El filtrado del sólido de inmovilización y posterior lavado fue realizado estando el cartucho de papel Whatman en un vial, convenientemente preparado, colocado en un lecho de hielo (Figura 5.2). Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 5.4 y en la Figura 5.3.



FIGURA 5.2

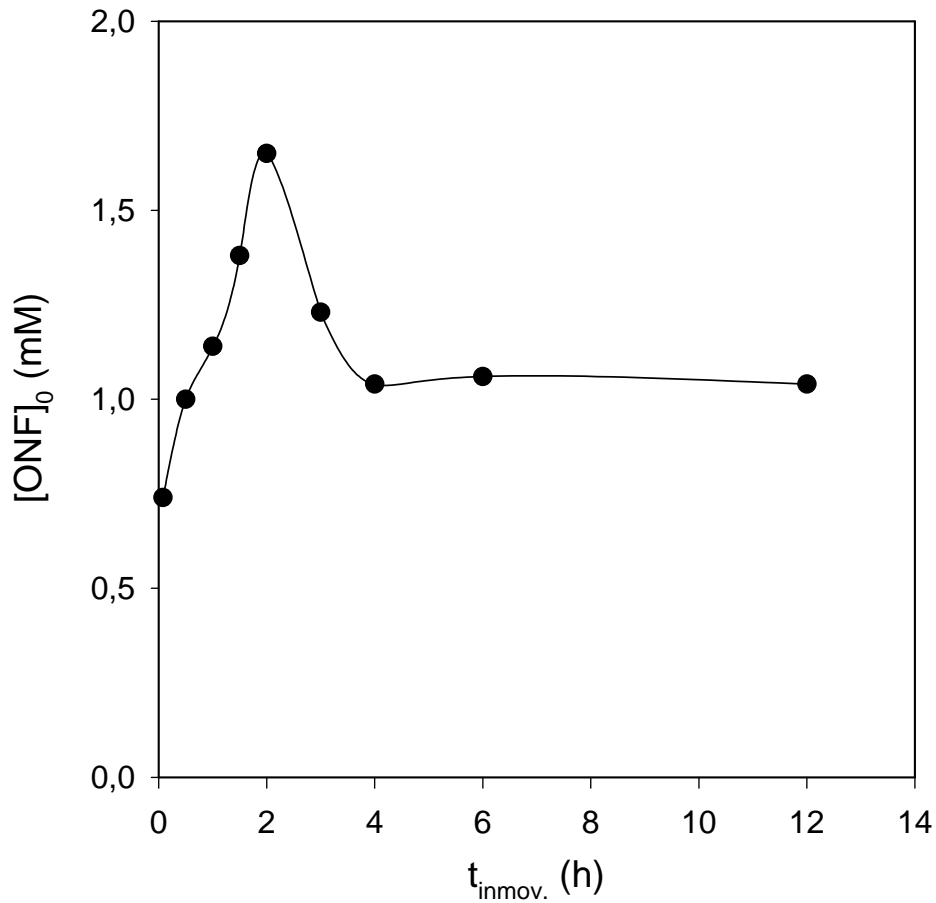
TABLA 5.4

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente medida en muestras de β -galactosidasa inmovilizada.

$t_{\text{inmov.}}$	$[\text{ONF}]_0$
(h)	(mM)
0,08	0,74
0,5	1,00
1	1,14
1,5	1,38
2	1,65
3	1,23
4	1,04
6	1,06
12	1,04

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 49% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,1 ó 0,05 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo entre 0,08-12 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 3.b descrito en el apartado 2.5.2. La actividad enzimática inicial se midió en discontinuo. Los resultados representados corresponden a los valores medios obtenidos para cada una de las diferentes fracciones preparadas.

Los resultados muestran que al aumentar el tiempo de inmovilización, la actividad enzimática retenida por el sólido de inmovilización también aumenta y tiende a la saturación tras alcanzar un máximo de actividad enzimática para un tiempo de inmovilización de 2 horas.

**FIGURA 5.3**

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática inicialmente retenida sobre el derivado parcialmente cinamoilado de inulina entrecruzado en una relación 1:1 con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de la concentración de ONF medida a 420 nm tras una hora de reacción, $[ONF]_0$ (mM), frente al tiempo de inmovilización, $t_{inmov.}$ (h). Las condiciones del ensayo se especifican en la Tabla 5.4.

5.2 EFECTO DEL TIPO DE SÓLIDO DE INMOVILIZACIÓN

El cinamato de PVA utilizado en los apartados 3.3 y 5.1 presenta algunas dificultades para su solubilización en los disolventes anteriormente citados. De este modo, si el tiempo de solubilización no es lo suficientemente elevado, las extensiones preparadas y su posterior irradiación con luz UV, será desigual, dando lugar a la obtención de un sólido de inmovilización entrecruzado heterogéneo. Esto podría afectar a la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Con la finalidad de eliminar en lo posible el inconveniente citado anteriormente, se intentó buscar otros componentes del sólido de inmovilización cuya solubilidad en los disolventes empleados sea completa y rápida. Por ello se decidió introducir a los derivados cinamoilados de inulina en nuestros soportes.

Para la realización de un estudio comparativo, se empleó la fracción preparada en el apartado 5.1.1, en que se pretendió estudiar el efecto de los iones Mg^{+2} junto con otra fracción en la que se empleó un sólido formado por el derivado totalmente cinamoilado de inulina mezclado en una relación 1:1 con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona. Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 5.5.

TABLA 5.5

Efecto del tipo de sólido de inmovilización sobre la actividad enzimática inicial de β -galactosidasa.

Cinamato de:	[ONF]₀	Almacenado^a
	(mM)	($\Delta A/mL$)
Inulina + D-glucosona	0,05	0,000
PVA + D-glucosona	>1,22	0,000

Soportes de inmovilización: Mezcla al 50% de los derivados totalmente cinamoilados de inulina y D-glucosona (0,26 g) y de PVA con D-glucosona (0,22 g), ya entrecruzados. La inmovilización de β -galactosidasa (40 U/mL; 30 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo entre 93-96 horas y a una temperatura entre 0-4°C. El procedimiento seguido para la preparación del sólido de inmovilización, proceso de inmovilización, lavado y ensayo de actividad enzimática, es en todo similar a lo descrito en el citado apartado 5.1.1. (a) Actividad enzimática medida en el medio de almacenado.

Es de destacar el bajo valor de absorbancia a 420 nm obtenido en comparación con el obtenido en los ensayos preliminares cuando el sólido estuvo formado por el derivado totalmente cinamoilado de PVA. Una posible causa de la poca actividad enzimática mostrada por este otro sólido puede ser el alto carácter hidrofóbico que muestra durante su manipulación en seco (elevada electricidad estática), y tras su adición al medio de inmovilización. Por lo tanto una vía de mejora de los resultados pasará por contrarrestar este comportamiento.

Otra posible explicación de la diferencia de los resultados obtenidos sería que en el sólido formado con PVA, este polímero de elevado peso molecular presente alguna cantidad de OH- libres en su estructura, los cuales conservarían la actividad enzimática de la proteína inmovilizada al favorecer la reacción de transgalactosilación, con la consiguiente eliminación del medio de reacción de galactosa, inhibidor competitivo de la enzima (Zárate y López-Leiva, 1990). De hecho, se ha puesto de manifiesto que la presencia en los medios de ensayo de diferentes agentes polihidroxílicos como PVA, manitol, sorbitol, glicerol, etc., provocó un aumento de la estabilidad de β -galactosidasa frente a diferentes agentes (Ariga et al., 1992; Shubhada y Sundaram, 1993; Parr y Frost, 1983).

En ensayos realizados en los apartados 5.1.3.1 y 5.1.3.2, se pone de manifiesto, que en general y en iguales condiciones de ensayo, las fracciones preparadas con un sólido de inmovilización que cuenta en su composición con el derivado totalmente cinamoilado de PVA, presentan valores de absorbancia a 420 nm superiores a aquellas fracciones en que el sólido de inmovilización estuvo formado por un derivado cinamoilado de inulina, tras el tiempo de ensayo fijado. Sin embargo, los resultados obtenidos por este último tipo de soportes de inmovilización son significativamente mejorados cuando se emplea un derivado parcialmente cinamoilado de inulina y cuando además, durante la inmovilización, se añade un agente polar y humectante como es la glicerina.

5.2.1 Empleo de derivados parcialmente cinamoilados de inulina

En este ensayo se utilizará un derivado totalmente cinamoilado de inulina y otros derivados con un 49% y 41% de sus grupos -OH disponibles cinamoilados, respectivamente. En todos los casos, cada uno de estos sólidos será entrecruzado con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona en una relación 1:1 para la fabricación del soporte de inmovilización final. Cuando el sólido estuvo formado por un derivado parcialmente cinamoilado de inulina se empleó como disolvente cloroformo.

Los resultados obtenidos son representados en la Tabla 5.6. En la primera de las muestras preparadas se añadió dioxano-1,4 (\cong 7% de la composición del medio) al medio de inmovilización para facilitar la humectación del sólido de inmovilización. Para contrarrestar la no adición de dioxano-1,4 en la segunda fracción, se añadió el doble de lo habitual de glicerina. La inmovilización se desarrolló durante un tiempo que aún siendo diferente para cada fracción no provocara diferencias significativas en los resultados a obtener.

TABLA 5.6

Empleo de derivados de inulina con diferente grado de cinamoilación como soportes de inmovilización de β -galactosidasa.

Grado de cinamoilación	dioxano-1,4	m_{sólido}	[E]	t_{inmov.}	[ONF]₀
(%)		(g)	(U/mL)	(h)	(mM)
100	SI	0,1	11,36	12,5	0,35
100	NO	0,05	10,27	22,5	0,65
49	NO	0,05	14,86	12,0	1,04
41	NO	0,05	14,86	18,0	1,50

Soportes de inmovilización: Mezcla al 50% de derivados de inulina con diferente grado de cinamoilación y el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados. La inmovilización de β -galactosidasa (10-15 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo entre 12-23 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 3.b descrito en el apartado 2.5.2. La actividad enzimática inicial se midió en discontinuo.

En los resultados mostrados en la tabla anterior, puede observarse, que al sustituir dioxano-1,4 por glicerina en el medio de inmovilización, los resultados obtenidos prácticamente se duplican aunque la cantidad de sólido de inmovilización empleada sea la mitad de la inicialmente utilizada. Una mejora significativa adicional se obtiene al sustituir, en la composición del soporte de inmovilización, el derivado totalmente cinamoilado de inulina, por uno parcialmente cinamoilado, permitiendo, además, reducir la cantidad de glicerina empleada durante la inmovilización.

Por lo tanto, para que los datos sean satisfactorios, en el sólido de inmovilización será empleado un derivado parcialmente cinamoilado de inulina, y en la composición del medio de inmovilización se sustituirá el empleo de dioxano-1,4 por glicerina.

5.3 ESTABILIDAD EN EL ALMACENADO

5.3.1 Efecto de la composición del medio de almacenado

En este apartado han sido considerados los diferentes ensayos realizados a lo largo de este capítulo en que algún factor relacionado con el efecto que queremos describir es estudiado.

5.3.1.1 Almacenado en seco

Se han considerado las fracciones preparadas en el apartado 5.1.3.2. Los datos obtenidos en algunas de estas fracciones que fueron almacenadas en seco durante diferentes períodos de tiempo, así como otros datos que pueden ser de interés, son mostrados en la tabla siguiente.

TABLA 5.7

Actividad enzimática retenida por β -galactosidasa inmovilizada en muestras almacenadas en seco.

Fracción	$t_{\text{inmov.}}$	$m_{\text{sólido}}$	$t_{\text{almac.}}$	R
	(h)	(g)	(días)	(%)
1	0,08	0,05	18	1,12
2	3	0,05	46	1,23
3	6	0,1	106	1,53
4	12	0,05	17	0,86

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 49% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados. La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo entre 0,08-12 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. Fracciones almacenadas a una temperatura entre 0-4°C. La actividad enzimática inicial y final se midió en discontinuo. Los resultados representados corresponden a los valores medios obtenidos para cada una de las diferentes fracciones preparadas. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después del almacenado.

Estos resultados ponen de manifiesto, que independientemente del tiempo de inmovilización empleado, de la masa de sólido utilizada o del tiempo en que las fracciones fueron almacenadas, la cantidad de actividad enzimática retenida tras el almacenado fue similar en todos los casos y prácticamente despreciable. Por lo tanto, este método de almacenado no será, en principio, aconsejable, siendo deseable su almacenado en suspensión en algún medio acuoso que contenga, en la medida de lo posible, algún o algunos agentes protectores o estabilizantes de la estructura cuaternaria activa de la proteína.

5.3.1.2 Efecto de los iones Mg^{+2}

Para este estudio se ha utilizado la fracción que contenía dioxano-1,4 durante el proceso de inmovilización, preparada durante el apartado 5.1.2. Además, se prepararon y ensayaron otras dos nuevas fracciones. En ellas, el método de preparación de las muestras, tipo de sólido de inmovilización, proceso de inmovilización y lavado de muestras, así como el modo de ensayo y almacenado posterior, se realizó del modo indicado en el citado apartado. Estas fracciones se diferenciaban, por lo tanto, en la presencia de dioxano-1,4 en el medio de inmovilización y de iones Mg^{+2} en el medio de almacenado. Para la inclusión de estos iones en el medio de almacenado se utilizó tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) suplementado con $MgSO_4$ 0,5 mM. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 5.8.

Los datos de la tabla anterior muestran que la presencia de iones Mg^{+2} en el medio de almacenado mejora de un modo muy significativo los valores de rendimiento de actividad enzimática obtenidos tras el proceso de almacenado en las condiciones de ensayo. Así, cuando el tiempo de almacenado fue de tres días sólo se obtuvo un 2% de rendimiento cuando no se emplearon iones Mg^{+2} , en comparación con cerca del 40% obtenido cuando éstos estuvieron presentes. Incluso cuando se empleó dioxano-1,4 durante el proceso de inmovilización, en la fracción que contó con la presencia de iones Mg^{+2} durante el almacenado, el porcentaje de actividad obtenido fue muy superior al obtenido para la fracción que no contenía tales iones. Esto muestra una importante recuperación de la actividad enzimática durante el almacenado en presencia de estos iones, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en este sentido en otros apartados de este capítulo.

TABLA 5.8

Efecto del almacenado en presencia de iones Mg^{+2} sobre la actividad enzimática retenida por β -galactosidasa inmovilizada.

Fracción	dioxano	$[ONF]_0$	$t_{almac.}$	$[Mg^{+2}]$	$[ONF]_f$	R
		(mM)	(días)	(mM)	(μ M)	(%)
1	SI	0,23	60	0,5	56,0	24,30
2	SI	0,24	3	----	4,90	2,12
3	NO	1,30	3	0,5	511	39,36

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% de los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona, ya entrecruzados (0,12 g). La inmovilización de β -galactosidasa (26,9 U/mL; 30 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 18 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.a descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.a del mismo apartado. Fracciones almacenadas a una temperatura entre 0 y 4°C. La actividad enzimática inicial y final se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después del almacenado.

5.3.1.3 Almacenado en medio acuoso

Aquí han sido consideradas otras fracciones preparadas durante el apartado 5.1.3.2. En este caso, las fracciones fueron almacenadas en seco, tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y $MgSO_4$ 0,5 mM o bien en disolución de glicerina en el tampón anterior mezclados en los porcentajes en peso abajo indicados. Los resultados que se obtuvieron son indicados en la Tabla 5.9.

Los datos aquí presentados muestran que el peor de los medios de almacenado posibles es en seco. También puede comprobarse, cómo la presencia de glicerina en el medio de almacenado mejora los resultados de actividad residual con respecto a los obtenidos sólo con el tampón de almacenado. De los tres medios de almacenado con glicerina, el que muestra peor porcentaje de retención, es aquel con mayor cantidad de glicerina y por lo tanto con menor cantidad de tampón. Ahora bien, los medios de almacenado que contaron con la presencia de glicerina al 25 y 50%, mostraron, ambos, elevados porcentajes de retención tras el tiempo de almacenado indicado. Aunque la retención obtenida en el medio con un 50% de glicerina fue superior a la obtenida con un 25% de ésta, sin embargo, el tiempo de almacenado en el primer caso fue muy superior al segundo de los casos, quedando así abierta la posibilidad de que si en el segundo de

los casos el tiempo de almacenado hubiera sido similar, el porcentaje final obtenido habría sido igualmente alto.

Por lo tanto, un medio de almacenado constituido por el tampón arriba indicado junto con glicerina en un porcentaje que oscile entre el 25% y el 50% garantizaría unos porcentajes de retención de actividad enzimática tras el almacenado, elevados.

TABLA 5.9

Actividad enzimática retenida por β -galactosidasa inmovilizada en muestras almacenadas en medio acuoso.

Fracción	$t_{\text{inmov.}}$	Almacenado	$t_{\text{almac.}}$	R
	(h)		(días)	(%)
1	1	Glicerina-75%	97	15,72
2	4	Glicerina-50%	101	88,96
3	2	Glicerina-25%	18	67,96
4	1,5	Tampón pH 7,1 + Mg ⁺²	92	3,83
5	6	Seco	106	1,53

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 49% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,1 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo entre 1-6 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. Fracciones almacenadas a una temperatura entre 0-4°C. (1) Fracción almacenada en una disolución de glicerina al 75% en peso en el tampón de almacenado. (2) Fracción almacenada en una disolución de glicerina al 50% en peso en el tampón de almacenado. (3) Fracción almacenada en una disolución de glicerina al 25% en peso en el tampón de almacenado. (4) Fracción almacenada en el tampón de almacenado. (5) Fracción almacenada en seco. La actividad enzimática inicial y final se midió en discontinuo. Los resultados representados corresponden a los valores medios obtenidos para cada una de las diferentes fracciones preparadas. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después del almacenado.

5.3.1.4 Almacenado en medio acuoso con diferentes aditivos

En este punto han sido consideradas fracciones preparadas durante el apartado 5.1.3.1. En este caso, las fracciones fueron almacenadas en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO₄ 0,5 mM, ya sea solo o con diferentes aditivos. Los resultados que se obtuvieron son indicados en la Tabla 5.10.

En este caso, el factor determinante de la actividad retenida tras el almacenado, debe de ser la composición química de este medio, puesto que el tiempo de almacenado

es similar en todos los casos, y el tiempo de inmovilización, aunque diferente, todos se encuentran en el rango en que se supone que se produce la saturación del sólido. La actividad enzimática retenida tras el almacenado, en presencia de glicerina es de aproximadamente un 11% superior con respecto a la retenida en presencia de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en $MgSO_4$. La actividad enzimática perdida, tras el almacenado, en la fracción almacenada en presencia de sorbitol fue considerablemente superior a la perdida cuando se empleó tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en $MgSO_4$, ya sea solo o con glicerina. Por otra parte, la fracción almacenada en presencia de 2-mercaptoetanol prácticamente perdió toda su actividad enzimática.

TABLA 5.10

Actividad enzimática retenida por β -galactosidasa inmovilizada en muestras almacenadas en medio acuoso y en presencia de diferentes aditivos.

Fracción	$t_{inmov.}$	Almacenado	$t_{almac.}$	R
	(h)		(días)	(%)
1	3	Sorbitol-50%	88	15,99
2	3,5	2-mercaptoetanol 0,3 M	90	1,46
3	9	Glicerina-50%	91	41,68
4	27	Tampón pH 7,1 + Mg^{+2}	91	30,12

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% de los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona, ya entrecruzados (0,12 g). La inmovilización de β -galactosidasa (26,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo entre 3-27 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.a descrito en 2.5.2. Lavados posteriores 4.a del mismo apartado. Almacenado durante alrededor de 90 días a una temperatura entre 0-4°C. (1) Fracción almacenada en una disolución de sorbitol al 50% en peso en el tampón de almacenado. (2) Fracción almacenada en una disolución de 2-mercaptoetanol 0,3 M en el tampón de almacenado. (3) Fracción almacenada en una disolución de glicerina al 50% en peso en el tampón de almacenado. La actividad enzimática inicial y final se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después del almacenado.

Por lo tanto, no será recomendable el uso de sorbitol, y sobre todo de 2-mercaptoetanol para conservar la enzima inmovilizada, sobre todo durante tiempos de conservación elevados. Se ha vuelto a comprobar, en este caso con un sólido de inmovilización diferente al utilizado en los apartados anteriores, que los mejores resultados son obtenidos cuando los almacenados han sido realizados en presencia de

glicerina, por lo que será aconsejable su utilización. Además, y dado el carácter humectante de la glicerina, podrá ser utilizada en las etapas iniciales del proceso de inmovilización para facilitar el acceso de la enzima al soporte de inmovilización, evitando también las desventajas presentadas por el dioxano-1,4 cuando fue utilizado con esta misma finalidad.

5.3.2 Efecto del tipo de sólido de inmovilización

En este apartado se han considerado las fracciones realizadas en los apartados 5.1.3.1 y 5.1.3.2. En este caso, las fracciones fueron almacenadas en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO_4 0,5 mM, o bien en disolución de glicerina al 50% en el tampón anterior. Los resultados que se obtuvieron son indicados en la Tabla 5.11.

TABLA 5.11

Efecto del tipo de sólido de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida durante el almacenado por β -galactosidasa inmovilizada.

Fracción	$t_{\text{inmov.}}$	Almacenado	$t_{\text{almac.}}$	R
	(h)		(días)	(%)
1	4	Glicerina-50%	101	88,96
2	9	Glicerina-50%	91	41,68
3	1,5	Tampón pH 7,1 + Mg^{+2}	92	3,83
4	27	Tampón pH 7,1 + Mg^{+2}	91	30,12

Fracciones 1 y 3: Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 49% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,1 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo de 1,5 ó 4 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Fracciones 2 y 4: Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% de los derivados totalmente cinamoilados de PVA y D-glucosona, ya entrecruzados (0,12 g). La inmovilización de β -galactosidasa (26,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 9 ó 27 horas y a una temperatura entre 0-4°C. En todos los casos, la actividad enzimática inicial y final se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después del almacenado.

En los dos primeros casos de la tabla anterior, el factor determinante de los rendimientos finales es el tipo de sólido de inmovilización utilizado. Aquí se comprueba cómo se obtienen rendimientos más de dos veces superiores cuando se usó el derivado formado por inulina y D-glucosona que cuando la inulina fue sustituida por PVA. En los

resultados en ausencia de glicerina se observa un efecto contrario, es decir, son superiores cuando el sólido estuvo formado por PVA en lugar de inulina. La explicación de este hecho puede ser doble. Por un lado puede ser que la presencia de un agente humectante como la glicerina favorezca la accesibilidad de la enzima y una mejor acomodación a sólidos parcialmente polares como puede ser el derivado parcialmente cinamoilado de inulina. Por otro lado, puede ocurrir que el efecto del tiempo de inmovilización sea tan importante, que aunque la enzima no se encuentre en un sólido adecuado, sin embargo, como el tiempo de inmovilización ha sido muy superior a cuando el sólido estuvo formado por inulina, esto haga que el porcentaje de retención de actividad tras el almacenado sea muy superior en el sólido formado por PVA en comparación con el formado por inulina.

5.3.3 Efecto del tiempo de inmovilización

En este caso también se empleó cloroformo como disolvente. Para este estudio se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado de inulina cinamoilado un 49%, entrecruzado en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Para cada uno de los tiempos de inmovilización a ensayar se prepararon dos fracciones de soporte de inmovilización. Una de las fracciones será almacenada sin medir inicialmente su actividad enzimática, y la otra será medida su actividad enzimática inicial, y tras lavar, será almacenada durante el tiempo establecido. Después del almacenado, todas las fracciones serán ensayadas para conocer la actividad enzimática retenida por cada una de ellas.

Después de ensayar la actividad enzimática inicial retenida sobre el sólido de inmovilización, estas fracciones fueron lavadas mediante el lavado 4.b descrito en el apartado 2.5.2 de Materiales y Métodos. Finalmente, todas las fracciones (ensayadas inicialmente y no ensayadas) fueron almacenadas durante alrededor de 30 días.

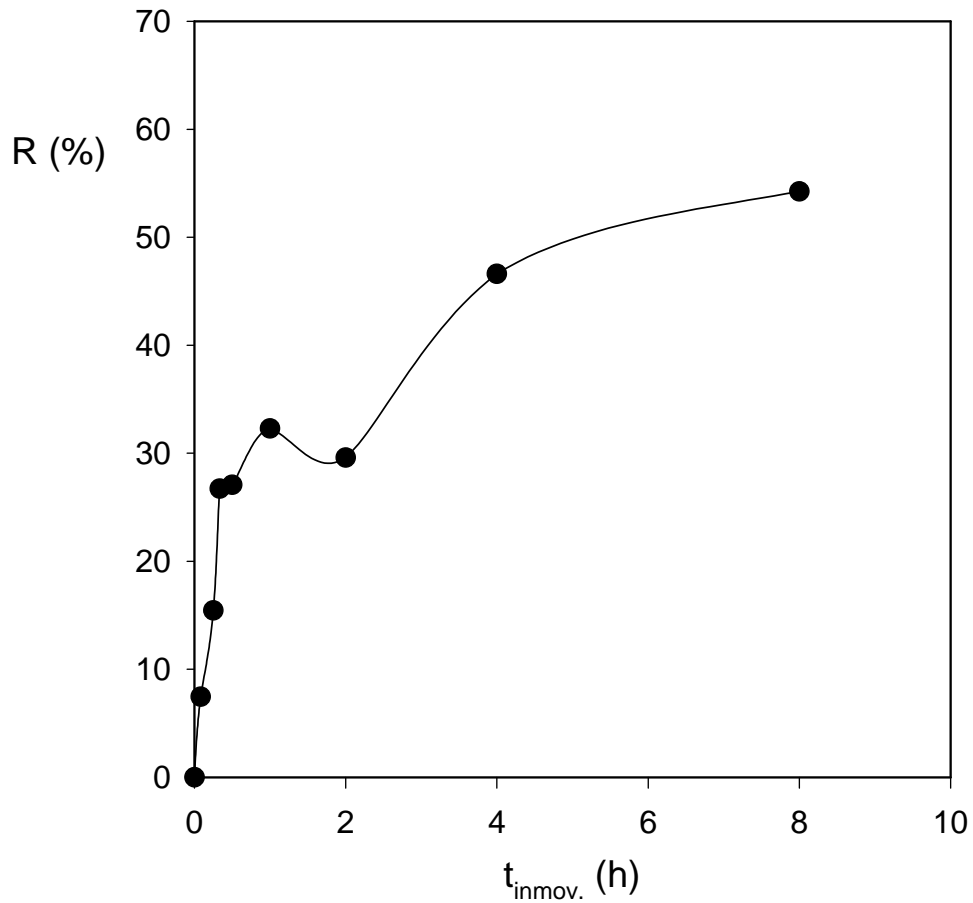
Los resultados obtenidos para el caso de las fracciones cuya actividad enzimática fue medida justo después del proceso de inmovilización, son representados en la Tabla 5.12 y en la Figura 5.4, mientras que los obtenidos para las fracciones almacenadas sin ser medida su actividad enzimática inicial, son mostrados en la Tabla 5.13 y en la Figura 5.5.

TABLA 5.12

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida tras 30 días de almacenado en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO_4 0,5 mM.

$t_{\text{inmov.}}$	$t_{\text{almac.}}$	R	Almacenado ^a
(h)	(días)	(%)	($\Delta A/\text{mL}$)
0,08	30	7,45	0,001
0,25	32	15,45	-----
0,33	30	26,72	0,000
0,5	38	27,07	-----
1	29	32,29	0,000
2	29	29,59	0,002
4	29	46,61	0,000
8	30	54,24	0,002

(Fracciones almacenadas tras ensayar su actividad enzimática inicial). Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 49% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,05 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo entre 0,08-8 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. Fracciones almacenadas a una temperatura entre 0-4°C. La actividad enzimática inicial y final, así como la liberada al medio de almacenado se midió en discontinuo. (a) Actividad enzimática medida en el medio de almacenado. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después del almacenado.

**FIGURA 5.4**

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida tras 30 días de almacenado en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO_4 0,5 mM.

Representación del porcentaje de actividad retenida, $R(\%)$, frente al tiempo de inmovilización, $t_{\text{inmov.}} \text{ (h)}$. Las condiciones del ensayo se indican en la Tabla 5.12.

TABLA 5.13

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida tras 30 días de almacenado en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO_4 0,5 mM, en muestras cuya actividad no fue medida inicialmente.

$t_{\text{inmov.}}$	$t_{\text{almac.}}$	$[\text{ONF}]_f$
(h)	(días)	(mM)
0,08	30	0,33
0,33	30	0,61
1	30	0,74
2	30	0,47
4	31	0,34
8	31	0,20

(Fracciones almacenadas sin ensayar su actividad enzimática inicial). Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 49% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,05 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo entre 0,08-8 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. Fracciones almacenadas a una temperatura entre 0-4°C. La actividad enzimática final así como la liberada al medio de almacenado se midió en discontinuo.

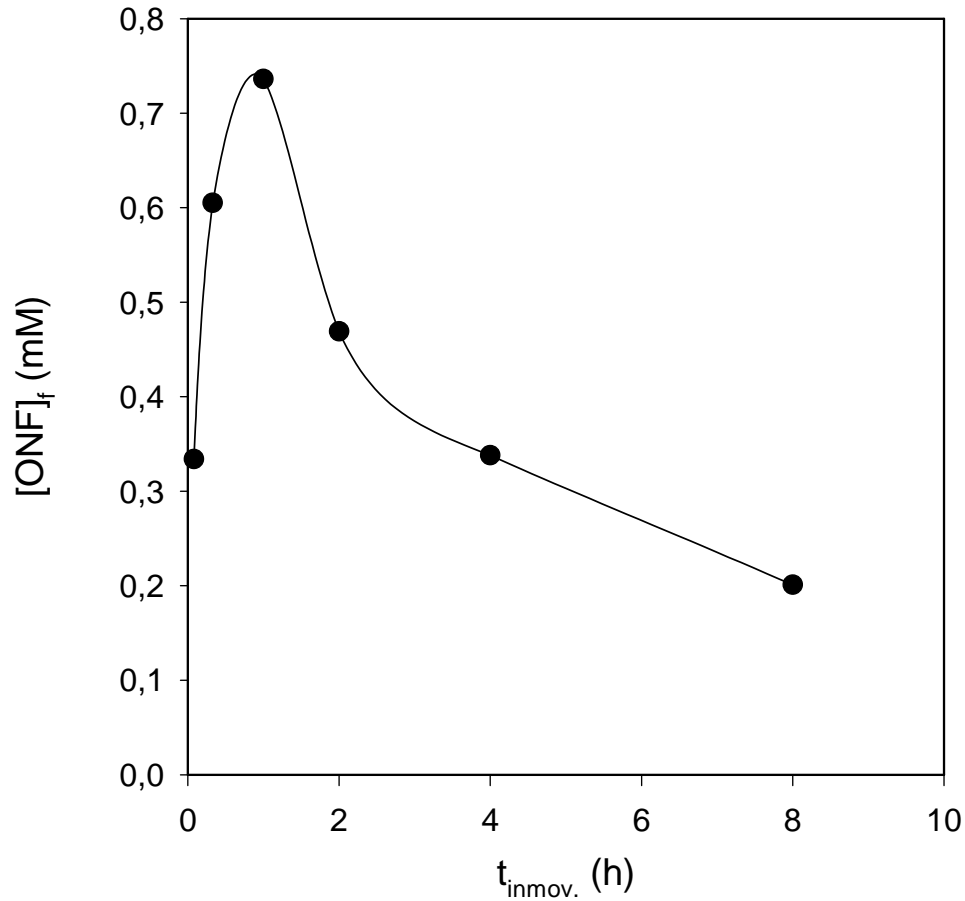


FIGURA 5.5

Efecto del tiempo de inmovilización sobre la actividad enzimática retenida tras 30 días de almacenado en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO₄ 0,5 mM, en muestras cuya actividad no fue medida inicialmente.

Representación de la concentración de ONF medida a 420 nm tras una hora de reacción, [ONF]_f (mM), frente al tiempo de inmovilización, t_{inmov.} (h). Las condiciones del ensayo se describen en la Tabla 5.13.

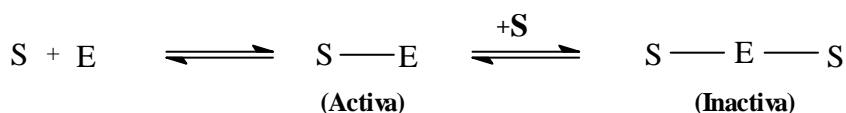
Los resultados obtenidos y mostrados en la Figura 5.4 indican que al aumentar el tiempo de inmovilización, aumenta la actividad enzimática retenida durante el almacenado del sólido de inmovilización en las condiciones arriba citadas. Esta tendencia general sólo es rota por la fracción preparada con un tiempo de inmovilización de 2 horas. Esto puede servir para corroborar la hipótesis expuesta en el apartado 5.1.3.2 y que hace referencia a que al aumentar el tiempo de inmovilización se tiende a una saturación del sólido de inmovilización por parte de la enzima, tras un máximo alcanzado para un tiempo de 2 horas. Sin embargo, este máximo puede ser debido a una “sobrecarga” de enzima sobre el soporte, la cual estaría débilmente enlazada y en consecuencia sería fácil de perder y/o inactivar durante el almacenado, ensayos de inactivación térmica, etc. Así, un alto valor de actividad enzimática inicial junto con una superior pérdida de actividad enzimática durante el almacenado, serían responsables de los resultados arriba mencionados, a pesar de que los valores absolutos de las medidas realizadas tras el almacenado indican, sin excepción, un aumento al aumentar el tiempo de inmovilización. Además, se observa que la enzima liberada al medio de almacenado es nula o despreciable en todos los casos ensayados.

En el segundo de los casos aquí estudiados (Tabla 5.13 y Figura 5.5) se observa un desplazamiento del máximo al que se alcanza la mayor actividad enzimática para situarse alrededor de un tiempo de inmovilización de una hora. Además, se muestra que tras el máximo, la caída de actividad enzimática producida para tiempos de inmovilización superiores, es más drástica que la mostrada cuando en las fracciones fue medida inicialmente su actividad enzimática antes de ser almacenadas. Este hecho puede ser debido a que en tiempos cortos de inmovilización, la cantidad de enzima presente sobre el soporte no es demasiado elevada, de tal forma que la enzima puede acomodarse de un modo adecuado sobre su superficie. Sin embargo, a tiempos de inmovilización superiores a dos horas, la cantidad de enzima presente es muy elevada de tal modo que pueden favorecerse las interacciones intermoleculares que darán lugar a la formación de aglomeraciones de moléculas que provocarían su inactivación (Lencki et al., 1992; Mahoney, 1980; Chang y Mahoney, 1994). Agentes reductores como 2-mercaptoetanol capaces de evitar la oxidación de los grupos tiol presentes en la enzima o agentes capaces de reaccionar con ellos, como cisteína, evitarán, en cualquiera de los dos casos, la formación de puentes disulfuro intermoleculares, con la consiguiente formación de agregados de elevado peso molecular inactivos (Voget et al., 1994; Makkar, 1982; Byrne y Johnson, 1974).

Para la actividad enzimática liberada al medio de almacenado se observa un comportamiento similar al descrito en el párrafo anterior para el valor de actividad enzimática retenida tras el almacenado, siendo significativos los valores obtenidos para las fracciones en que el tiempo de inmovilización empleado estuvo alrededor del máximo. Estos datos son mostrados en la Tabla A5.1.

Para explicar este comportamiento se harán las siguientes suposiciones.

Justificación 1. Aunque la cantidad inmovilizada para un tiempo de inmovilización corto (≤ 2 h) sea inferior a la que correspondería a un tiempo de inmovilización mayor, sin embargo, el porcentaje de la inmovilizada que permanece inicialmente activa es superior en el primero de los casos en comparación con el segundo. Esto justificaría el que, inicialmente, la actividad enzimática medida sea mayor para un tiempo de inmovilización corto que para uno mayor. Durante la conservación, el segundo equilibrio del esquema de reacción propuesto se podría revertir para dar lugar a una forma activa de la enzima. Esto estaría más favorecido para la fracción en que el tiempo de inmovilización fue mayor. Además, la enzima desnaturalizada podría competir con la enzima unida por los mismos puntos de unión, lo cual favorecería esta reversión, sobre todo en la fracción de mayor tiempo de inmovilización, pues se dispone de más enzima. Esto justificaría que a mayor tiempo de inmovilización se retenga mayor porcentaje de actividad enzimática.



donde E representa a la enzima y S al soporte.

Justificación 2. Admitiendo que la inactivación de la enzima es debida a su unión al soporte por múltiples puntos, cuando el tiempo de inmovilización es superior a 2 h, la enzima está unida por múltiples puntos al soporte, y la actividad enzimática mostrada es debida a la gran cantidad de enzima presente en el soporte. Cuando el tiempo de inmovilización es inferior a 2 h, la poca enzima que hay en el soporte está unida por muy pocos puntos, mostrando así una alta actividad enzimática. Sin embargo, durante su

almacenado, la enzima sigue uniéndose al soporte por nuevos puntos, de ahí, la alta pérdida de actividad enzimática a tales tiempos de inmovilización, que justifica que a mayor tiempo de inmovilización mayor rendimiento, pues la actividad enzimática retenida, durante el almacenado, con respecto a la actividad enzimática inicial es mayor al aumentar el tiempo de inmovilización. Para tiempo de inmovilización superior a 2 h este proceso de inactivación no será ya tan importante, siendo más significativo que se dé el segundo equilibrio descrito en el esquema de la justificación anterior. Es evidente, por tanto, que a tiempos de inmovilización bajos, la pérdida de actividad enzimática observada no puede ser achacada en su totalidad al tiempo de almacenado, jugando un papel decisivo el proceso arriba descrito. Además, el efecto del tiempo de almacenado sobre la pérdida de actividad enzimática puede ser más claramente observado a tiempos de inmovilización altos, pues en estos casos la inactivación mencionada anteriormente es menos importante.

5.3.4 Efecto del tiempo de almacenado

Para este estudio se empleó, como sólido de inmovilización, el soporte utilizado en el apartado anterior. Tras el lavado, y antes de medir la actividad enzimática inicial, las fracciones fueron almacenadas a una temperatura de aproximadamente -18°C . Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 5.14 y en la Figura 5.6.

Al aumentar el tiempo de almacenado aumenta la actividad enzimática retenida por el sólido de inmovilización. El primer valor mostrado en la tabla anterior corresponde a un tiempo de almacenado de 1 hora. Esta fracción fue preparada para cuantificar la pérdida de actividad enzimática producida durante la manipulación previa al almacenado de las diferentes fracciones, y también la debida al proceso de congelación y descongelación de la muestra. Este valor obtenido puede tomarse como punto de partida con respecto al cual valorar y cuantificar la actividad enzimática “recuperada” durante el almacenado de las muestras.

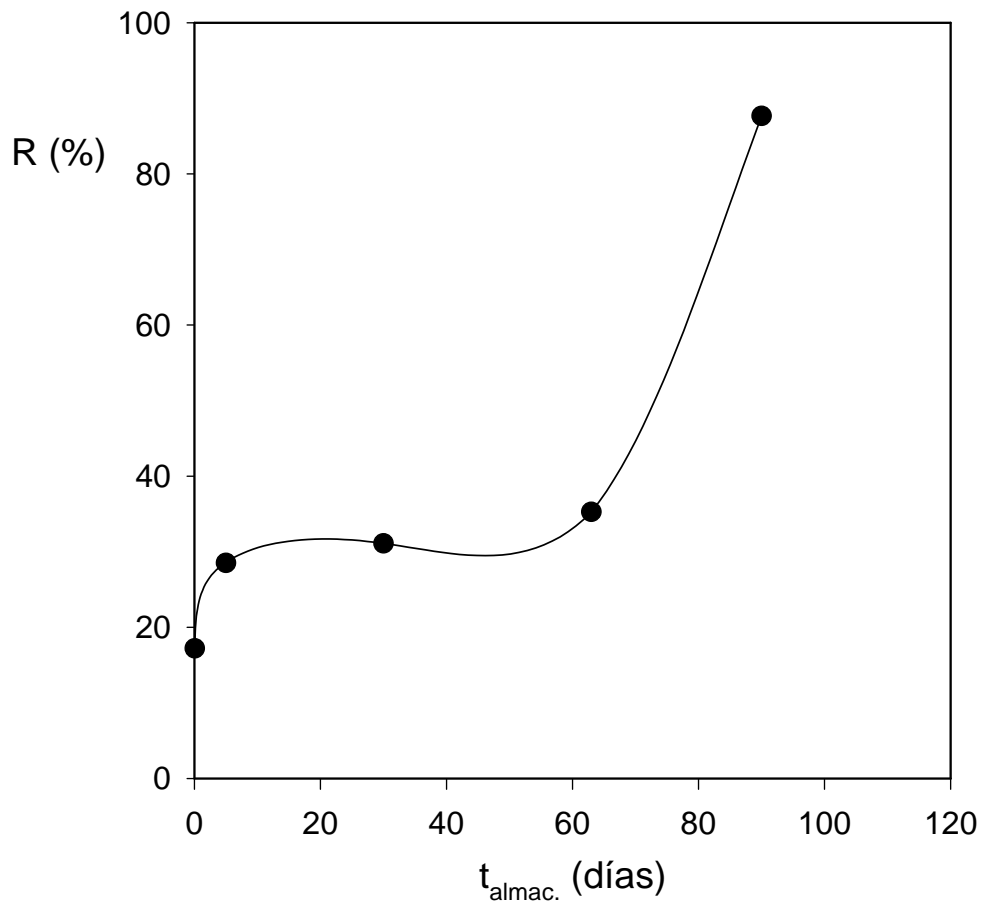
Los valores obtenidos para las disoluciones en que fueron almacenadas las diferentes fracciones, se encuentran, en general, dentro del orden de precisión del método de medida y por lo tanto, no resultaron ser significativos. Estos datos son mostrados en la Tabla A5.2.

TABLA 5.14

Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad retenida en muestras almacenadas en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO_4 0,5 mM.

$t_{\text{inmov.}}$	$t_{\text{almac.}}$	R
(h)	(días)	(%)
2	0,042	17,21
2	5	28,52
2	30	31,10
2	63	35,28
2	90	87,67
4 ¹	29	46,61
4 ^{1,2}	101	88,96

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 49% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,05 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo de 2 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. La actividad enzimática final así como la liberada al medio de almacenado se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después del almacenado. (1) El porcentaje obtenido es calculado a partir de fracciones en que la actividad enzimática fue medida antes y después del almacenado. (2) Esta fracción fue preparada con 0,1 gramos de sólido de inmovilización.

**FIGURA 5.6**

Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad retenida en muestras almacenadas en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y MgSO₄ 0,5 mM.

Representación del porcentaje de actividad enzimática retenida, R(%), frente al tiempo de almacenado, t_{almac.} (días). Las condiciones del ensayo se describen en la Tabla 5.14.

5.3.5 Efecto del pH de almacenado

Con el fin de observar cómo el pH de almacenado influenciaba la actividad enzimática retenida, se empleó, como sólido de inmovilización, el derivado de inulina cinamoilado, aproximadamente, un 41%, y entrecruzado en una relación 1:1, con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, empleando cloroformo como disolvente. Se ha estudiado el efecto de tres pHs de almacenado y los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 5.15.

El procedimiento de lavado de las muestras fue, el descrito en el apartado 2.5.2 de Materiales y Métodos (lavado 3.b.1). Después de medir la actividad enzimática inicial, cada una de las fracciones volvieron a ser almacenadas en las condiciones citadas en la Tabla 5.15 y al pH deseado, durante 19 horas y 5 días, siendo medida su actividad enzimática tras cada período de almacenado. Después de cada almacenado y medida de actividad enzimática, las fracciones fueron nuevamente lavadas mediante el lavado 4.b descrito en el apartado 2.5.2 de Materiales y Métodos.

TABLA 5.15

Efecto del pH sobre la actividad enzimática retenida durante el almacenado por β -galactosidasa inmovilizada.

$\text{pH}_{\text{almac.}}$	R_1	Almacenado ₁ ^a	R_2	Almacenado ₂ ^a	R_{Total}
	(%)	($\Delta A/mL$)	(%)	($\Delta A/mL$)	(%)
5,0	7,76	0,002	30,83	0,001	2,39
6,0	6,54	0,002	37,50	0,001	2,45
7,1	63,36	0,002	64,64	0,002	40,95

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 41% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,05 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo de 18 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b.1 descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. Almacenado previo durante 2 horas en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en MgSO_4 , a una temperatura de -18°C. Ensayos de almacenado tras 19 horas y 5 días, respectivamente, en el medio y temperatura anteriormente citados y al pH deseado (5,0; 6,0 ó 7,1). En todos los casos la actividad de la enzima inmovilizada, así como la liberada al medio de almacenado se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después de cada almacenado. (a) Actividad enzimática medida en el medio de almacenado.

Los resultados obtenidos muestran, claramente, la conveniencia de almacenar en una disolución tampón de aproximadamente pH 7,0. Además, en una muestra que fue almacenada a pH 6,0 durante 2 horas y a -18°C , en las condiciones arriba mencionadas tras el ensayo de actividad enzimática inicial, se comprobó que retuvo una actividad que supuso un 41,30% de la mostrada en el ensayo inicial (resultados no mostrados). Este dato indica que el almacenado a este pH provoca una pérdida drástica de la actividad enzimática retenida, puesto que en pocas horas se vio reducida del 41,30% mencionado al 6,54% indicado en la Tabla 5.15. El mismo ensayo fue repetido, pero realizando el almacenado a pH 7,1, comprobándose que la actividad enzimática retenida, en este caso, supuso un 53,40% de la mostrada en el ensayo inicial (resultados no mostrados). Este resultado vuelve a corroborar, por un lado, que con el almacenado, en estas condiciones, la actividad enzimática retenida por el soporte de inmovilización aumenta, y por otro lado los altos valores de actividad enzimática retenidos desde los primeros ensayos, ya sea por el tiempo de inmovilización utilizado o por el corto almacenado, previo a la medida de actividad enzimática inicial, a que son sometidas las muestras.

5.4 ESTABILIDAD FRENTE A LA REUTILIZACIÓN

El elevado coste económico de algunas enzimas utilizadas con fines industriales, así como el tiempo invertido para su inmovilización y posterior utilización, provoca que resulte de interés la reutilización de los inmovilizados preparados y su posterior almacenado a lo largo de diferentes períodos de tiempo. Con este fin se ensayó la estabilidad mostrada por la enzima β -galactosidasa durante su almacenado y continua reutilización. Los resultados obtenidos del efecto de la reutilización, tras diferentes períodos de almacenado, sobre dos fracciones preparadas con diferente tiempo de inmovilización se muestran en las Tablas 5.16-17 y en la Figura 5.7.

La actividad enzimática liberada a las disoluciones de almacenado fue nula o despreciable. Se observa que en ambos casos, partimos de valores similares de actividad enzimática. Los porcentajes de retención obtenidos, para tiempos de almacenado similares, tienden a ser iguales en ambas fracciones, independientemente de los ensayos intermedios realizados, siendo estos resultados independientes, también, de los tiempos de inmovilización empleados.

TABLA 5.16

$t_{\text{inmov.}}$	$[\text{ONF}]_0$	R ₁ (30 días)	R ₂ (60 días)	R ₃ (120 días)
(h)	(mM)	(%)	(%)	(%)
2	1,47	25,26	16,47	10,84

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 41% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,05 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo de 2 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. Almacenados en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en MgSO₄, a una temperatura de -18°C. En todos los casos la actividad de la enzima inmovilizada, así como la liberada al medio de almacenado se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después de cada almacenado.

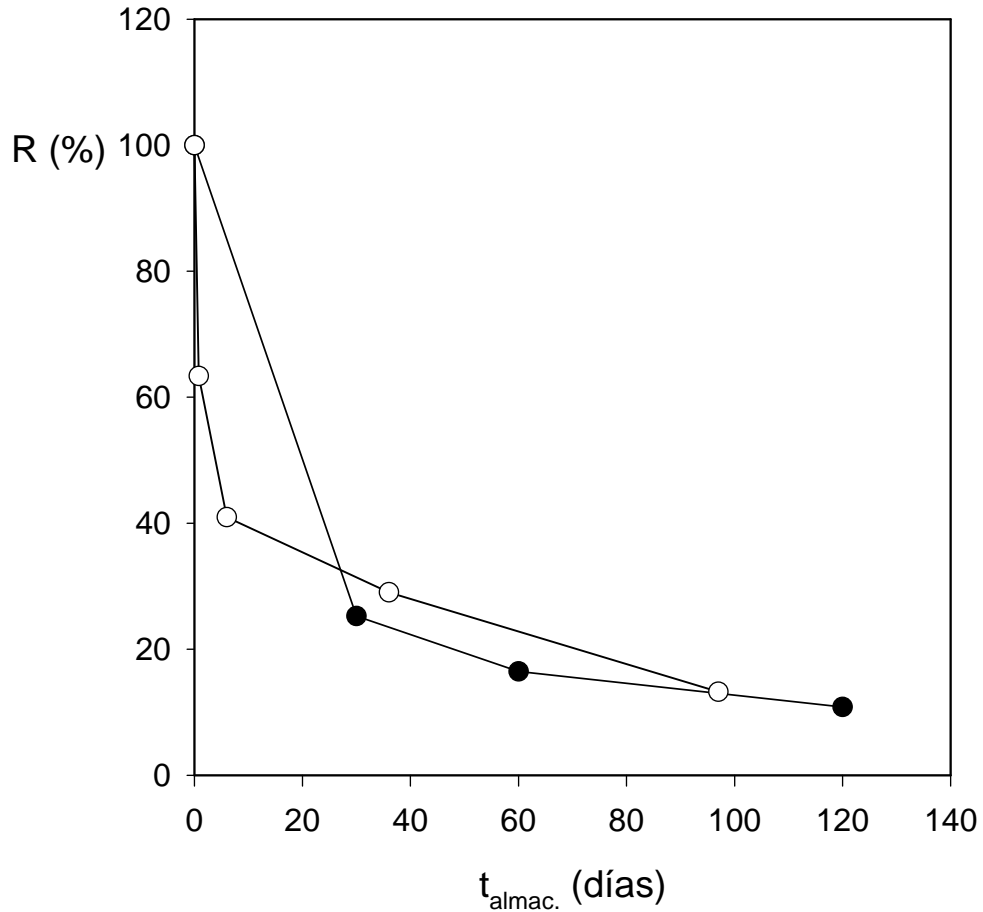
TABLA 5.17

$t_{\text{inmov.}}$	$[\text{ONF}]_0$	R ₁ (19 h)	R ₂ (6 días)	R ₃ (36 días)	R ₄ (97 días)
(h)	(mM)	(%)	(%)	(%)	(%)
18	1,53	63,36	40,96	29,04	13,23

Soporte de inmovilización: Mezcla al 50% del derivado de inulina cinamoilado un 41% con el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, ya entrecruzados (0,05 g). La inmovilización de β -galactosidasa (14,9 U/mL; 5 minutos de agitación) se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) y glicerina (31 g) durante un tiempo de 18 horas y a una temperatura entre 0-4°C. Lavado inicial 3.b descrito en el apartado 2.5.2. Lavados posteriores 4.b descrito en el apartado 2.5.2. Almacenado previo durante 2 horas en disolución de glicerina al 50% en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,1) y 0,5 mM en MgSO₄, a una temperatura de -18°C. Almacenados posteriores en el medio y temperatura citados anteriormente. En todos los casos la actividad de la enzima inmovilizada, así como la liberada al medio de almacenado se midió en discontinuo. R, representa el porcentaje de actividad enzimática retenida después de cada almacenado.

La diferencia en el primer rendimiento obtenido puede ser debida, por un lado al diferente tiempo de inmovilización empleado, y por otro, al corto almacenado inicial a que es sometida la fracción en que se utilizó un tiempo de inmovilización de 18 horas. Así, cuando se empleó un tiempo de inmovilización de 18 horas, la enzima tiene tiempo para acomodarse del modo más adecuado sobre el soporte de inmovilización. Además, el almacenado puede ser responsable de un reagrupamiento adicional de la enzima sobre el soporte de inmovilización, inactivación de cierta cantidad de enzima e incluso pérdida de enzima inactiva al medio y mejor reagrupamiento de la restante. Todo ello daría lugar a que la enzima que queda esté bien retenida y activa de tal modo que los porcentajes de retención son elevados desde el primer momento. Por lo tanto este corto almacenado inicial, previo al ensayo de la actividad enzimática retenida, sería aconsejable realizarlo para garantizar que la actividad medida corresponda a enzima bien retenida.

En cualquier caso es de destacar la gran actividad enzimática que permanece activa después de los ensayos realizados y tras el número de días en que estas fracciones han sido almacenadas. Así, las fracciones han sido ensayadas 4 ó 5 veces a lo largo de un período de tiempo que osciló entre los 100-120 días. Los buenos resultados aquí mostrados, han sido corroborados con otras fracciones preparadas en las cuales, tras reiterados ensayos a lo largo de un período de almacenado de aproximadamente un año, retuvieron alrededor de un 15% de la actividad enzimática medida en el ensayo inicial. Además, en muestras almacenadas durante un largo período de tiempo inicial (90 días) antes de ensayar su actividad enzimática, parece observarse que no sólo la actividad mostrada en la primera medida fue muy elevada, sino que además la retenida tras reiterados ensayos posteriores fue superior (resultados no mostrados).

**FIGURA 5.7**

Efecto de la reutilización sobre la actividad enzimática retenida por β -galactosidasa inmovilizada. Tiempo de inmovilización de 2 horas (λ) ó 18 horas (O).

Representación del tanto por cien de actividad enzimática retenida, R(%), frente al tiempo de almacenado, t_{almac.} (días). Las condiciones del ensayo se describen en las Tablas 5.16-17.

Capítulo 6

6 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

6.1 ANTECEDENTES

Como ya se dijo en el capítulo de Introducción, una contaminación presente en las aguas residuales de diferentes tipos de industrias, de la que apenas discusión puede encontrarse, es la debida a productos de reacción no precipitados tras un proceso de descontaminación enzimática, así como la debida a la propia enzima soluble utilizada que queda en el medio de reacción una vez que el proceso ha terminado. Una forma de evitar la contaminación debida a la presencia de enzima soluble, es mediante su inmovilización sobre una matriz, que tras el proceso de eliminación de sustancias aromáticas sea fácil de extraer del medio de ensayo. En este sentido nuestro procedimiento de inmovilización ofrece grandes ventajas en cuanto a manipulación tanto durante el proceso de ensayo en sí, como posteriormente para separar la matriz con la enzima inmovilizada del medio de reacción.

Además, para intentar que la reacción de polimerización se produjera en una gran extensión y producir productos de elevado peso molecular que precipitaran del medio y fueran fáciles de eliminar por filtración o sedimentación, se decidió utilizar, como sólido de inmovilización, los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona y de sacarosa. Como la precipitación de un polímero de elevado peso molecular no fue posible, se decidió complementar el medio de reacción con quitosano como coagulante.

6.2 ENSAYOS PREVIOS

6.2.1 Recta de calibrado

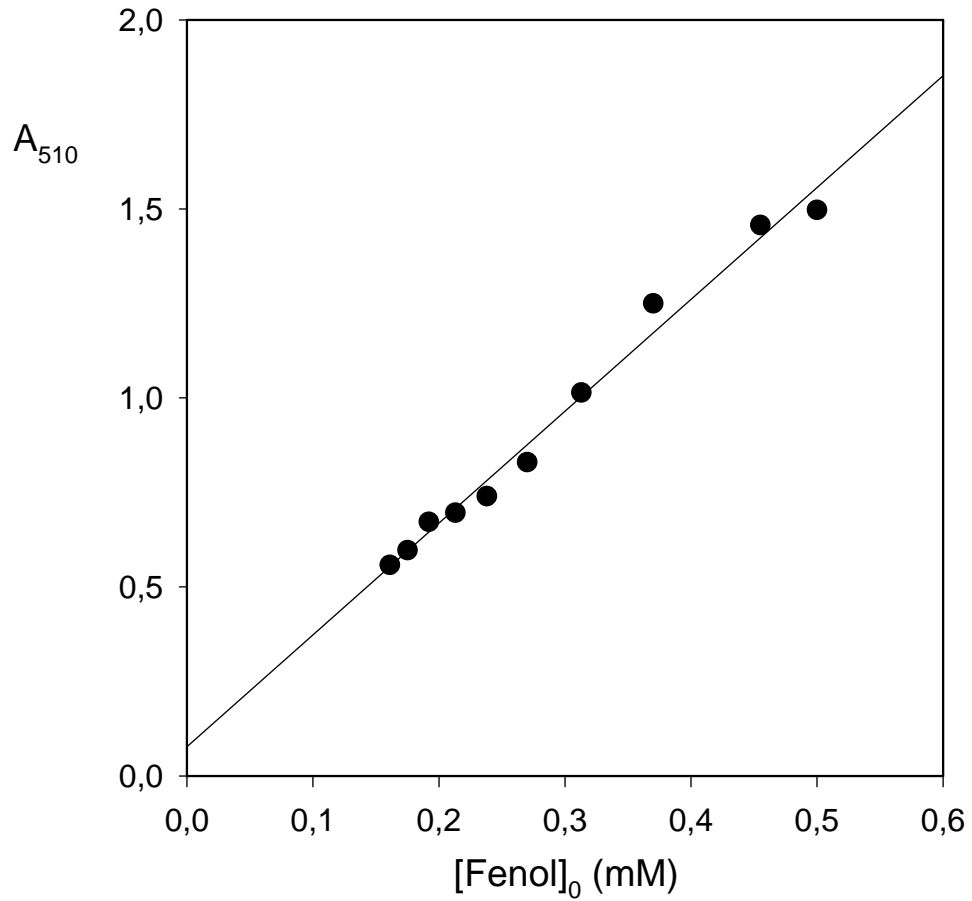
Con el fin de valorar la concentración de fenol presente en los distintos medios de ensayo, se realizó una recta de calibrado que abarcara el rango de concentraciones de fenol a ensayar, que osciló entre 0,1 y 0,5 mM. Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de 4-aminoantipirina (AAP), ferricianuro potásico (KF) y fenol. El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). En presencia de KF el fenol es oxidado a su correspondiente radical libre, el cual se acopla a AAP dando lugar a un compuesto rosado y que posee un máximo de absorción a 510 nm. Esta longitud de onda puede ser utilizada para la valoración de este reactivo. Los resultados obtenidos para diferentes concentraciones iniciales de fenol se muestran en la tabla y gráfica siguientes.

TABLA 6.1

Recta de calibrado para la valoración de la concentración de fenol.

[Fenol]_{inicial}	[Fenol]_{cubeta}	A₅₁₀
(mM)	(mM)	
0,500	0,125	1,497
0,455	0,114	1,457
0,370	0,093	1,250
0,313	0,078	1,014
0,270	0,068	0,830
0,238	0,060	0,740
0,213	0,053	0,696
0,192	0,048	0,672
0,175	0,044	0,597
0,161	0,040	0,558

Para el ensayo, las concentraciones en la cubeta fueron 2,08 mM para AAP; 8,34 mM para KF; 25 mM para la disolución tampón. El tiempo de reacción osciló entre 8-10 minutos y el valor de absorbancia medido a 510 nm (A₅₁₀). Ensayo en blanco realizado usando agua destilada en lugar de la disolución acuosa de fenol.

**FIGURA 6.1****Recta de calibrado para la determinación de la concentración de fenol.**

Representación del valor de absorbancia medido a 510 nm, A_{510} , frente a la concentración inicial de fenol, $[\text{Fenol}]_0$ (mM). La recta obtenida se ajusta a la expresión: $A_{510} = 0,077 + 2,96[\text{Fenol}]_0$ ($r^2 = 0,99$).

6.2.2 Ensayos en ausencia de HRPC

Se realizaron una serie de ensayos para comprobar si las bolas de vidrio con nuestros sólidos de inmovilización retenían, por adsorción, el fenol presente en el medio de reacción, interfiriendo de este modo en la eliminación enzimática de este reactivo. Para ello se realizaron ensayos usando jeringuillas con 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro recubiertas con el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa, a partir de una disolución clorofórmica de este sólido con una concentración de 11,8 g/L, e irradiadas durante cinco segundos para asegurar que la retención de este sólido sea la máxima posible. En el extremo inferior de la jeringuilla se colocó un poco de lana de vidrio para que actuara como filtro de los polímeros que se formaran durante la reacción.

Antes de iniciar el proceso, se realizó un ensayo en blanco del modo indicado en el apartado anterior, y con el valor obtenido se hizo el cero en el espectrofotómetro. Como la disolución de fenol se preparó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), para la realización del blanco se sustituyó el agua destilada por este tampón. También se midió el valor de absorbancia correspondiente a la disolución inicial de fenol (0,5 mM) a la longitud de onda de medida (510 nm). Tras realizar el ensayo en blanco y la medida a tiempo cero de la disolución de fenol preparada, ésta se puso a recircular con aireación, mediante la bomba peristáltica.

El ensayo anterior se repitió pero sin utilizar bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización. Así, la disolución de fenol 0,5 mM en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) se puso a recircular con aireación, mediante la bomba peristáltica, a través de una jeringuilla de polipropileno con un poco de lana de vidrio en su extremo inferior. Después de 45 minutos de recirculación, se retiraron sendas fracciones de 0,5 mL de cada uno de los medios de reacción, y se ensayaron para conocer el valor de absorbancia a 510 nm obtenido para cada una de estas fracciones. Así, para el medio que contenía las bolas de vidrio recubiertas con el sólido de inmovilización, se obtuvo un valor de absorbancia de 1,198 mientras que cuando no estuvieron presentes las bolas de vidrio con el sólido de inmovilización, el valor obtenido fue de 1,199.

Los datos mostrados en el párrafo anterior, claramente ponen de manifiesto que nuestro sólido de inmovilización no retiene fenol por adsorción, por lo que no interfiere en la eliminación enzimática de este sustrato por acción de las preparaciones con HRPC inmovilizada, utilizadas a lo largo de esta Memoria.

6.3 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Para los estudios realizados en este capítulo, se prepararon diferentes fracciones utilizando como matriz inerte para la aplicación del sólido de inmovilización 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. El método empleado para la preparación del soporte fue por evaporación del disolvente y posterior irradiación, y el método de inmovilización fue el indicado para bolas de vidrio en Materiales y Métodos.

6.3.1 HRPc inmovilizada sobre el derivado de D-glucosona

Inicialmente se empleó como sólido de inmovilización, el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona. La elección de este soporte de inmovilización estuvo motivada por los buenos resultados de actividad enzimática retenida, así como por la estabilidad de HRPc cuando estuvo inmovilizada sobre él. Otra razón para su elección está relacionada con la posibilidad de inmovilizar a la enzima de forma covalente, impidiendo así su liberación al medio y la consecuente contaminación.

El proceso de tratamiento de la disolución fenólica se inició mediante la enzima inmovilizada y a diferentes intervalos de tiempo se sacaron alícuotas del medio de reacción y se midió la concentración de fenol residual presente. Para facilitar la eliminación de los polímeros formados durante la acción de la enzima inmovilizada, se incluyó una capa de quitosano de aproximadamente 0,5 cm de altura en la parte inferior de la jeringuilla. Los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras realizadas fueron convertidos en concentración de fenol residual mediante la recta de calibrado realizada y mostrada en el apartado 6.2.1 y, los resultados se muestran en la Tabla 6.2.

Cuando se repitió el ensayo con doble cantidad de masa de bolas de vidrio (30 g) pero también doble concentración de fenol presente en el medio de reacción (0,2 mM), se observó una similar eliminación de fenol, que disminuyó hasta una concentración del 27% de la concentración inicial tras un tiempo de ensayo superior. En este segundo ensayo, la concentración de H_2O_2 en el medio de reacción fue también algo superior e igual a 0,7 mM. Los resultados obtenidos, en este segundo ensayo, se muestran en la Tabla 6.3.

La representación conjunta de los datos mostrados en las Tablas 6.2 y 6.3 se resume en la Figura 6.2.

TABLA 6.2

Eliminación de fenol en medio acuoso mediante HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Tiempo (min)	[Fenol] (mM)	R (%)
0	0,1005	100
1	0,0630	62,69
2	0,0590	58,71
3	0,0564	56,12
5	0,0539	53,63
15	0,0539	53,63
25	0,0481	47,86
40	0,0439	43,68
55	0,0399	39,70
70	0,0376	37,41
85	0,0376	37,41
100	0,0357	35,52

Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Concentración de sólido de inmovilización de 15 g/L. Inmovilización de HRPc (19,6 µg/mL) realizada en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante 21 horas a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. Ensayo enzimático realizado, en continuo, en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). El medio se recirculó mediante una bomba peristáltica. Concentración de fenol de 0,1 mM en el medio de ensayo. La concentración de H₂O₂ en el medio de trabajo fue de 0,5 mM.

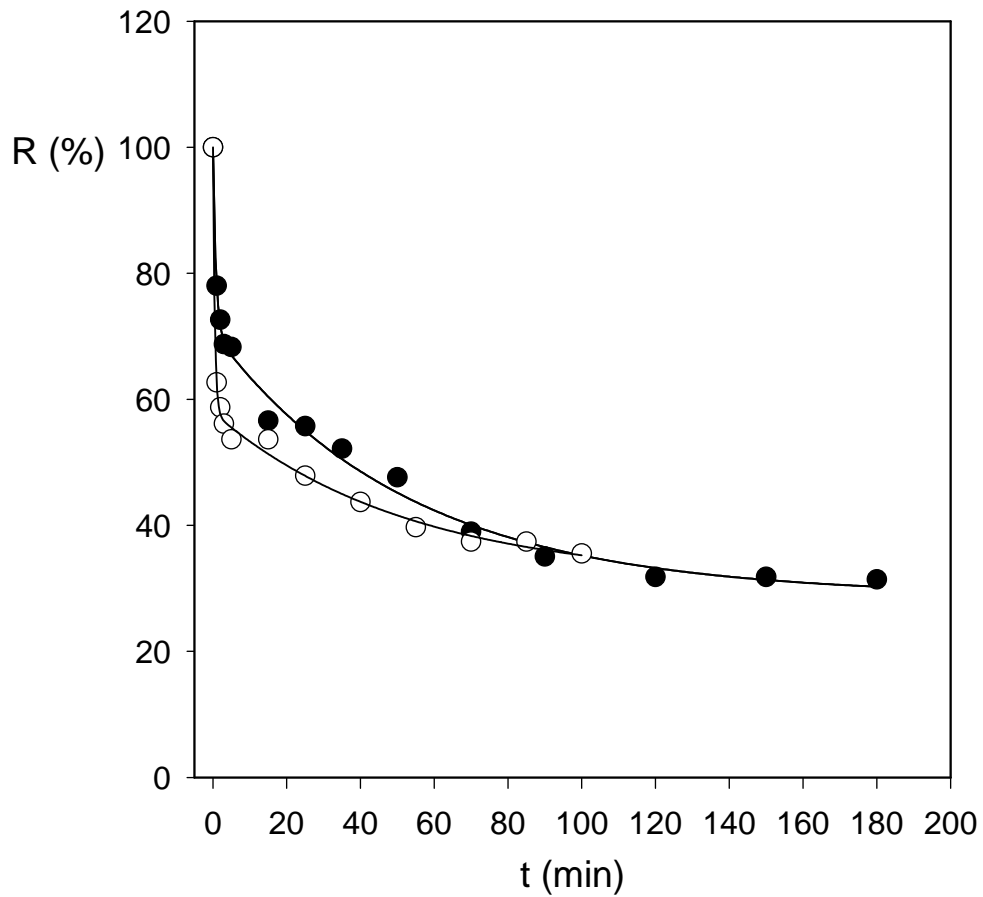
TABLA 6.3

Eliminación de fenol en medio acuoso mediante HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Tiempo	[Fenol]	R
(min)	(mM)	(%)
0	0,2015	100
1	0,1572	78,02
2	0,1463	72,61
3	0,1385	68,74
5	0,1376	68,29
15	0,1141	56,63
25	0,1123	55,73
35	0,1051	52,16
50	0,0960	47,64
70	0,0785	38,96
90	0,0706	35,04
120	0,0641	31,81
150	0,0641	31,81
180	0,0633	31,41
180*	0,0550	27,30

Matriz inerte: 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Concentración de sólido de inmovilización de 15 g/L. Inmovilización de HRPc (19,6 µg/mL) realizada en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante 21 horas a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. Ensayo enzimático realizado, en continuo, en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). El medio se recirculó mediante una bomba peristáltica. Concentración de fenol de 0,2 mM en el medio de ensayo. La concentración de H₂O₂ en el medio de trabajo fue de 0,7 mM.

De la muestra extraída tras 180 minutos de reacción, una fracción fue separada del resto y filtrada mediante un filtro de acetato de 0,22 mm. El filtrado obtenido fue ensayado para conocer la concentración de fenol residual presente, encontrándose un valor de 0,055 mM, que supone una caída del 27% de la concentración de fenol presente inicialmente, y un valor de un 4% inferior del obtenido para la fracción de la última muestra ensayada que no fue filtrada.

**FIGURA 6.2**

Tratamiento de una disolución de fenol de concentración 0,1 mM (O) y 0,2 mM (λ) con HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación del tanto por cien de fenol residual presente, R(%), frente al tiempo de ensayo, t (min). Los datos del ensayo se especifican en las Tablas 6.2 y 6.3.

6.3.2 HRPc inmovilizada sobre el derivado de sacarosa

Como sólido de inmovilización se empleó, también, el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa. Para asegurar que el sólido de inmovilización retuviera la máxima cantidad posible de actividad enzimática, fue irradiado sólo durante cinco segundos que corresponde al máximo de actividad enzimática retenida por este derivado, tal y como se desprende de los estudios realizados sobre la influencia del tiempo de irradiación recogidos en el apartado 3.2.5. La presencia de gran cantidad de enzima sobre este soporte de inmovilización podría dar lugar a polímeros que podrían ser retirados, posteriormente, por filtración.

La eliminación de fenol por la enzima inmovilizada y el seguimiento de la concentración de fenol con el tiempo se realizó como se indica en el apartado anterior y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.4. Al finalizar el ensayo el medio de reacción final se mantuvo dentro de la jeringuilla en presencia de la enzima inmovilizada y a temperatura ambiente. Después de 24 horas desde la última medida, se valoró la concentración residual de fenol, obteniéndose un valor de 0,175 mM, lo que supone un 36,3% de la concentración de fenol inicial. Además, debe ser mencionado que este valor obtenido cae sobre la asíntota hacia la que tienden los datos obtenidos cuando son ajustados, convenientemente, a una caída exponencial de la concentración de fenol debida a la acción de la enzima inmovilizada.

Cuando se repitió el ensayo con doble cantidad de masa de bolas de vidrio (30 g) pero con menor concentración de fenol presente en el medio de reacción (0,2 mM), se observó un efecto similar al obtenido con el soporte anterior, donde la concentración de fenol disminuyó hasta un valor correspondiente al 27,3% de la concentración inicial. Los resultados obtenidos, en este segundo ensayo, son mostrados en la Tabla 6.5.

La representación conjunta de los datos mostrados en las Tablas 6.4 y 6.5 se muestra en la Figura 6.3. La representación conjunta de los datos obtenidos para el tratamiento de aguas con fenol con HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona y sacarosa en condiciones similares, se muestra en la Figura 6.4.

TABLA 6.4

Eliminación de fenol en medio acuoso mediante HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Tiempo	[Fenol]	R
(min)	(mM)	(%)
0	0,4816	100
1	0,4171	86,61
2	0,4085	84,82
3	0,3965	82,33
5	0,3914	81,27
15	0,3625	75,27
25	0,3425	71,12
35	0,3357	69,71
50	0,3136	65,12
70	0,2853	59,24
90	0,2751	57,12
120	0,2606	54,11
150	0,2479	51,47
180	0,2375	49,32
1620*	0,1750	36,34

Matriz inerte: 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Concentración de sólido de inmovilización de 11,8 g/L. Inmovilización de HRPc (19,6 µg/mL) realizada en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante 21 horas a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. Ensayo enzimático realizado, en continuo, en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). El medio se recirculó mediante una bomba peristáltica. Concentración de fenol de 0,5 mM en el medio de ensayo. La concentración de H₂O₂ en el medio de trabajo fue de 0,7 mM. Se utilizó quitosano (0,5 cm) y un filtro de acetato de 0,22 mm para eliminar los polímeros formados.

TABLA 6.5

Eliminación de fenol en medio acuoso mediante HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Tiempo	[Fenol]	R
(min)	(mM)	(%)
0	0,1985	100
1	0,1481	74,61
2	0,1382	69,62
3	0,1343	67,66
5	0,1263	63,63
15	0,1138	57,33
25	0,1025	51,64
35	0,1025	51,64
50	0,0902	45,44
70	0,0670	33,75
90	0,0681	34,31
120	0,0605	30,48
150	0,0541	27,25
180	0,0566	28,51
195	0,0542	27,31

Matriz inerte: 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. Concentración de sólido de inmovilización de 11,8 g/L. Inmovilización de HRPc (19,6 µg/mL) realizada en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante 21 horas a una temperatura entre 0-4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. Ensayo enzimático realizado, en continuo, en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). El medio se recirculó mediante una bomba peristáltica. Concentración de fenol de 0,2 mM en el medio de ensayo. La concentración de H₂O₂ en el medio de trabajo fue de 0,7 mM. Se utilizó quitosano (0,5 cm) y un filtro de acetato de 0,22 mm para eliminar los polímeros formados.

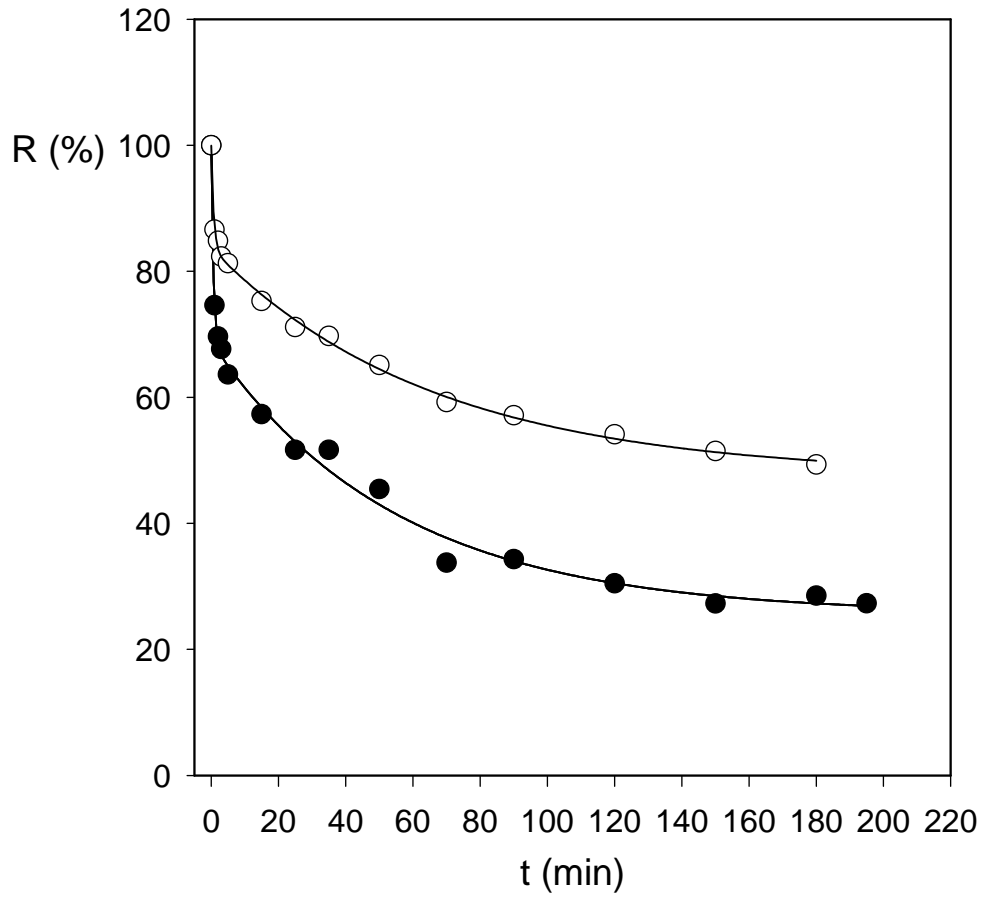
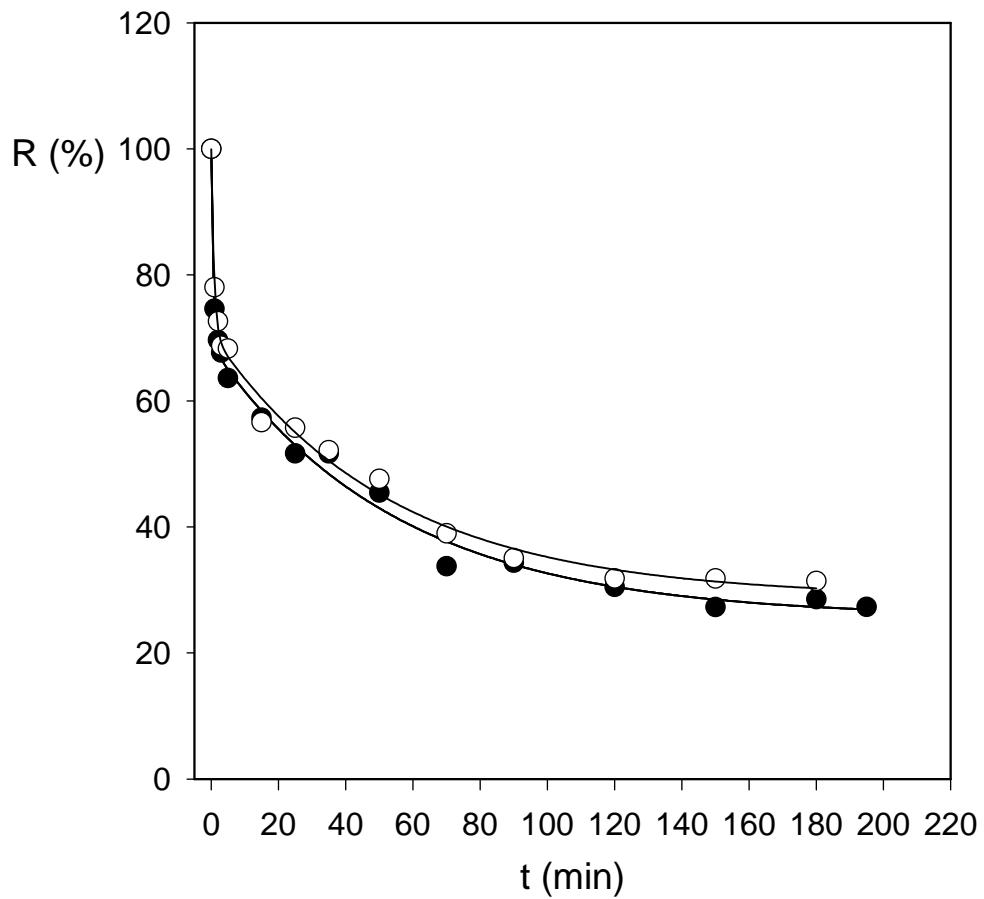


FIGURA 6.3

Tratamiento de una disolución de fenol de concentración 0,2 mM (λ) y 0,5 mM (O) con HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Representación del tanto por cien de fenol residual presente, R(%), frente al tiempo de ensayo, t (min). Los datos del ensayo se especifican en las Tablas 6.4 y 6.5.

**FIGURA 6.4**

Tratamiento de una disolución de fenol de concentración 0,2 mM con HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de sacarosa (λ) y D-glucosona (O).

Representación del tanto por cien de fenol residual presente, R(%), frente al tiempo de ensayo, t (min). Los datos del ensayo se especifican en las Tablas 6.3 y 6.5.

Si se consideran los resultados obtenidos para una concentración inicial de fenol de 0,2 mM (Wada et al., 1993; Wada et al., 1995; Tatsumi et al., 1996), se puede comprobar que se alcanza una reducción de la concentración inicial de fenol superior al 70%, y que el comportamiento de HRPc y resultado final obtenido fue independiente de si estuvo inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona o sobre el derivado de sacarosa. Los resultados aquí obtenidos mejoran los encontrados en la literatura, en la cual puede encontrarse una reducción del contenido inicial de fenol entre el 30% y 60%, dependiendo de las características de las aguas residuales tratadas (Peralta-Zamora, 1998).

Además, los resultados obtenidos podrían ser todavía mejorados puesto que diferentes aspectos como la utilización de aditivos protectores como polietilenglicol, coagulantes como gel de quitosano en lugar de escamas, co-sustratos, relación entre concentración inicial de fenol y concentración de H₂O₂ utilizada, entre otros, no han sido optimizados. A pesar de lo anteriormente dicho, los resultados mostrados son difíciles de comparar con los conseguidos en otros trabajos, puesto que ha sido relatado que el proceso de inactivación de la enzima HRPc y por lo tanto el rendimiento del método utilizado dependió estrechamente del diseño del reactor utilizado y de los parámetros de trabajo fijados (Buchanan et al., 1998).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo, ha conducido a la obtención de las siguientes conclusiones más significativas.

1. Los derivados cinamoilados de mono, di, oligo y polisacáridos, así como de otros compuestos polihidroxílicos, son nuevos soportes fotoentrecruzables adecuados para la inmovilización de enzimas.
2. El tiempo de irradiación a que se expone el soporte de inmovilización para obtener el grado de entrecruzamiento necesario, influye drásticamente en la actividad final de los inmovilizados de HRPc, dándose los valores máximos de actividad enzimática para grados de entrecruzamiento entre 0,4 y 0,6. También influye en la acomodación de la enzima al soporte, como se desprende de la comparación de los valores obtenidos para las constantes de Michaelis de los inmovilizados.
3. Entre los soportes ensayados, los más adecuados para la inmovilización son:
 - Para HRPc los derivados de moléculas de pequeño tamaño (preferiblemente lineales o con estructura furanosa) sin grupos hidroxilo libres, obteniéndose los mejores resultados con los derivados totalmente cinamoilados de D-glucosona, D-sorbitol y etil-D-glucopiranosido.
 - Para β -galactosidasa la presencia de grupos hidroxilo residuales en el soporte favorece la inmovilización.
4. En cuanto al modo de utilización del soporte, los mejores resultados se obtienen:
 - Para HRPc eligiendo como matriz inerte bolas de vidrio y, como soportes, muestras con una sola capa preparada a partir de una disolución clorofórmica de concentración 15 g/L e irradiadas durante un tiempo de 15 minutos. El resultado obtenido es independiente del modo en que se deposita la capa de prepolímero de inmovilización.
 - Para β -galactosidasa usando directamente el soporte convenientemente pulverizado.

5. Las condiciones de inmovilización en que se obtienen los mejores resultados son:
 - Para la enzima HRPc, pH próximos a 9,0 durante tiempos entre 2 y 24 horas y a temperaturas entre 0 y 4°C.
 - Para la enzima β -galactosidasa, pH próximos a 9,0 durante tiempos entre 2 y 24 horas y a temperaturas entre 0 y 4°C conteniendo el medio glicerina para favorecer la inmovilización. Si bien para una mayor estabilidad frente a almacenado los tiempos aconsejables son entre 6 y 8 horas.
6. En la realización de un lavado eficaz de los inmovilizados preparados con la enzima HRPc, son suficientes dos períodos de 30 minutos de flujo en contracorriente de agua destilada a una temperatura entre 0 y 4°C. Para eliminar la enzima retenida sin pérdida apreciable de actividad, los detergentes no iónicos son los más adecuados.
7. Para la conservación de inmovilizados los mejores resultados se obtienen:
 - De HRPc, empleando agua destilada en el medio de almacenado.
 - De β -galactosidasa, en disoluciones tampón de pH 7,0 que contienen en su composición iones Mg^{+2} y glicerina.
8. La inmovilización de HRPc sobre los derivados cinamoilados obtenidos supone, en todos los casos ensayados, una estabilización de la enzima con respecto a la forma soluble, como por ejemplo lo muestra la alta estabilidad frente a la reutilización y los elevados valores de actividad enzimática final retenida tras 270 días de almacenado.
9. Las cinéticas de inactivación térmica encontrada en los soportes ensayados son similares a las descritas en la bibliografía disponible para HRPc inmovilizada.
10. La estabilidad térmica de HRPc inmovilizada en los soportes ensayados es mayor que la de la enzima soluble como lo muestran las menores constantes de inactivación obtenidas, siendo más ostensible dicha mejora al aumentar la temperatura de ensayo.
11. La estabilidad de HRPc inmovilizada en los soportes ensayados frente a la inactivación por peróxidos a pH 7,0, es mayor que la de la enzima soluble como lo muestran las menores constantes de inactivación que fueron entre 2 y 3 veces inferiores.

- 12.** La cinética de inactivación por efecto del tiempo de almacenado mostrada por la enzima inmovilizada sobre nuestros soportes fue similar a la encontrada en los ensayos de inactivación térmica, aunque los valores de constantes de inactivación obtenidos fueron muy inferiores.
- 13.** El método de flujo continuo utilizado para obtener el registro de absorbancias de las muestras que sirvió para el cálculo de las correspondientes constantes cinéticas, constituye un novedoso y conveniente procedimiento para obtener tales datos, como se pone de manifiesto en la presente Memoria.
- 14.** En inmovilización covalente, los valores de actividad enzimática obtenidos en los ensayos exploratorios realizados son lo suficientemente significativos como para esperar que este aspecto pueda ser desarrollado en futuros trabajos.
- 15.** Los inmovilizados de HRPc preparados sobre los nuevos soportes obtenidos, utilizados a modo de un Reactor Continuo de Lecho Empaquetado con Recirculación y Flujo Descendente, pueden resultar altamente eficaces en la eliminación de los compuestos fenólicos presentes en aguas residuales de procesos industriales, como lo indican los resultados obtenidos, que mejoran los encontrados en la bibliografía disponible.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Allan, F. D. (1969). Patente URSS242788.
- Arcesi, J. A. y Rauner, F. J. (1972). Patente US3640722.
- Arica, M. Y.; Baran, T. y Denizli, A. (1999). *J. Appl. Polym. Sci.* **72**, 1367.
- Ariga, O.; Sano, T. y Sano, Y. (1992). *J. Ferment. Bioeng.* **74**, 120.
- Arnao, M. B.; Acosta, M.; Del Río, J. A.; Varón, R. y García-Cánovas, F. (1990). *Biochim. Biophys. Acta* **1041**, 43.
- Arroyo, M. (1998). *Ars Pharm.* **39**, 111.
- Asther, M. y Meunier, J. C. (1993). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **38**, 57.
- Atkins, G. L. y Nimmo, I. A. (1980). *Anal. Biochem.* **104**, 1.
- Axén, R.; Carlsson, J.; Janson, J. C. y Porath, J. (1971). *Enzymologia* **41**, 359.
- Axén, R.; Myrin, P. A. y Janson, J. C. (1970). *Biopolymers* **9**, 401.
- Axén, R.; Porath, J. y Ernback, S. (1967). *Nature* **214**, 1302.
- Bar-Eli, A. y Katchalski, E. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 1690.
- Barker, S. A.; Cho Tun, H.; Doss, S. H.; Gray, C. J. y Kennedy, J. F. (1971). *Carbohydrate Res.* **17**, 471.
- Bartling, G. J.; Brown, H. D. y Chattopadhyay, S. K. (1973). *Nature* **243**, 342.
- Baumann, N.; Zweifel, H.; Baumann, M. y Waterhouse, J. S. (1978). Patente US4079041.
- Bennett, H. P. J.; Elliot, D. F.; Evans, B. E.; Lowry, P. J. y McMartin, C. (1972). *Biochem. J.* **129**, 695.
- Bernfeld, P. y Bieber, R. E. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 587.
- Bernfeld, P.; Bieber, R. E. y Watson, D. M. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 570.
- Bernfeld, P. y Wan, J. (1963). *Science* **142**, 678.
- Bertoniere, N. R.; Franklin, W. E. y Rowland, S. P. (1971). *Text. Res. J.* **41**, 1.
- Bishop, W. H.; Quiocho, F. A. y Richards, F. M. (1966). *Biochemistry* **5**, 4077.
- Blumenthal, R.; Caplan, S. R. y Kedem, O. (1967). *Biophys. J.* **7**, 735.

- Bódalo, A.; Gómez, E.; Gómez, J. L.; Bastida, J.; Máximo, M. F. y Díaz, F. (1991a). *Process Biochem.* **26**, 349.
- Bódalo, A.; Gómez, E.; Gómez, J. L.; Bastida, J.; Máximo, M. F. y Selva, F. C. (1992). *Industria Farmacéutica*, **julio/agosto**, 33.
- Bódalo, A.; Gómez, E.; Máximo, M. F.; Gómez, J. L. y Bastida, J. (1991b). *Biotechnol. Tech.* **5**, 393.
- Bogdanovskaya, V. A.; Kuznetsova, L. N. y Tarasevich, M. R. (1999). *Russ. J. Electrochem.* **35**, 621.
- Boguslavsky, L.; Kalash, H.; Xu, Z.; Beckles, D.; Geng, L.; Skotheim, T.; Laurinavicius, V. y Lee, H. S. (1995). *Anal. Chim. Acta* **311**, 15.
- Borden, D. G. (1974). *Polym. Eng. Sci.* **14**, 487.
- Bouman, E. K. y Goodson, L. H. (1965). *Anal. Chem.* **37**, 1378.
- Brinkman, E.; Delzenne, G.; Poot, A. y Willems, J. (1978). "Unconventional Imaging Processes", (Focal Press, Ed.), London.
- Brook, A. G. y Duff, J. M. (1973). *Can. J. Chem.* **51**, 352.
- Brown, E. y Racois, A. (1974). *Tetrahedron* **30**, 675.
- Brown, E.; Racois, A. y Gueniffey, H. (1970). *Tetrahedron Letters* **25**, 2139.
- Brown, H.D.; Barker, C. W. y Vincent, J. K. (1974). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1425.
- Brown, H. D.; Patel, A. B. y Chattopadhyay, S. K. (1968). *J. Chromatog.* **35**, 103.
- Buchanan, I. D.; Nicell, J. A. y Wagner, M. (1998). *J. Environ. Eng.* **124**, 794.
- Buehler, N. (1993). *Chimia* **47**, 375.
- Buettner, A. V. (1964). *J. Phys. Chem.* **68**, 3253.
- Bunting, P. S. y Laidler, K. J. (1972). *Biochemistry* **11**, 4477.
- Byrne, M. J. y Johnson, D. B. (1974). *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 496.
- Campbell, D. H.; Luescher, E. y Lerman, L. S. (1951). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 575.
- Cebra, J. J.; Givol, D.; Silman, H. I. y Katchalski, E. (1961). *J. Biol. Chem.* **236**, 1720.
- Celeste, J. R. (1969). Patente US3469982.
- Chafi, N.; Kolli, M.; Vergnaud, J. M. y Montheard, J. P. (1991). *J. Appl. Polym. Sci.* **43**, 1837.

- Chaga, G. (1994). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **20**, 43.
- Chan, W. W. C. y Mawer, H. M. (1972). *Arch. Biochem. Biophys.* **149**, 136.
- Chandross, E. A. y Tomlinson, W. J., III. (1979). Patente US4173475.
- Chang, B. S. y Mahoney, R. R. (1994). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**, 169.
- Chang, T. M. S. (1964). *Science* **146**, 524.
- Chang, T. M. S. (1971). *Nature* **229**, 117.
- Chang, T. M. S. y Poznansky, M. J. (1968). *Nature* **218**, 243.
- Chen, J. P.; Kiaei, D. y Hoffman, A. S. (1993). *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **5**, 167.
- Chibata, I. (1978). "Immobilized Enzymes: Research and Development", John Wiley & Sons.
- Chibata, I. y Tosa, T. (1976). "Applied Biochemistry and Bioengineering" Vol. 1, Academic Press.
- Chibata, I.; Tosa, T. y Matuo, Y. (1974). *Enzyme Engineering* **2**, 229.
- Chibata, I.; Tosa, T. y Sato, T. (1976b). *Methods Enzymol.* **44**, 739.
- Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T. y Mori, T. (1976a). *Methods Enzymol.* **44**, 746.
- Cleland, W. W. (1967). *Adv. Enzymol.* **29**, 1.
- Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Innocent, C. y Mailley, P. (1995). *Anal. Chim. Acta* **311**, 23.
- Cohen, A. B. y Fan, R. N. (1979). Patente US4174216.
- Cohen, M. B.; Spolter, L.; Chang, C. C.; MacDonald, N. S.; Takahashi, J. y Bobinet, D. D. (1974). *J. Nucl. Med.* **15**, 1192.
- Colburn, W. S. (1997). *J. Imaging Sci. Technol.* **41**, 443.
- Collier, R. y Kohlhaw, G. (1971). *Anal. Biochem.* **42**, 48.
- Cook, L.; Larter, R.; Shen, P. y Geest, T. (1993). *J. Phys. Chem.* **97**, 9060.
- Cuatrecasas, P. y Anfinsen, C. B. (1971). *Methods Enzymol.* **22**, 345.
- Dahlqvist, A.; Mattiasson, B. y Mosbach, K. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 395.
- Dapergolas, G.; Neerunjun, E. D. y Gregoriadis, G. (1976). *FEBS Lett.* **63**, 235.

- De Bagues, A. G. (1980). Tesis de Licenciatura "Empleo de las fotorresinas en la producción de redes de difracción". Facultad de Física, Universidad de Valencia.
- DeBoer, C. D. (1973). *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* **11**, 25.
- DeBoer, C. D.; Wadsworth, D. H. y Perkins, W. C. (1973). *J. Amer. Chem. Soc.* **95**, 861.
- Delzenne, G. A. (1972). "Reviews in Polymer Technology" Vol.1, (I. Skeist, Ed.), M. Dekker, New York.
- Delzenne, G. A. (1974). *Ind. Chim. Belg.* **39**, 249.
- Dinelli, D. (1972). *Process Biochem.* **7**, 9.
- Dixon, J. E. y Stolzenbach, F. E. (1974). *Israel J. Chem.* **12**, 529.
- Draper, N. R. y Smith, H. (1981). "Applied Regression Analysis", 2ª Ed., Wiley, New York.
- Egerton, P. L.; Hyde, E. M.; Trigg, J.; Payne, A.; Beynon, P.; Mijovic, M. V. y Reiser, A. (1981a). *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3859.
- Egerton, P. L.; Pitts, E. y Reiser, A. (1981b). *Macromolecules* **14**, 95.
- Ellis, G. P. (1959). *Adv. Carbohydr. Chem.* **14**, 63.
- Endrenyi, L. (1981). "Kinetic Data Analysis: Design and Analysis of Enzyme and Pharmacokinetics Experiments", Plenum Press, New York.
- Fan, R. N. (1977). Patente US4053313.
- Farbenfabriken Bayer AG. (1962). Patente US3030208.
- Feinstein, G. (1970). *FEBS Lett.* **7**, 353.
- Filippusson, H. y Hornby, W. E. (1970). *Biochem. J.* **120**, 215.
- Fox, N. S. (1984). *ACS Symp. Ser.* **242**, 367.
- Fréchet, J. M. J. (1981). *Tetrahedron* **37**, 663.
- Fujita, Y. (1976). Patente 76-70871.
- Fujitsubo, W. S. (1986). *Solid State Technol.* **29**, 161.
- Fukui, S.; Tanaka, A.; Iida, T. y Hasegawa, E. (1976). *FEBS Lett.* **66**, 179.
- Fukumura, T. (1974). Patente 74-15795.
- Gabel, D.; Vretblad, P.; Axén, R. y Porath, J. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* **214**, 561.
- Garcia-III, A.; Oh, S. y Engler, C. R. (1989). *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 321.

- García-Moreno, M.; Moreno-Conesa, M.; Rodríguez-López, J. N.; García-Cánovas, F. y Varón, R. (1999). *Biol. Chem.* **380**, 689.
- Garguilo, M. G.; Huynh, N.; Proctor, A. y Michael, A. C. (1993). *Anal. Chem.* **65**, 523.
- Gellf, G. y Boudrant, J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* **334**, 467.
- Gervay, J. E. y Walker, P. (1973). Patente US3718473. (1974). Patente US3787213. (1975). Patente US3879204.
- Ghose, T. K. y Kostick, J. A. (1970). *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 921.
- Glassmeyer, C. K. y Ogle, J. D. (1971). *Biochemistry* **10**, 786.
- Gloenco, S.; Morisi, F. y Pansolli, P. (1973). *FEBS Lett.* **36**, 57.
- Goldman, R.; Kedem, O.; Silman, I. H.; Caplan, S. R. y Katchalski, E. (1968). *Biochemistry* **7**, 486.
- Goldman, R.; Silman, H. I.; Caplan, S. R.; Kedem, O. y Katchalski, E. (1965). *Science* **150**, 758.
- Goldstein, L. (1970). *Methods Enzymol.* **19**, 935.
- Goldstein, L.; Levin, Y. y Katchalski, E. (1964). *Biochemistry* **3**, 1913.
- Goldstein, L.; Lifshitz, A. y Sokolvsky, M. (1971). *Int. J. Biochem.* **2**, 448.
- Goldstein, L.; Pecht, M.; Blumberg, S.; Atlas, D. y Levin, Y. (1970). *Biochemistry* **9**, 2322.
- González-Siso, M. I.; Freire, A.; Ramil, E.; Belmonte, E. R.; Torres, A. R. y Cerdán, E. (1994). *Process Biochem.* **29**, 7.
- Goodson, L. H. y Jacobs, W. B. (1973). *Anal. Biochem.* **51**, 362.
- Green, M. L. y Crutchfield, G. (1969). *Biochem. J.* **115**, 183.
- Gregor, H. P. y Rauf, P. W. (1975). *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 445.
- Gregoriadis, G.; Leathwood, P. D. y Ryman, B. E. (1971). *FEBS Lett.* **14**, 95.
- Grubhofer, N. y Schleith, L. (1953). *Naturwissenschaften* **40**, 508.
- Grzywnowicz, K.; Brzyska, M.; Lobarzewski, J. y Greppin, H. (1992). *J. Mol. Catal.* **77**, 365.
- Guilbault, G. G. (1984). "Analytical Uses of Immobilized Enzymes", Marcel Dekker, Inc.: New York.
- Guilbault, G. G. y Kramer, D. N. (1965). *Anal. Chem.* **37**, 1675.

- Guilbault, G. G. y Nagy, G. (1973). *Anal. Letters* **6**, 301.
- Gutman, M. y Rimon, A. (1964). *Can. J. Biochem.* **42**, 1339.
- Haas, G.; Neisius, K. H. y Stein, A. (1983). Patente EP0096282.
- Hamton, R. R. y Newell, J. E. (1949). *Anal. Chem.* **21**, 914.
- Hasegawa, M. (1995). *Adv. Phys. Org. Chem.* **30**, 117.
- Hasegawa, M.; Ookawa, H.; Tanabe, T.; Tajima, S.; Umegaya, Y.; Koyashiki, Y. y Kitamura, T. (1994). Patente JP6197792.
- Henry, S.; Koczan, J. y Richardson, T. (1974). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 289.
- Hicks, G. P. y Updike, S. J. (1966). *Anal. Chem.* **38**, 726.
- Hiner, A. N. P.; Hernández-Ruíz, J.; Arnao, M. B.; García-Cánovas, F. y Acosta, M. (1996). *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 655.
- Hiner, A. N. P.; Hernández-Ruíz, J.; García-Cánovas, F.; Smith, A. T.; Arnao, M. B. y Acosta, M. (1995). *Eur. J. Biochem.* **234**, 506.
- Horie, K.; Ando, H. y Mita, I. (1987). *Macromolecules* **20**, 54.
- Horigome, T.; Kasai, H. y Okuyama, T. (1974). *J. Biochem.* **75**, 299.
- Hornby, W. E.; Inman, D. J. y McDonald, A. (1972). *FEBS Lett.* **23**, 114.
- Hornby, W. E.; Lilly, M. D. y Crook, E. M. (1966). *Biochem. J.* **98**, 420.
- Hornby, W. E.; Lilly, M. D. y Crook, E. M. (1968). *Biochem. J.* **107**, 669.
- Howell, R. M. y Dupe, R. J. (1971). *Biochem. J.* **123**, 11.
- Hsiao, H-Y. y Royer, G. P. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 379.
- Huber, R. E.; Gupta, M. N. y Khare, S. K. (1994). *Int. J. Biochem.* **26**, 309.
- Husain, S. y Jafri, F. (1995). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**, 669.
- Husain, S.; Jafri, F. y Saleemuddin, M. (1996). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40**, 1.
- Ichimura, K.; Ito, M.; Yamana, M. y Ito, H. (1988). Patente US4777114.
- Ichimura, K.; Tochisawa, T. y Yamazawa, Y. (1986). Patente JP61184534.
- Ichimura, K. y Watanabe, S. (1979a). Patente JP54114593.
- Ichimura, K. y Watanabe, S. (1979b). Patente JP54114594.
- Ikeda, S. y Fukui, S. (1974). *Eur. J. Biochem.* **46**, 553.

- Imazu, H.; Hirose, I.; Hioki, M.; Yoshimura, M. y Matsui, M. (1994). Patente JP6332170.
- Inada, Y.; Hirose, S.; Okada, M. y Mihama, H. (1975). *Enzyme* **20**, 188.
- Inman, D. J. y Hornby, W. E. (1972). *Biochem. J.* **129**, 255.
- Inman, D. J. y Hornby, W. E. (1974). *Biochem. J.* **137**, 25.
- Jandel Scientific. "Sigma Plot 4.01 for Windows™". (Jandel Scientific, Ed.). Jandel Scientific: Corte Madera, 1997.
- Jaromir, K. (1964). Patente US3157503.
- Jayakumari, V. G. y Rajasekharan-Pillai, V. N. (1991). *J. Appl. Polym. Sci.* **42**, 583.
- Johansson, A.; Lundberg, J.; Mattiasson, B. y Mosbach, K. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **304**, 217.
- Johnson, M. L. (1992). *Anal. Biochem.* **206**, 215.
- Jost, R.; Miron, T. y Wilchek, M. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* **362**, 75.
- Julliard, J. H.; Godinot, C. y Gautheron, D. C. (1971). *FEBS Lett.* **14**, 185.
- Kalle & Co. AG. (1931). Patente US1803906.
- Kalle & Co. AG. (1939). Patente DE718321.
- Kalle & Co. AG. (1940). Patente US2216137.
- Katchalski, E. y Bar-Eli, A. (1960a). Patente GB916931.
- Katchalski, E. y Bar-Eli, A. (1960b). *Nature* **188**, 856.
- Kay, G.; Lilly, M. D.; Sharp, A. K. y Wilson, R. J. H. (1968). *Nature* **217**, 641.
- Khare, S. K. y Gupta, M. N. (1990). *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 94.
- Kinoshita, S.; Tanaka, M. y Nakamura, N. (1966). Patente 66-13785.
- Kirimura, J. y Yoshida, J. (1964). Patente 64-27492.
- Klibanov, A. M.; Tu, T-M. y Scott, K. P. (1983). *Science* **221**, 259.
- Klint, D.; Blum, Z. y Eriksson, H. (1995). *Stud. Surf. Sci. Catal.* **98**, 225.
- Knorre, D. G.; Melamed, N. V.; Starostina, V. K. y Shubina, T. N. (1973). *Biochemistry* **38**, 101.
- Koibuchi, S.; Isobe, A.; Makino, D.; Iwayanagi, T.; Hashimoto, M. y Nonogaki, S. (1985). *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **539**, 182.

- Koshimura, K.; Tanate, T.; Sato, H.; Ooshima, N. y Nishioka, T. (1994). Patente JP6208225.
- Krawczyk, V. y Krawczynski, T. (1998). *Chem. Anal. (Warsaw)* **43**, 135.
- Lawrence, R. L. y Okay, V. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 217.
- Leekley, R. M. y Sorensen, R. L. (1956). Patente DE954127.
- Lei, C. y Deng, J. (1996). *Anal. Chem.* **68**, 3344.
- Lencki, R. W.; Arul, J. y Neufeld, R. J. (1992). *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1421.
- Leubner, G. W. y Unruh, C. C. (1966). Patente US3257664.
- Leubner, G. W.; Williams, J. L. R. y Unruh, C. C. (1957). Patente US2811510.
- Leuschner, F. (1964). Patente GB953414.
- Leuschner, F. (1966). Patente 1227855.
- Levin, Y.; Pecht, M.; Goldstein, L. y Katchalski, E. (1964). *Biochemistry* **3**, 1905.
- Li, Y. y Townshend, A. (1998). *Anal. Chim. Acta* **359**, 149.
- Liberatore, F. A.; Mclsaac, J. E., Jr. y Royer, G. P. (1976). *FEBS Lett.* **68**, 45.
- Lilly, M. D. y Dunnill, P. (1976). *Methods Enzymol.* **44**, 717.
- Liu, Y.; Liu, H.; Qian, J.; Deng, J. y Yu, T. (1995). *Anal. Chim. Acta* **316**, 65.
- López, P. y Burgos, J. (1995). *J. Food Sci.* **60**, 451.
- Lowe, C. R. y Dean, P. D. G. (1971). *FEBS Lett.* **14**, 313.
- Lowey, S.; Goldstein, L.; Cohen, C. y Luck, S. M. (1967). *J. Mol. Biol.* **23**, 287.
- Maeda, H. (1975). *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 1571.
- Maeda, H.; Suzuki, H. y Yamauchi, A. (1973a). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 607.
- Maeda, H.; Suzuki, H.; Yamauchi, A. y Sakimae, A. (1974). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1517.
- Maeda, H.; Suzuki, H.; Yamauchi, A. y Sakimae, A. (1975). *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 119.
- Maeda, H.; Yamauchi, A. y Suzuki, H. (1973b). *Biochim. Biophys. Acta* **315**, 18.
- Mahoney, R. R. (1980). *J. Food Biochem.* **4**, 189.
- Mahoney, R. R. y Adamchuk, C. (1980). *J. Food Sci.* **45**, 962.
- Mahoney, R. R. y Whitaker, J. R. (1978). *J. Food Sci.* **43**, 584.

- Makkar, H. P. S. (1982). *J. Biosci.* **4**, 153.
- Mandels, M.; Kostick, J. y Parizek, R. (1971). *J. Polymer Sci., part C* **36**, 445.
- Manjón, A.; Llorca, F. I.; Bonete, M. J.; Bastida, J. y Iborra, J. L. (1985). *Process Biochem.* **20**, 17.
- Marquardt, D. (1963). *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431.
- Marshall, D. L. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 447.
- Marshall, D. L. y Walter, J. L. (1972). *Carbohydrate Res.* **25**, 489.
- Mason, R. D. y Weetall, H. H. (1972). *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 637.
- Mateos, F.; Moliner, J. F. y Oliva, J. (1980). *Anales de Física* (Universidad de Alicante) **76**, 175.
- Mattiasson, B. y Mosbach, K. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 253.
- Mermelstein, N. H. (1975). *Food Technol.* **29**, 20.
- Meunier, B.; Rodríguez-López, J. N.; Smith, A. T.; Thorneley, R. N. F. y Rich, P. R. (1995). *Biochemistry* **34**, 14687.
- Miland, E.; Smyth, M. R. y Fagain, C. O. (1996). *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 242.
- Minsk, L. M.; Smith, J. G.; Van Deusen, W. P. y Wright, J. F. (1959). *J. Appl. Polym. Sci.* **2**, 302.
- Minsk, L. M. y Van Deusen, W. P. (1948). Patente US2690966.
- Mitz, M. A. (1956). *Science* **123**, 1076.
- Mitz, M. A. y Summaria, L. J. (1961). *Nature* **189**, 576.
- Moliner Mallén, J. F. (1986). Tesis Doctoral "Fotopolímeros entrecruzables. Cinamatos de hidratos de carbono". Universidad de Murcia.
- Montesinos Tormo, M. P. (1996). Tesis de Licenciatura "Resinas entrecruzables. Sensibilidad de nuevos monómeros derivados de 2-ulosas". Universidad de Murcia.
- Mori, T.; Sato, T.; Matuo, Y.; Tosa, T. y Chibata, I. (1972b). *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 663.
- Mori, T.; Sato, T.; Tosa, T. y Chibata, I. (1972a). *Enzymologia* **43**, 213.
- Mori, T.; Tosa, T. y Chibata, I. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **321**, 653.
- Mori, T.; Watanabe, T.; Tosa, T. y Chibata, I. (1977). "Abstract of Annual Meeting of the Agricultural Chemical Society of Japan", p. 296.

- Mosbach, K. y Larsson, P. O. (1970). *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 19.
- Mumtaz, S. y Bachhawat, B. K. (1992). *Biochim. Biophys. Acta.* **1117**, 174.
- Nakamoto, S. y Machida, N. (1992). *Water Res.* **26**, 49.
- Nakayama, N. (1992). Patente JP4110093.
- Narasaiah, D. (1994). *Biosens. Bioelectron.* **9**, 415.
- Narayanan, V. y Scranton, A. B. (1997). *Trends Polym. Sci.* **5**, 415.
- Nelson, J. M. y Griffin, E. G. (1916). *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 1109.
- Ngo, T. T.; Narinesingh, D. y Laidler, K. J. (1976). *Biotechnol. Bioeng.* **18**, 119.
- Nonogaki, S.; Hashimoto, M.; Iwayanagi, T. y Shiraishi, H. (1985). *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **539**, 189.
- Omenn, G. S.; Ontjes, D. A. y Anfinsen, C. B. (1970a). *Nature* **225**, 189.
- Omenn, G. S.; Ontjes, D. A. y Anfinsen, C. B. (1970b). *Biochemistry* **9**, 313.
- Onda, M.; Lvov, Y.; Ariga, K. y Kunitake, T. (1996). *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 163.
- O'Neill, S. P.; Dunnill, P. y Lilly, M. D. (1971). *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 337.
- Ong, E. B.; Tsang, Y. y Perlmann, G. E. (1966). *J. Biol. Chem.* **241**, 5661.
- Osheroff, P. L. y Guillory, R. J. (1972). *Biochem. J.* **127**, 419.
- Ostergaard, J. C. W. y Martiny, S. C. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 561.
- Otawa, S. (1995). *Kobunshi* **44**, 225.
- Ozawa, H. (1967a). Patente 67-8910.
- Ozawa, H. (1967b). *J. Biochem.* **62**, 531.
- Parr, S. R. y Frost, G. M. (1983). Patente EP74237.
- Pastore, M. y Morisi, F. (1976). *Methods Enzymol.* **44**, 822.
- Patchornik, A. (1965). Patente US3278392.
- Patel, A. B.; Pennington, S. N. y Brown, H. D. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* **178**, 626.
- Patel, A. B.; Stasiw, R. O.; Brown, H. D. y Gniron, C. A. (1972). *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 1031.
- Pegg, R. K. y Saunders, M. S. (1995). Patente US5436147.

- Pennington, S. N.; Brown, H. D.; Patel, A. B. y Knowles, C. O. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 479.
- Peralta-Zamora, P. G. (1998). Patente BR9604172.
- Pitcher, W. H., Jr.; Ford, J. R. y Weetall, H. H. (1976). *Methods Enzymol.* **44**, 792.
- Phelps, C.; Antonini, E. y Brunori, M. (1971). *Biochem. J.* **122**, 79.
- Plambeck, L., Jr. (1956). Patente US2760863.
- Poonian, M. S.; Schlabach, A. J. y Weissbach, A. (1971). *Biochemistry* **10**, 424.
- Ranby, B. (1998). *Polym. Eng. Sci.* **38**, 1229.
- Regan, D. L.; Dunnill, P. y Lilly, M. D. (1974). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 333.
- Reiser, A. (1980). *J. Chim. Phys.* **77**, 469.
- Reiser, A. (1989). "Photoreactive Polymers: The Science and Technology of Resists", John Wiley & Sons.
- Reiser, A.; Bowes, G. y Horne, R. J. (1966b). *Trans. Faraday Soc.* **62**, 3162.
- Reiser, A. y Leyshon, L. J. (1971). *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4051.
- Reiser, A. y Marley, R. (1968). *Trans. Faraday Soc.* **64**, 1806.
- Reiser, A.; Terry, G. C. y Willets, F. W. (1966a). *Nature* **211**, 410.
- Rimon, A.; Alexander, B. y Katchalski, E. (1966). *Biochemistry* **5**, 792.
- Rimon, A.; Gutman, M. y Rimon, S. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 301.
- Robertson, E. M.; Van Deusen, W. P. y Minsk, L. M. (1959). *J. Appl. Polym. Sci.* **2**, 308.
- Rodríguez-López, J. N.; Gilabert, M. A.; Tudela, J.; Thorneley, R. N. F. y García-Cánovas, F. (2000). *Biochemistry* **39**, 13201.
- Rodríguez-López, J. N.; Hernández-Ruíz, J.; García-Cánovas, F.; Thorneley, R. N. F.; Acosta, M. y Arnao, M. B. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 5469.
- Rony, P. R. (1971). *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 431.
- Roper, J. C.; Sarkar, J. M.; Dec, J. y Bollag, J-M. (1995). *Water Res.* **29**, 2720.
- Royer, G. P. y Andrews, J. P. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 1807.
- Rusu, E.; Comanita, E.; Airinei, A. y Rusu, G. (1998). *Iran. Polym. J.* **7**, 157.

- Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emnéus, J.; Gorton, L. y Marko-Varga, G. (1996). *Anal. Chim. Acta* **330**, 123.
- Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J. y Marko-Varga, G. (1995). *J. Electroanal. Chem.* **391**, 41.
- Samejima, H. y Kimura, K. (1974). *Enzyme Engineering* **2**, 131.
- Sato, T.; Mori, T.; Tosa, T. y Chibata, I. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 788.
- Schacht, E.; Nobels, M.; Vansteenkiste, S.; Demeester, J.; Franssen, J. y Lemahieu, A. (1993a). *Polym. Gels Networks* **1**, 213.
- Schacht, E.; Vandichel, J. C.; Lemahieu, A.; De Rooze, N. y Vansteenkiste, S. (1993b). "Encapsulation and Controlled Release", Royal Society of Chemistry.
- Schejter, A. y Bar-Eli, A. (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* **136**, 325.
- Schreiner, H. R. (1966). Patente 3282702.
- Schwabe, C. (1969). *Biochemistry* **8**, 795.
- Seki, T.; Jenssen, T. A.; Levin, Y. y Erdös, E. G. (1970). *Nature* **225**, 864.
- Sharp, A. K.; Kay, G. y Lilly, M. D. (1969). *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 363.
- Shekhovtsova, T. N.; Chernetskaya, S. V.; Belkova, N. V. y Dolmanova, I. F. (1995). *J. Anal. Chem.* **50**, 489.
- Shipe, W. F.; Senyk, G. y Weetall, H. H. (1972). *J. Dairy Sci.* **55**, 647.
- Shubhada, S. y Sundaram, P. V. (1993). *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 881.
- Silman, I. H.; Albu-Weissenberg, M. y Katchalski, E. (1966). *Biopolymers* **4**, 441.
- Smith, J. C.; Stratford, I. J.; Hutchinson, D. W. y Brentnall, H. J. (1973). *FEBS Lett.* **30**, 246.
- Solomon, B. y Levin, Y. (1974). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1161.
- Sosnitza, P.; Farooqui, M.; Saleemuddin, M.; Ulber, R. y Scheper, T. (1998). *Anal. Chim. Acta* **368**, 197.
- Sprossler, B. y Lingens, F. (1970). *FEBS Lett.* **6**, 232.
- Srere, P. A. y Mosbach, K. (1974). *Annu. Rev. Microbiol.* **28**, 61.
- Stanley, W. L.; Watters, G. G.; Chan, B. G. y Mercer, J. M. (1975). *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 315.

- Starkenstein, E. (1910). *Biochem. Z.* **24**, 210.
- Stasiw, R. O.; Patel, A. B. y Brown, H. D. (1972). *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 629.
- Steger, L. D. y Desnick, R. J. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* **464**, 530.
- Stenn, K. S. y Blout, E. R. (1972). *Biochemistry* **11**, 4502.
- Stewart, K. K. y Doherty, R. F. (1971). *FEBS Lett.* **16**, 226.
- Stone, I. (1955). Patente US2717852.
- Stowell, C. P. y Lee, Y. C. (1980). *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **37**, 225.
- Strandberg, G. W. y Smiley, K. L. (1972). *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 509.
- Sturgeon, C. M. (1988). "Carbohydrate Chemistry", Oxford University Press.
- Sumner, J. B. (1948). *Science* **108**, 410.
- Sundberg, L. y Kristiansen, T. (1972). *FEBS Lett.* **22**, 175.
- Sutherland, G. R. J. y Aust, S. D. (1996). *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 128.
- Svensson, B. (1973). *FEBS Lett.* **29**, 167.
- Swann, W. H. (1969). *FEBS Lett. Suppl.* **2**, 539.
- Tams, J. W. y Welinder, K. G. (1998). *FEBS Lett.* **421**, 234.
- Tanaka, A. (1995). *Kobunshi* **44**, 220.
- Tatsumi, K.; Wada, S. e Ichikawa, H. (1996). *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 126.
- Thakur, M. y Pundir, C. S. (1999). *Biotechnol. Tech.* **13**, 227.
- Tischer, W. y Kasche, V. (1999). *Trends Biotechnol.* **17**, 326.
- Tischer, W. y Wedekind, F. (1999). *Top. Curr. Chem.* **200**, 95.
- Toraya, T.; Ohashi, K. y Fukui, S. (1975). *Biochemistry* **14**, 4255.
- Tosa, T.; Mori, T.; Fuse, N. y Chibata, I. (1966). *Enzymologia* **31**, 214.
- Tosa, T.; Mori, T.; Fuse, N. y Chibata, I. (1967). *Biotechnol. Bioeng.* **9**, 603.
- Tosa, T.; Mori, T.; Watanabe, T.; Fujimura, M.; Ono, M. y Chibata, I. (1977). "Abstract of Annual Meeting of the Agricultural Chemical Society of Japan", p. 296.
- Tosa, T.; Sato, T.; Mori, T.; Matuo, Y. y Chibata, I. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 69.

- Tosa, T.; Sato, T.; Sano, R.; Yamamoto, K.; Matuo, Y. y Chibata, I. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* **334**, 1.
- Toyama, T. y Sakamoto, A. (1994). Patente JP6138661.
- Traub, A.; Kaufmann, E. y Teitz, Y. (1969). *Anal. Biochem.* **28**, 469.
- Trout, T. J.; Schmiegel, J. J.; Gambogi, W. J. y Weber, A. M. (1998). *Adv. Mater.* **10**, 1219.
- Trüeb, B.; Hughes, G. J. y Winterhalter, K. H. (1982). *Anal. Biochem.* **119**, 330.
- Tsuda, M. (1964). *J. Polym. Sci.: Part A* **2**, 2907.
- Tsuji, A. (1994). Patente JP6177508.
- Turro, N. J. y Ramamurthy, V. (1977). *Mol. Photochem.* **8**, 239.
- Uemura, M. y Kuzuhara, N. (1996). Patente JP8062213.
- Unruh, C. C. y Smith, A. C., Jr. (1960). *J. Appl. Polym. Sci.* **3**, 310.
- Updike, S. J. y Hicks, G. P. (1967). *Nature* **214**, 986.
- Updike, S. J.; Wakamiya, R. T. y Lightfoot, E. N., Jr. (1976). *Science* **193**, 681.
- Uren, J. R. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* **236**, 67.
- Uy, R.; Liu, V. S. H. y Royer, G. P. (1976). *J. Solid-Phase Biochem.* **1**, 51.
- Venter, J. C.; Venter, B. R.; Dixon, J. E. y Kaplan, N. O. (1975). *Biochem. Med.* **12**, 79.
- Vijayakumar, A. R.; Csöregi, E.; Heller, A. y Gorton, L. (1996). *Anal. Chim. Acta* **327**, 223.
- Visser, J. y Strating, M. (1975). *FEBS Lett.* **57**, 183.
- Voget, C. E.; Flores, M. V.; Faloci, M. M. y Ertola, R. J. J. (1994). *Food Sci. Technol.* **27**, 324.
- Wada, S.; Ichikawa, H. y Tatsumi, K. (1993). *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 854.
- Wada, S.; Ichikawa, H. y Tatsumi, K. (1995). *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 304.
- Wadiak, D. T. y Carbonell, R. G. (1975). *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 1157.
- Walter, B. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 950.
- Watanabe, T.; Matuo, Y.; Mori, T.; Sano, R.; Tosa, T. y Chibata, I. (1977). "Abstract of Annual Meeting of the Agricultural Chemical Society of Japan", p. 295.
- Watts, (1981). "Kinetic Data Analysis: Design and Analysis of Enzyme and Pharmacokinetics Experiments" (Endrenyi, L., Ed.), Plenum Press, New York.

- Weakley, F. B. y Mehlretter, C. L. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 1189.
- Weber, A. M. y Trout, T. J. (1994). *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **15A**, 279.
- Weetall, H. H. (1969). *Nature* **223**, 959.
- Weetall, H. H. (1970a). *Biochim. Biophys. Acta* **212**, 1.
- Weetall, H. H. (1970b). *Biochem. J.* **117**, 257.
- Weetall, H. H. (1975). *Process Biochem.* **10**, 3.
- Weetall, H. H. y Baum, G. (1970). *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 339.
- Weetall, H. H. y Detar, C. C. (1974a). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1537.
- Weetall, H. H. y Detar, C. C. (1974b). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1095.
- Weetall, H. H.; Havewala, N. B.; Pitcher, W. H., Jr.; Detar, C. C.; Vann, W. P. y Yaverbaum, S. (1974a). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 295.
- Weetall, H. H.; Havewala, N. B.; Pitcher, W. H., Jr.; Detar, C. C.; Vann, W. P. y Yaverbaum, S. (1974b). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 689.
- Weetall, H. H. y Mason, R. D. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 455.
- Weetall, H. H.; Vann, W. P.; Pitcher, W. H., Jr.; Lee, D. D.; Lee, Y. Y. y Tsao, G. T. (1976). *Methods Enzymol.* **44**, 776.
- Weetall, H. H. y Weliky, N. (1966). *Anal. Biochem.* **14**, 160.
- Weibel, M. K.; Barrios, R.; Delotto, R. y Humphrey, A. E. (1975). *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 85.
- Weibel, M. K.; Dritschilo, W.; Bright, H. J. y Humphrey, A. E. (1973). *Anal. Biochem.* **52**, 402.
- Weliky, N.; Brown, F. S. y Dale, E. C. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 1.
- Welinder, K. G. (1985). *Eur. J. Biochem.* **151**, 497.
- Wendell, L. D. (1983). *Chem. Rev.* **83**, 1.
- Weng, Z.; Hendrickx, M.; Maesmans, G.; Gebruers, K. y Tobback, P. (1991). *J. Food Sci.* **56**, 574.
- Wider de Xifra, E. A.; Mendiara, S. y Batlle, A. M. del C. (1972). *FEBS Lett.* **27**, 275.
- Wierzbicki, L. E.; Edwards, V. H. y Kosikowsky, F. V. (1973). *J. Food Sci.* **38**, 1070.

- Wierzbicki, L. E.; Edwards, V. H. y Kosikowsky, F. V. (1974). *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 397.
- Williams, J. L. R. (1974). "Polyelectrolytes" (E. Sélégny, Ed.), Reidel, Dordrecht, Netherlands.
- Williams, J. L. R. y Borden, D. G. (1964). *Makromol. Chem.* **73**, 203.
- Williams, J. L. R.; Laakso, T. M. y Borden, D. G. (1971). Patente FR2058289.
- Wilson, R. J. H. y Lilly, M. D. (1969). *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 349.
- Wingard, L. B., Jr.; Liu, C. C. y Nagda, N. L. (1971). *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 629.
- Woychik, J. H. y Wondolowski, M. V. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **289**, 347.
- Wu, Y.; Taylor, K. E.; Biswas, N. y Bewtra, J. K. (1998). *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 315.
- Wykes, J. R.; Dunnill, P. y Lilly, M. D. (1971). *Nature* **230**, 187.
- Zaborsky, O. R. (1976). *Methods Enzymol.* **44**, 317.
- Zaborsky, O. R. y Ogletree, J. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **289**, 68.
- Zárate, S. y López-Leiva, M. H. (1990). *J. Food Prot.* **53**, 262.
- Zingaro, R. A. y Uziel, M. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* **213**, 371.

APÉNDICE

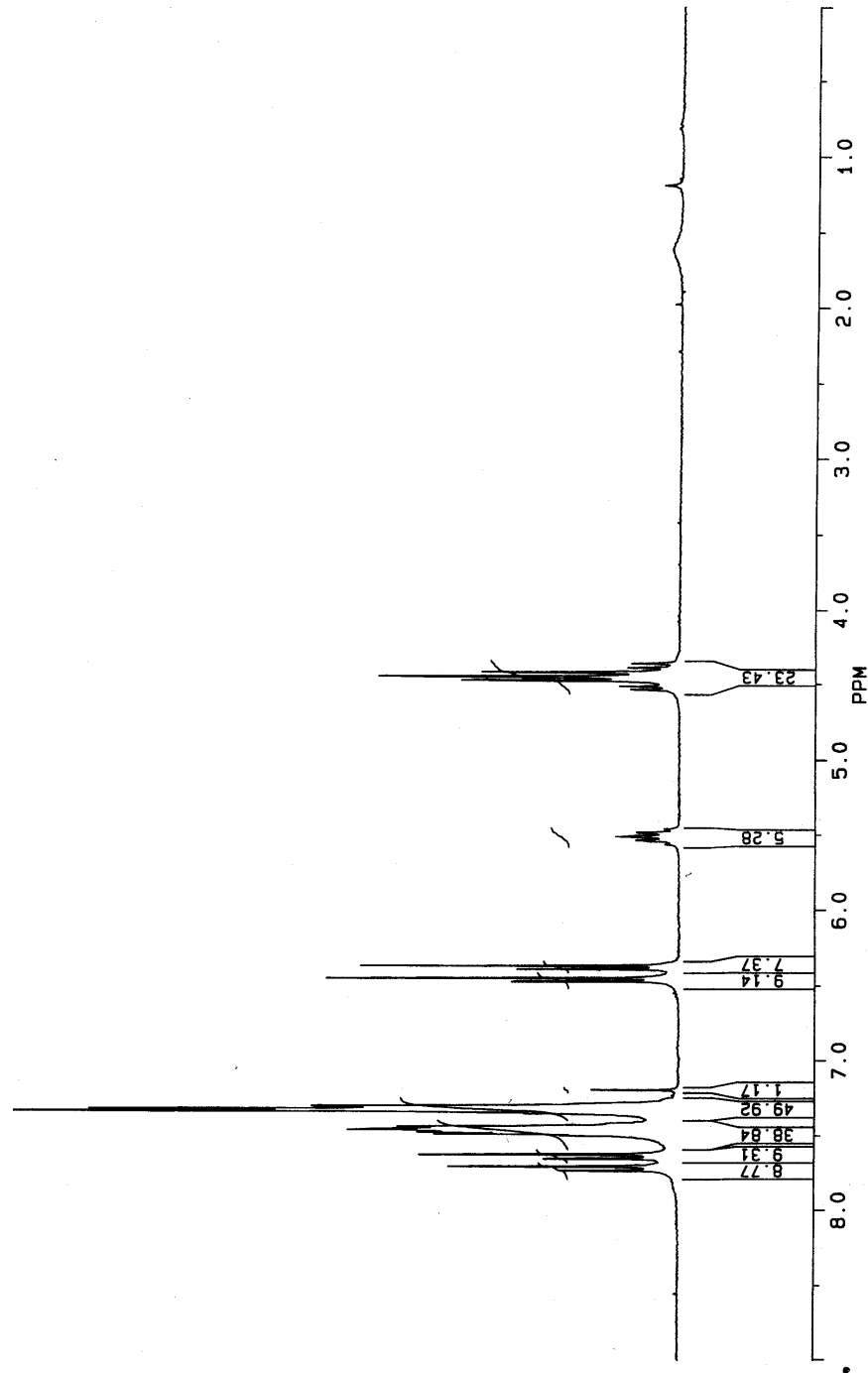


FIGURA A3.1

Espectro de ¹H r.m.n. del derivado totalmente cinnamoylado de glicerina.

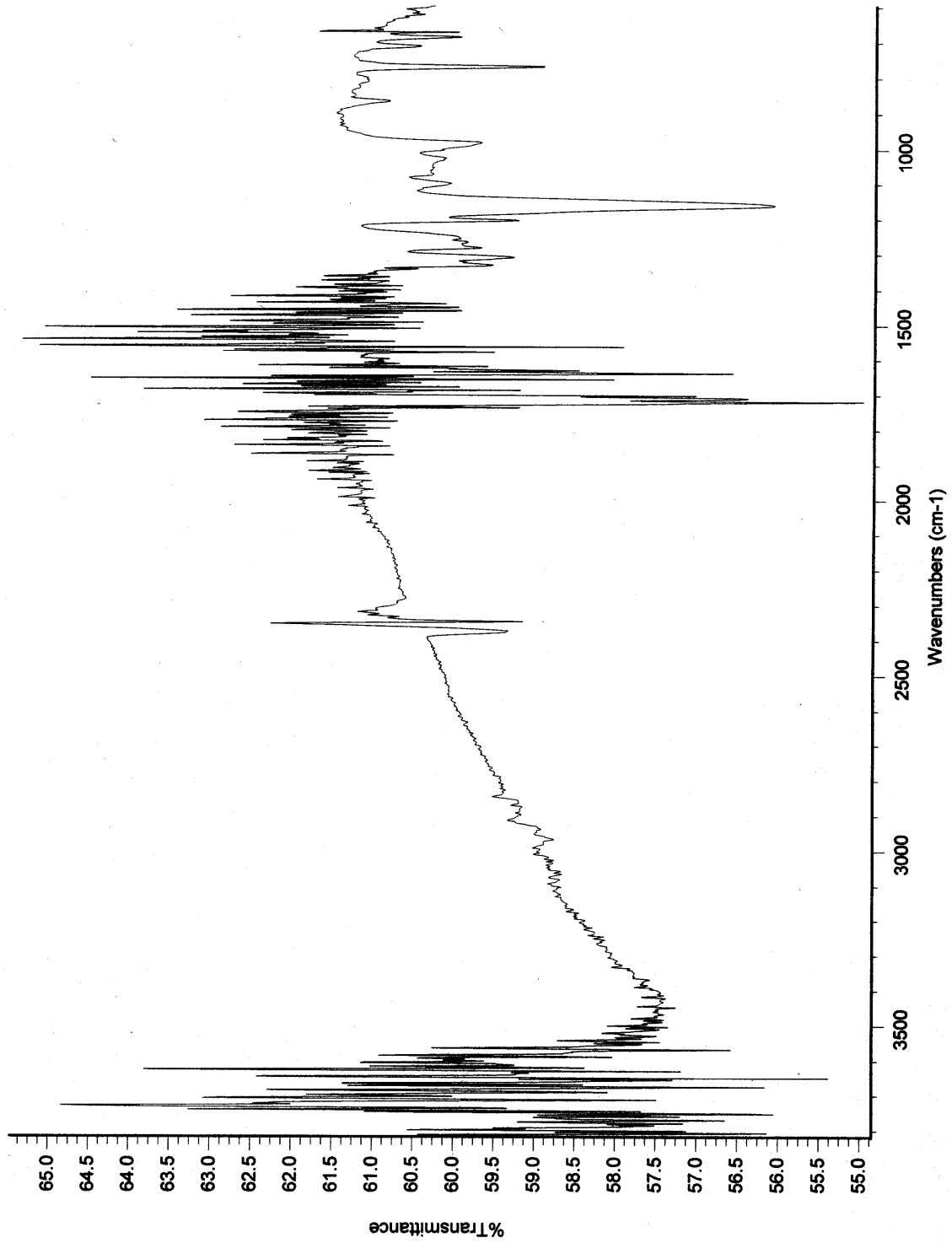


FIGURA A3.2

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoylado de glicerina.

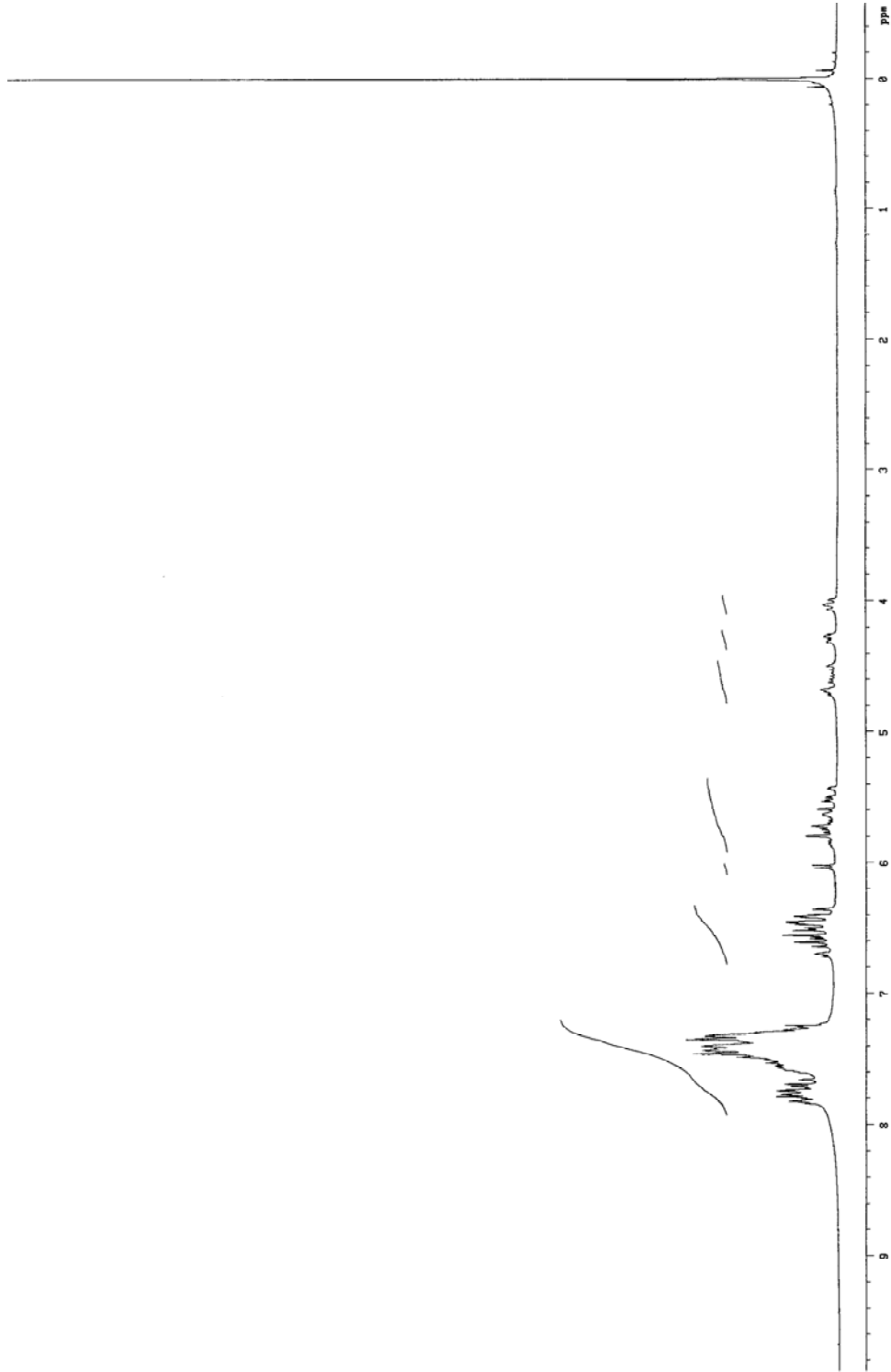


FIGURA A3.3

Espectro de ¹H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

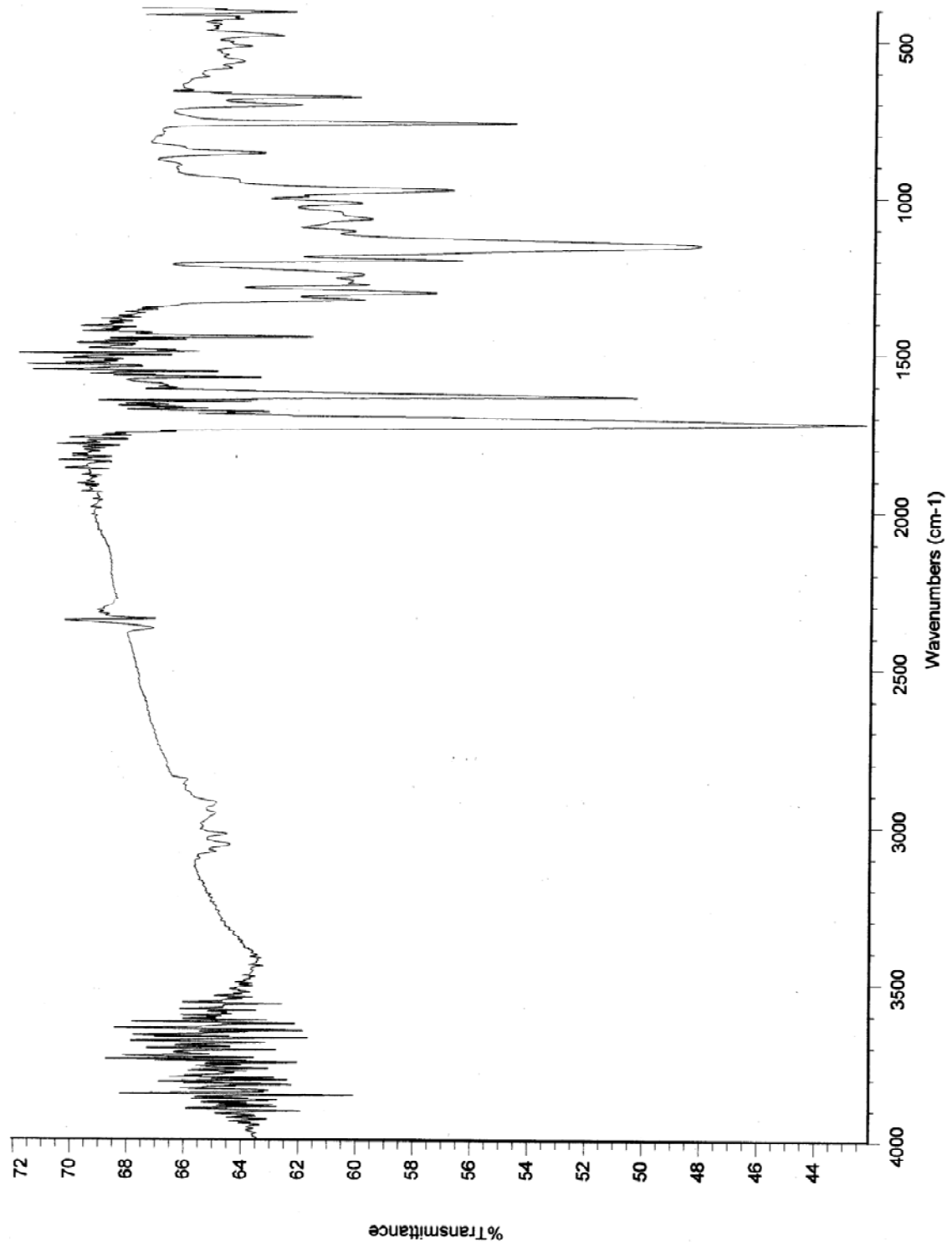


FIGURA A3.4

Espectro de ir. del derivado totalmente cinnamoylado de D-arabinosa.

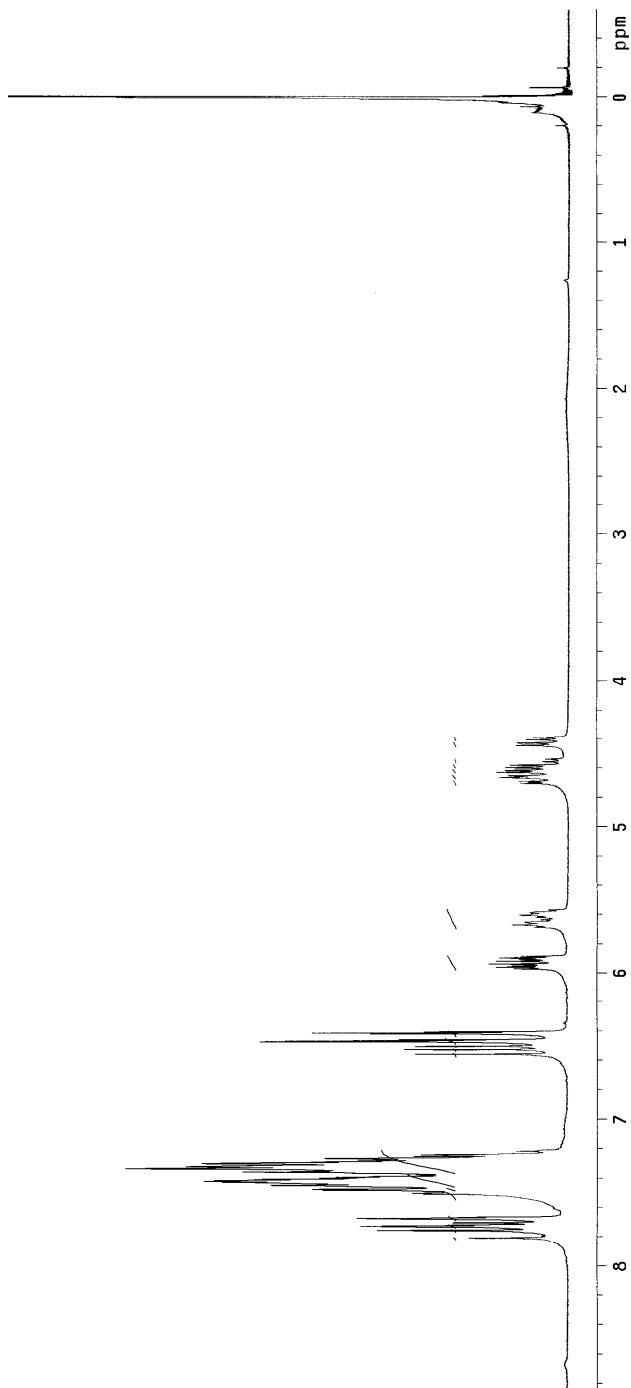


FIGURA A3.5

**Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.
Contiene ácido cinámico como referencia.**

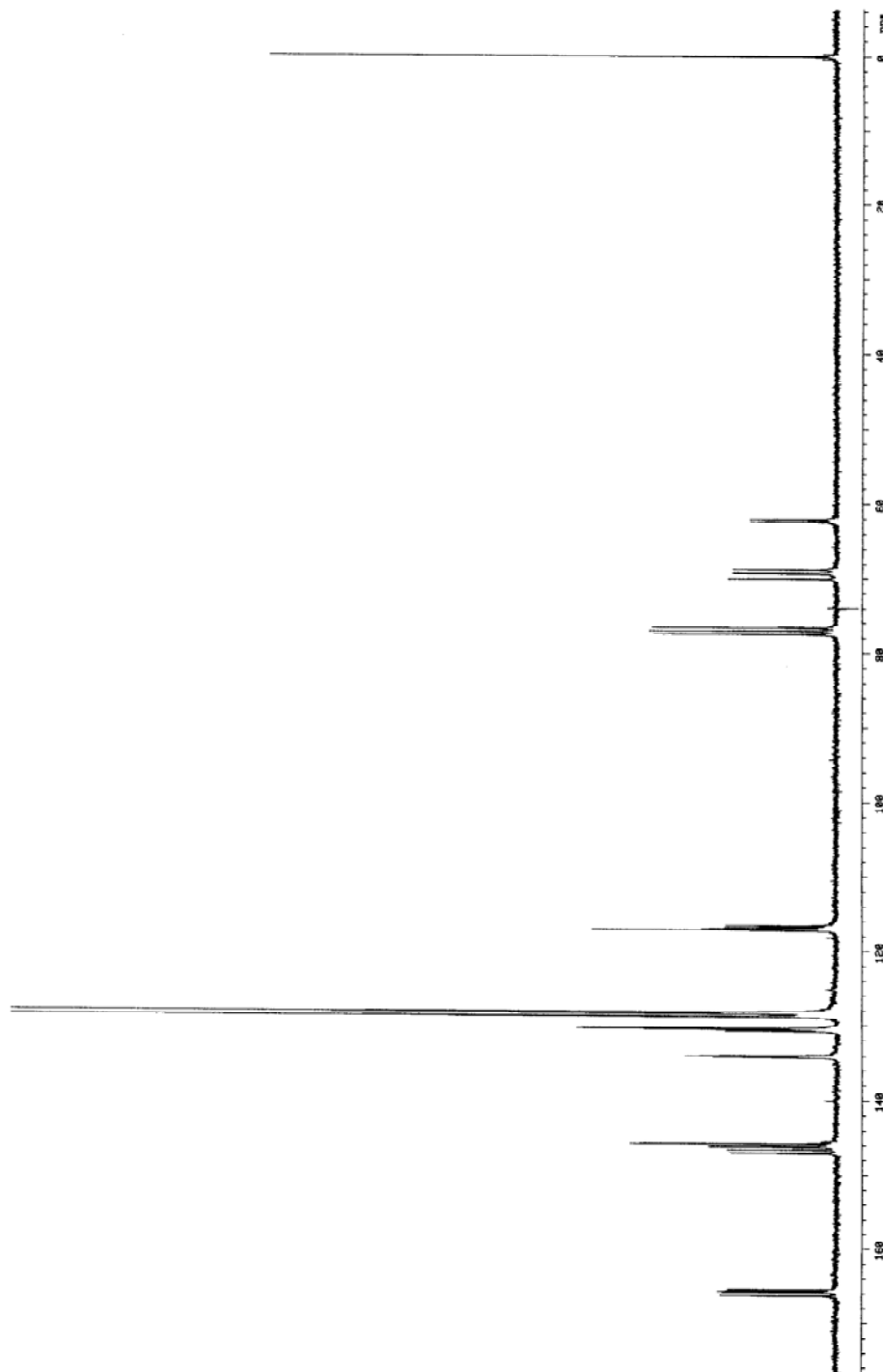


FIGURA A3.6

Espectro de ^{13}C r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.
Contiene ácido cinámico como referencia.

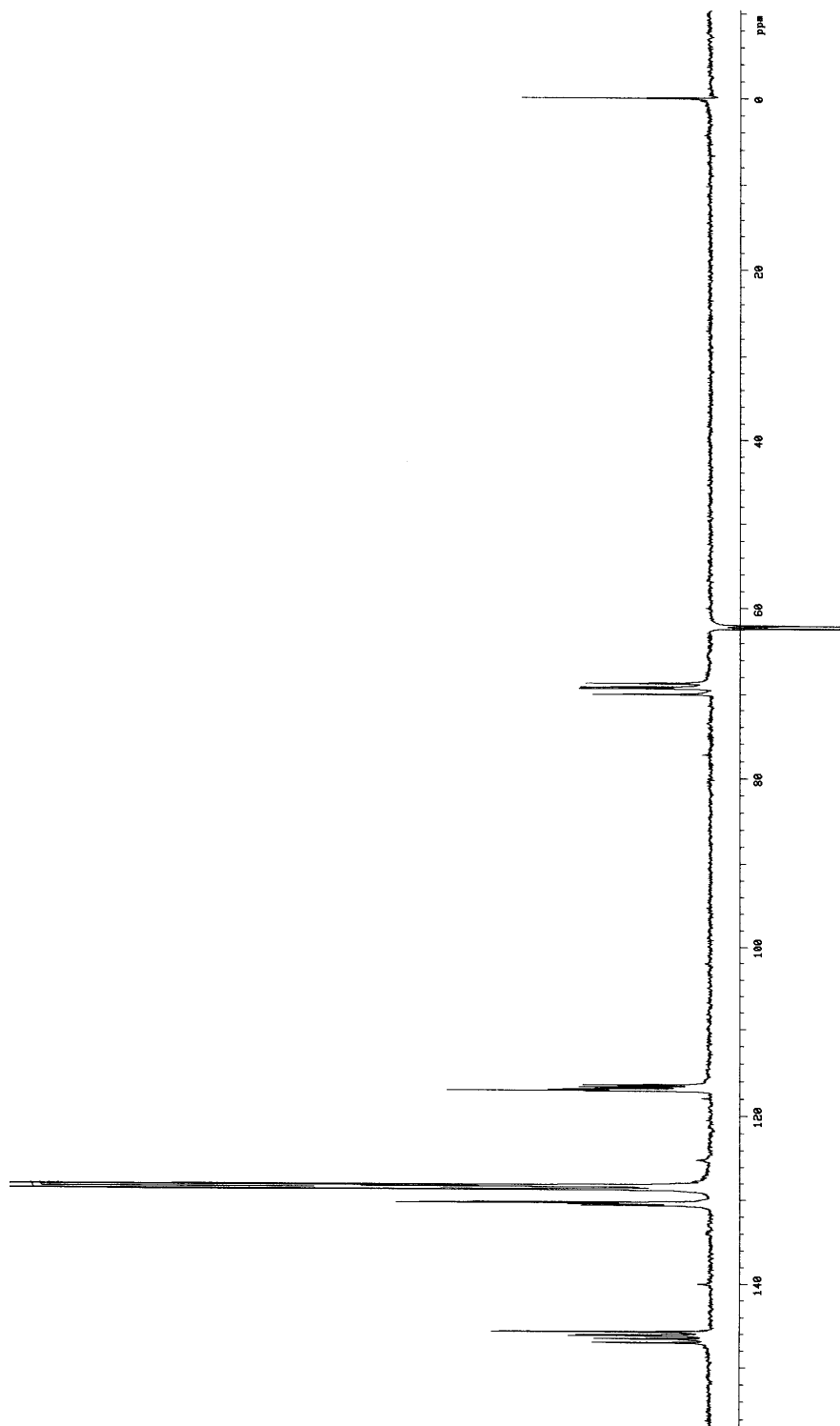


FIGURA A3.7
Espectro de ^{13}C r.m.n. ("DEPT") del derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

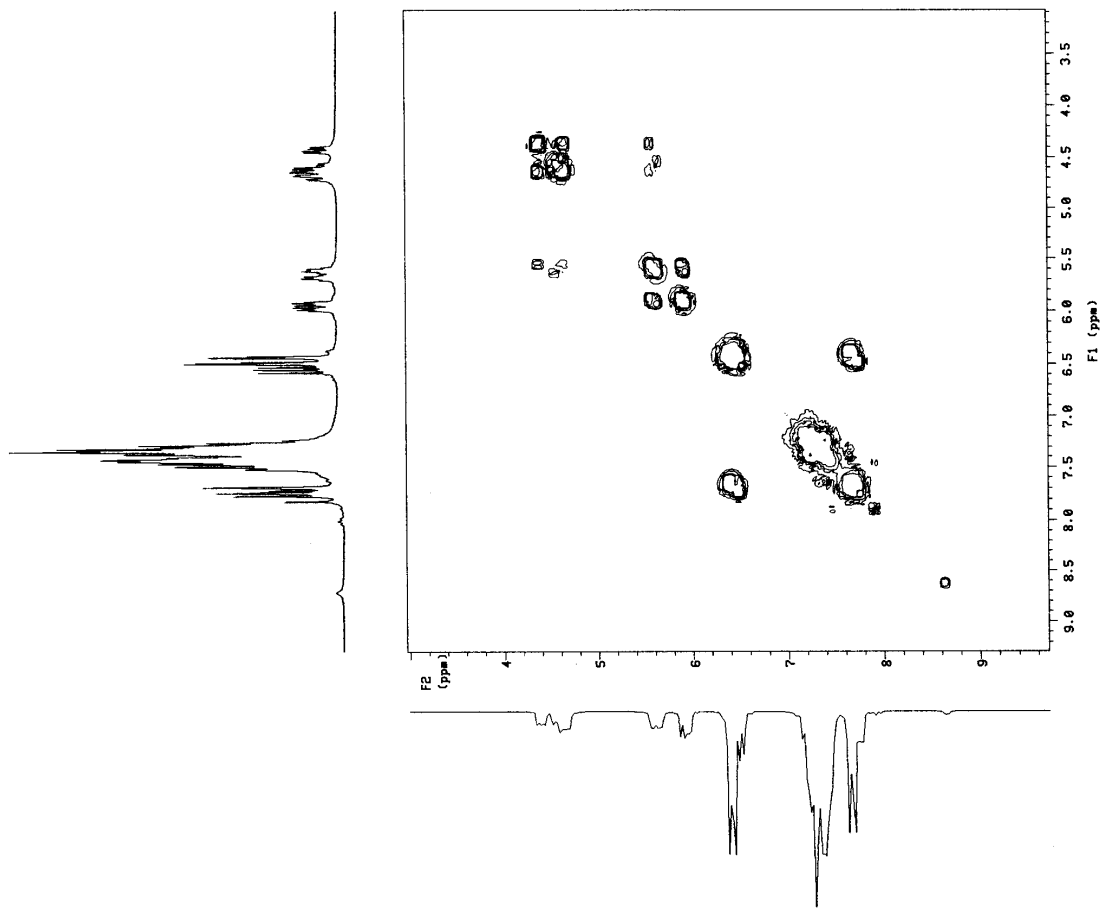


FIGURA A3.8

Espectro COSY del derivado totalmente acilado de D-sorbitol.

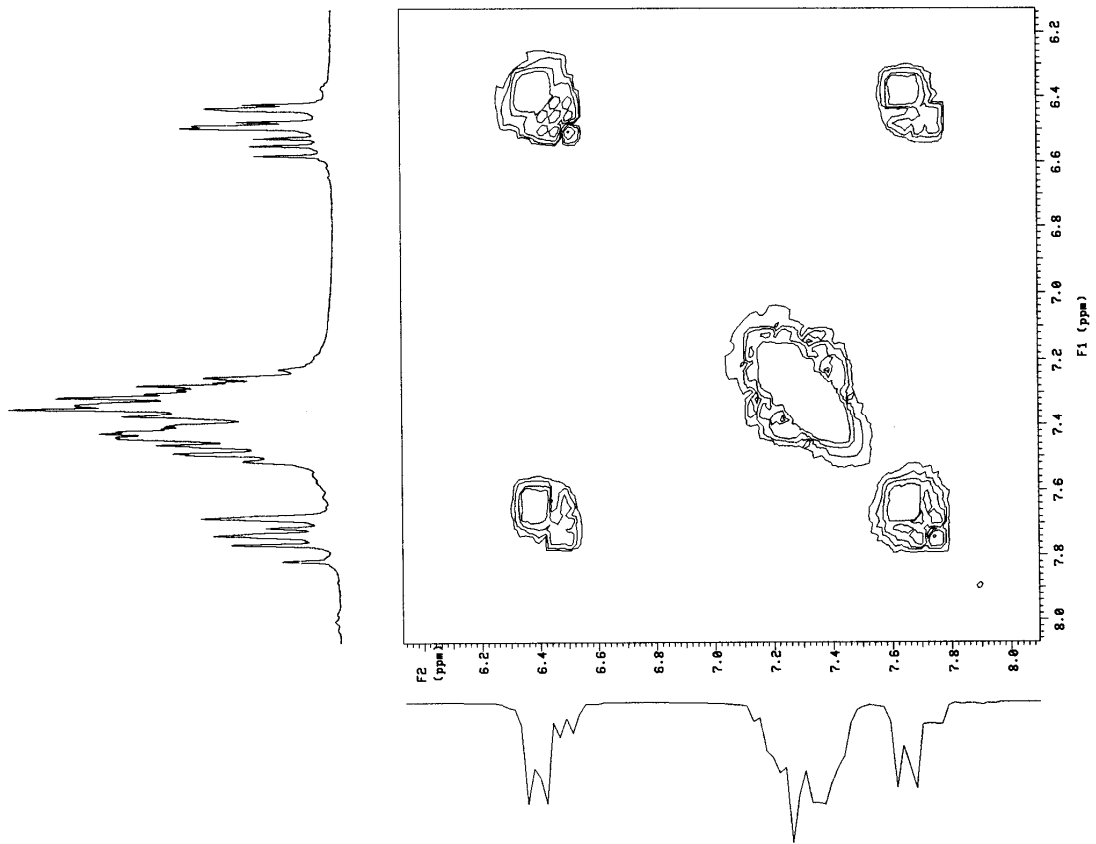


FIGURA A3.9

Espectro COSY del derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

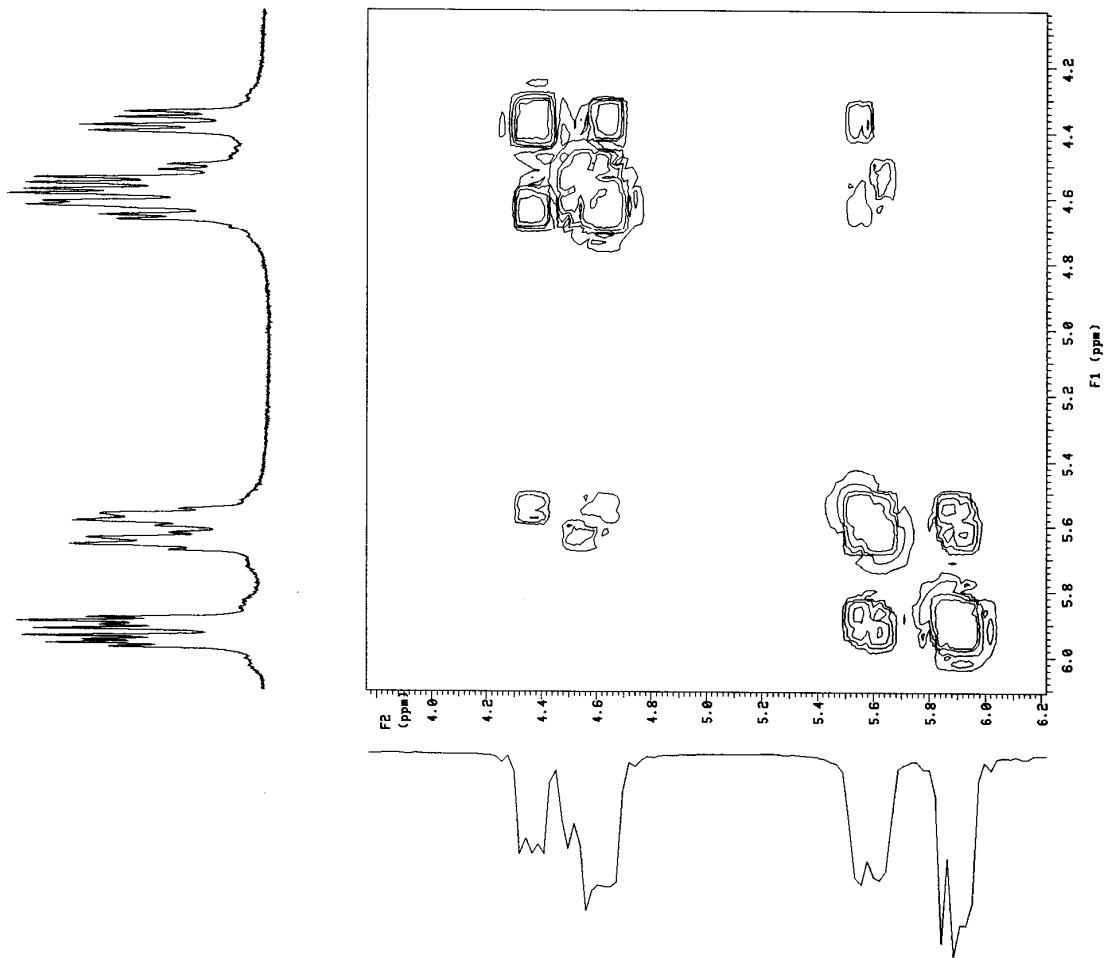


FIGURA A3.10

Espectro COSY del derivado totalmente acilado de D-sorbitol.

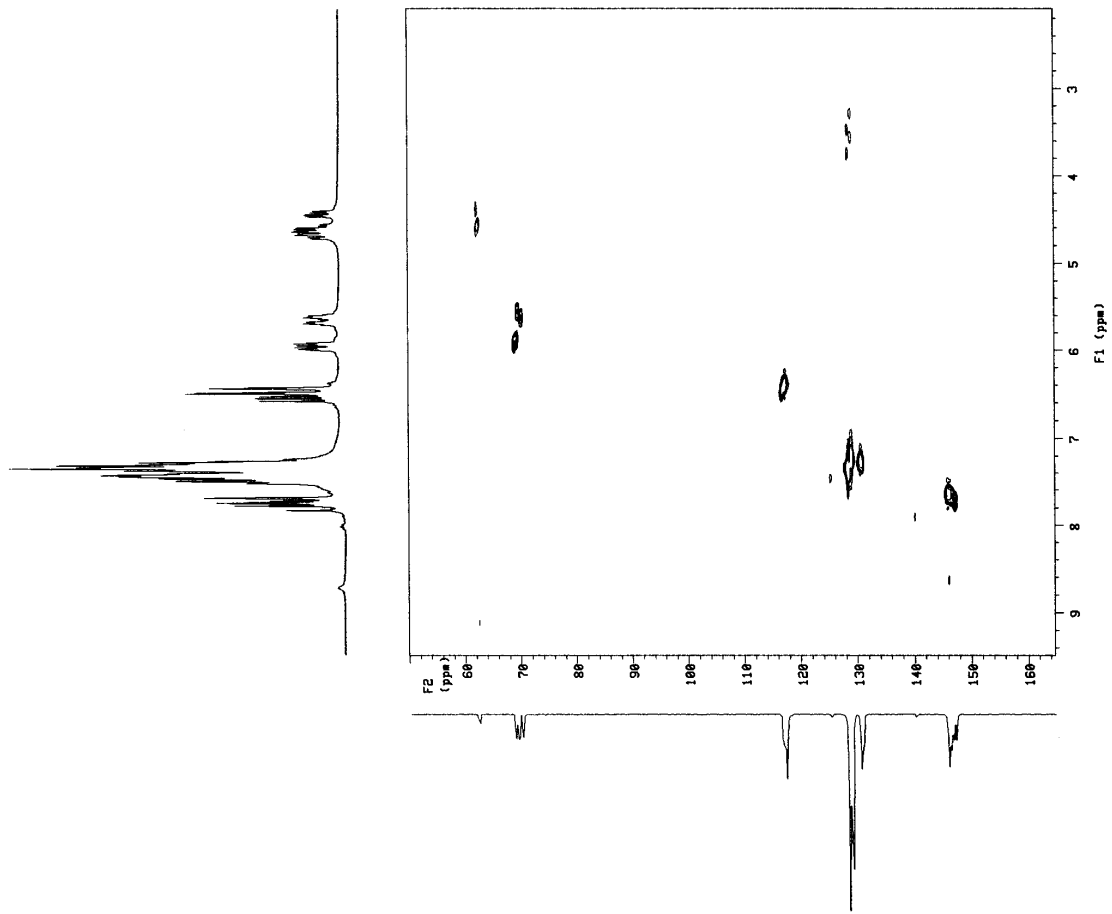


FIGURA A3.11

Correlación C/H del derivado totalmente cinamoylado de D-sorbitol.

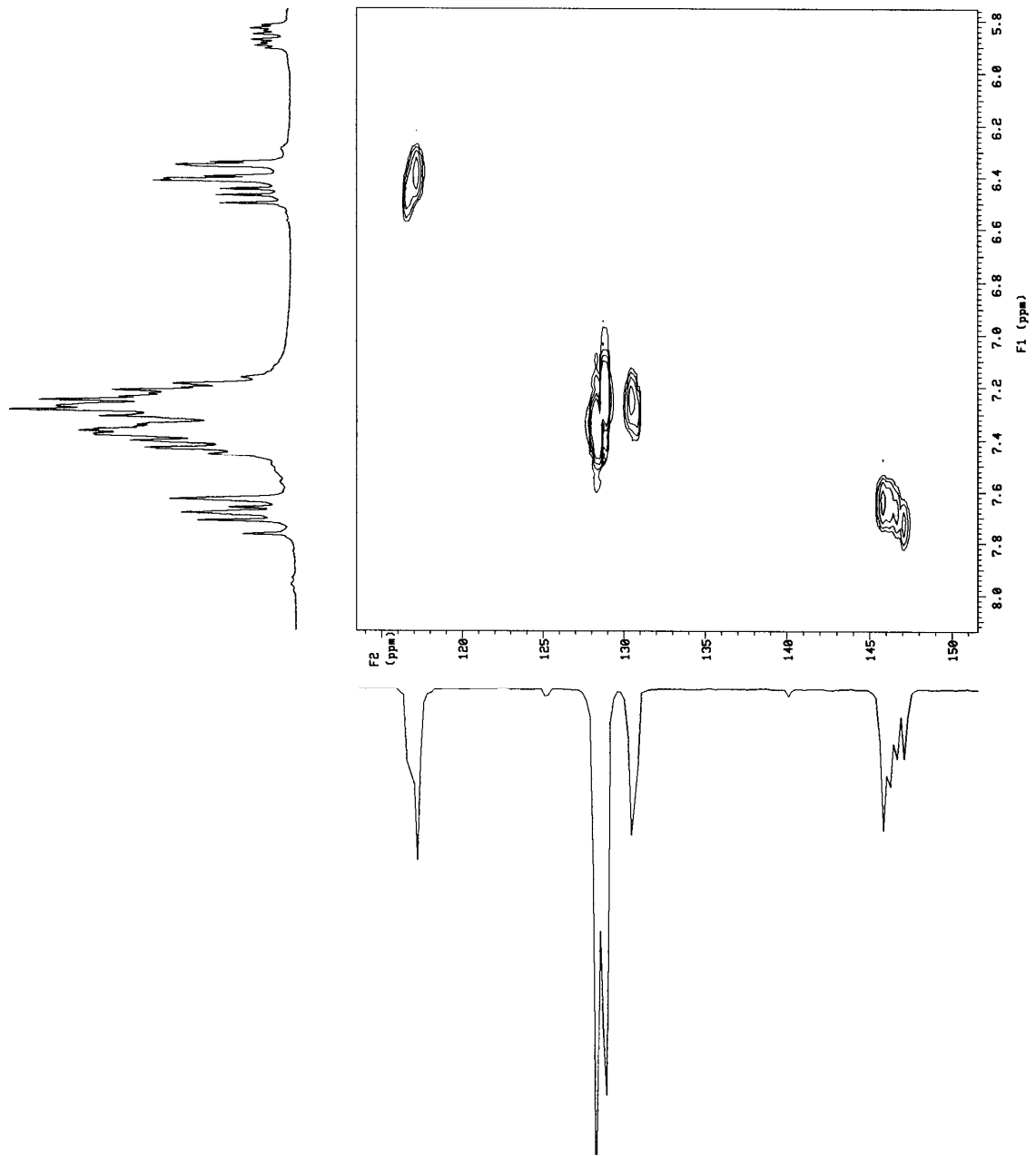


FIGURA A3.12

Correlación C/H del derivado totalmente cinnamoylado de D-sorbitol.

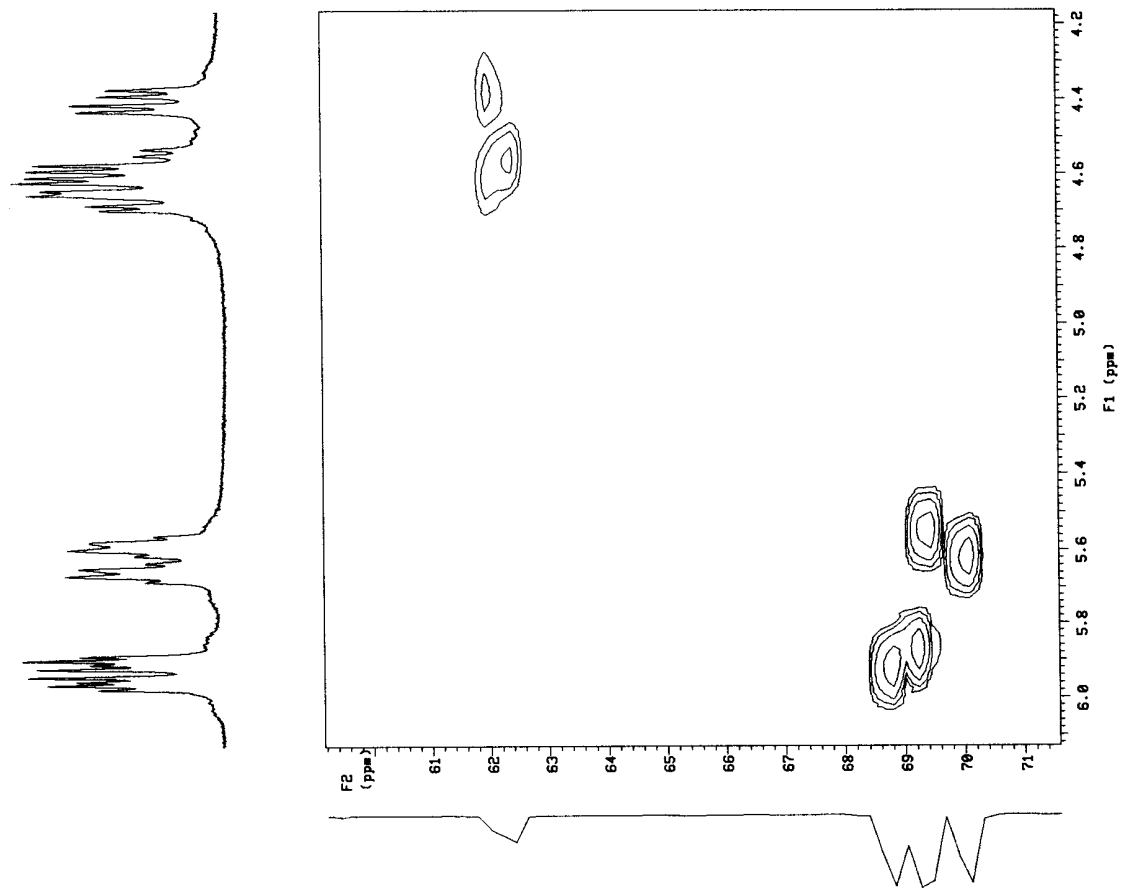


FIGURA A3.13

Correlación C/H del derivado totalmente cinamoylado de D-sorbitol.

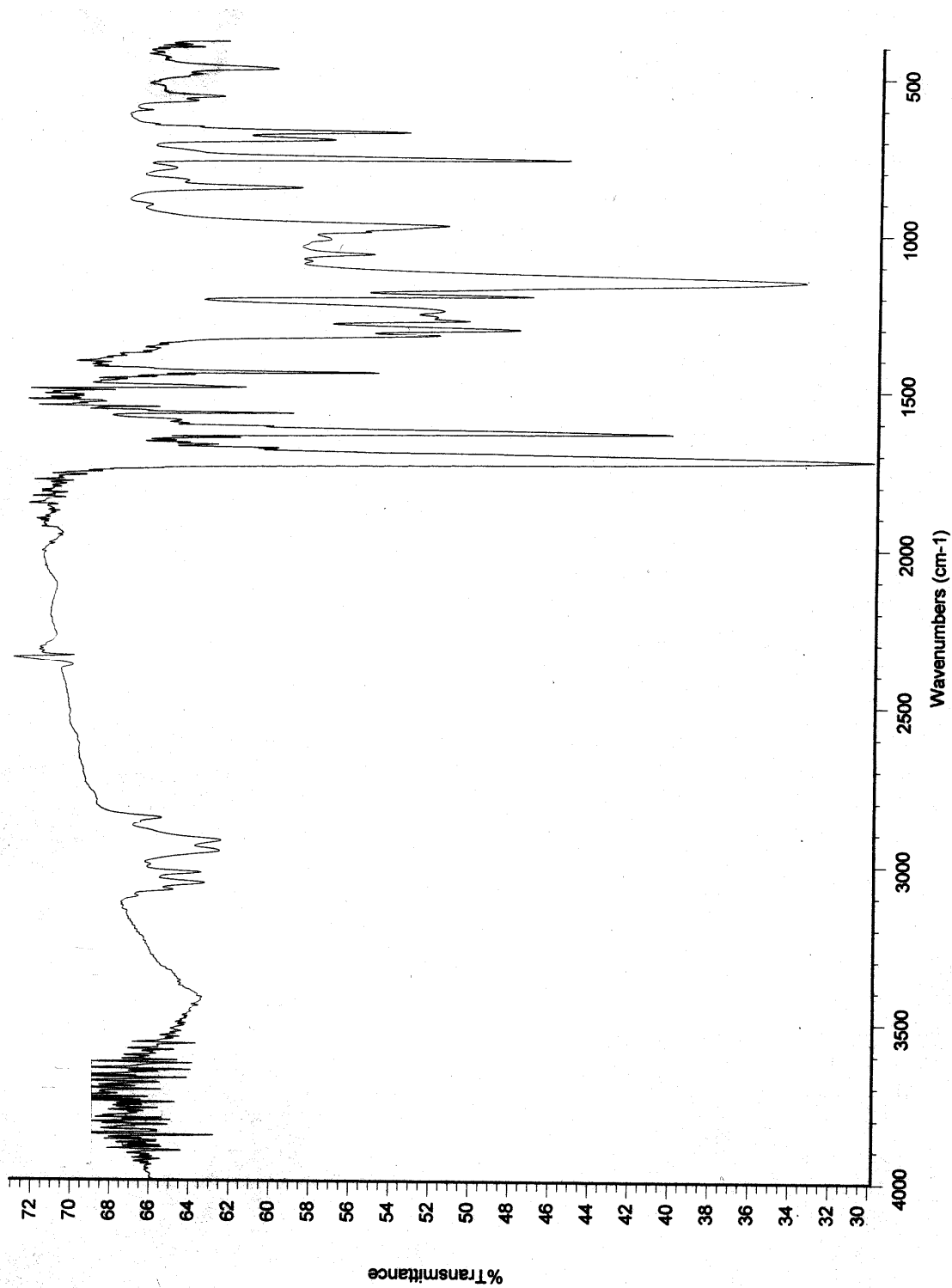


FIGURA A3.14

Espectro de ir. del derivado totalmente cinnamoilado de D-sorbitol.

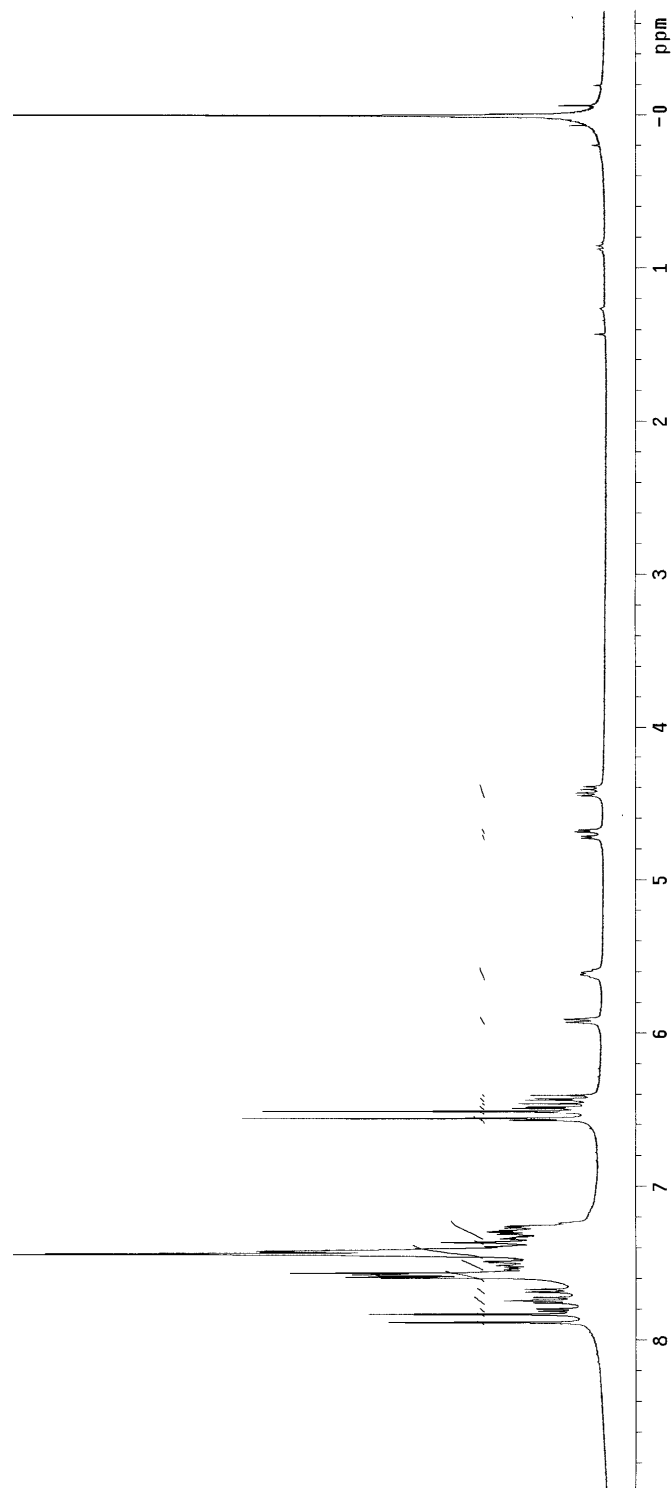


FIGURA A3.15

**Espectro de ¹H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de D-manitol.
Contiene ácido cinámico como referencia.**

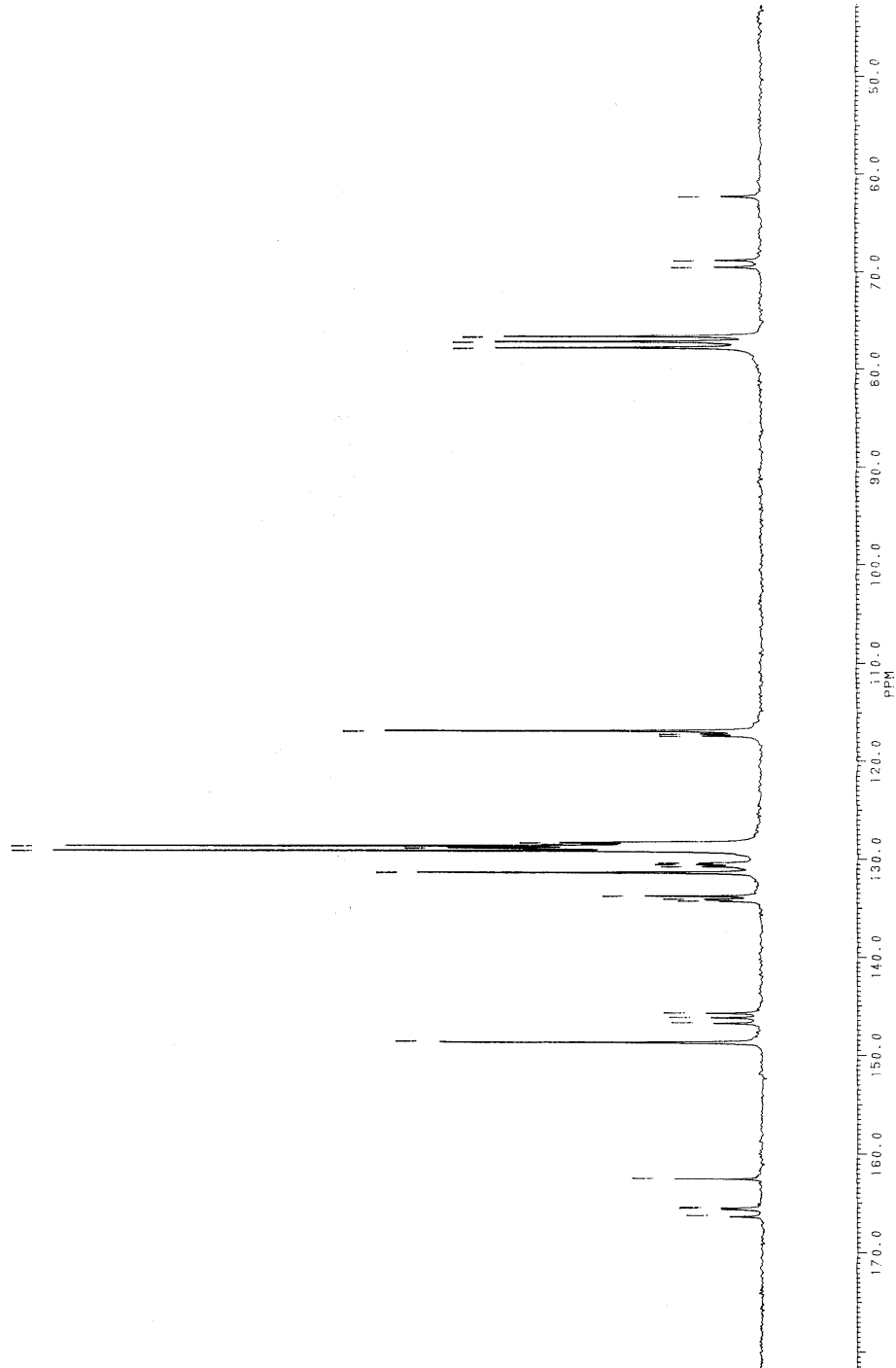


FIGURA A3.16

**Espectro de ^{13}C r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de D-manitol.
Contiene ácido cinámico como referencia.**

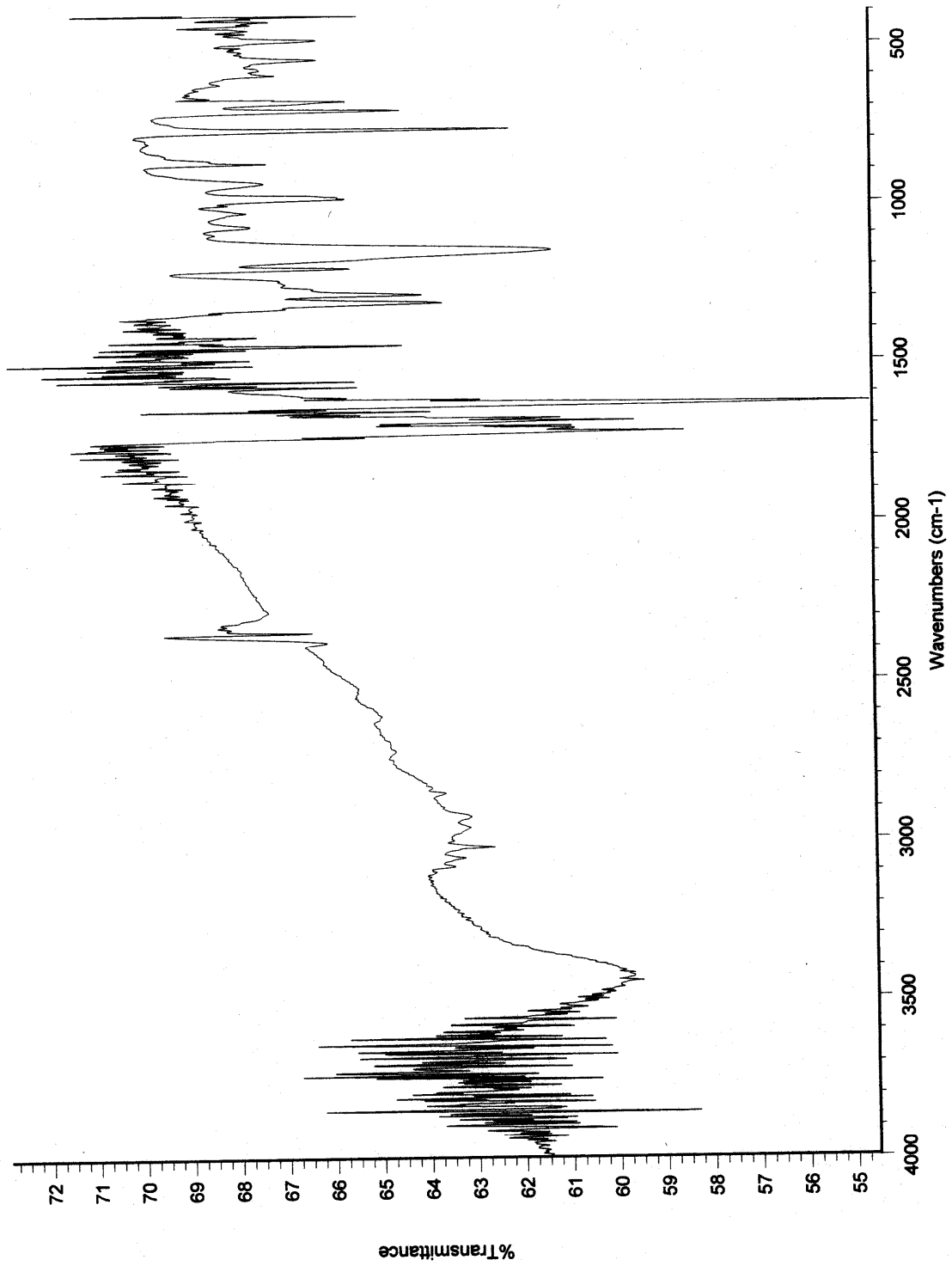


FIGURA A3.17

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de D-manitol.

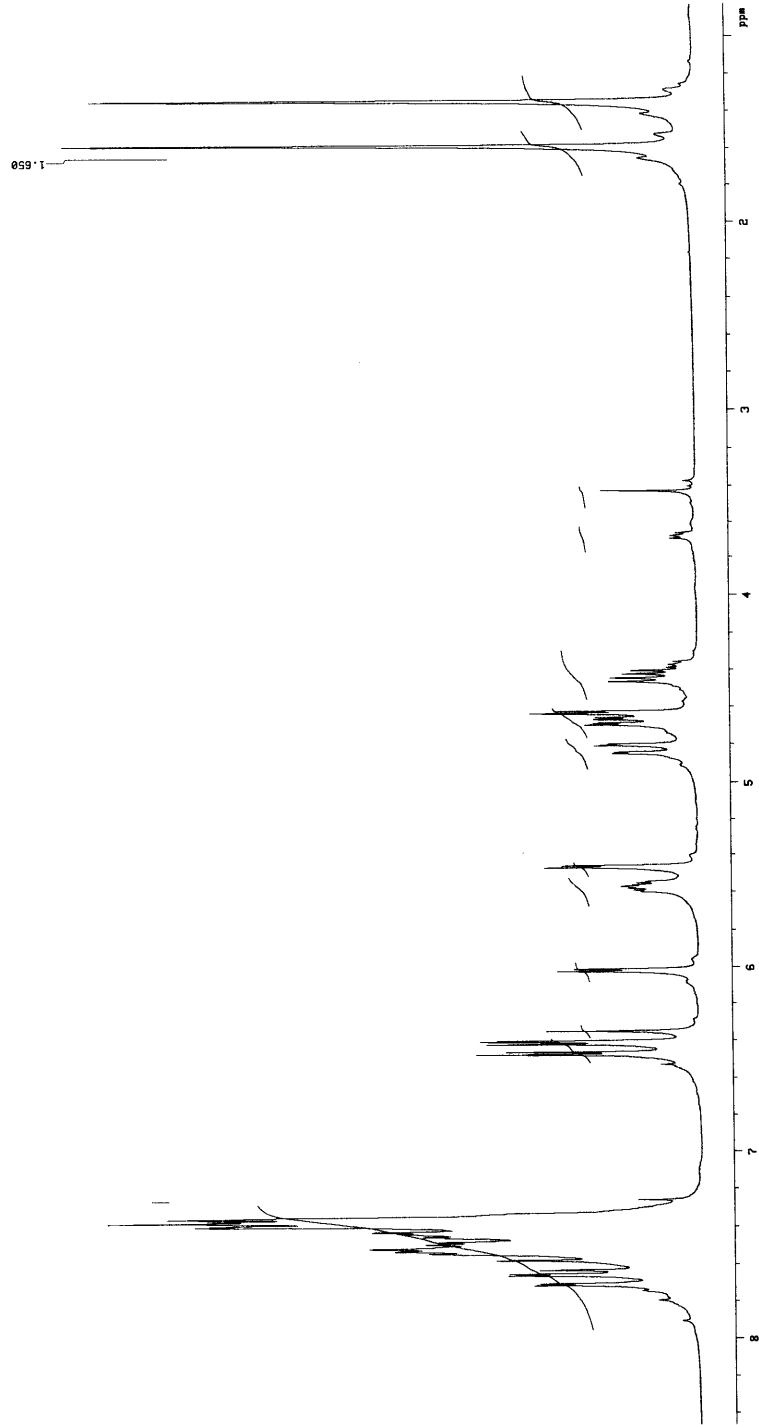


FIGURA A3.18

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinamoiado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

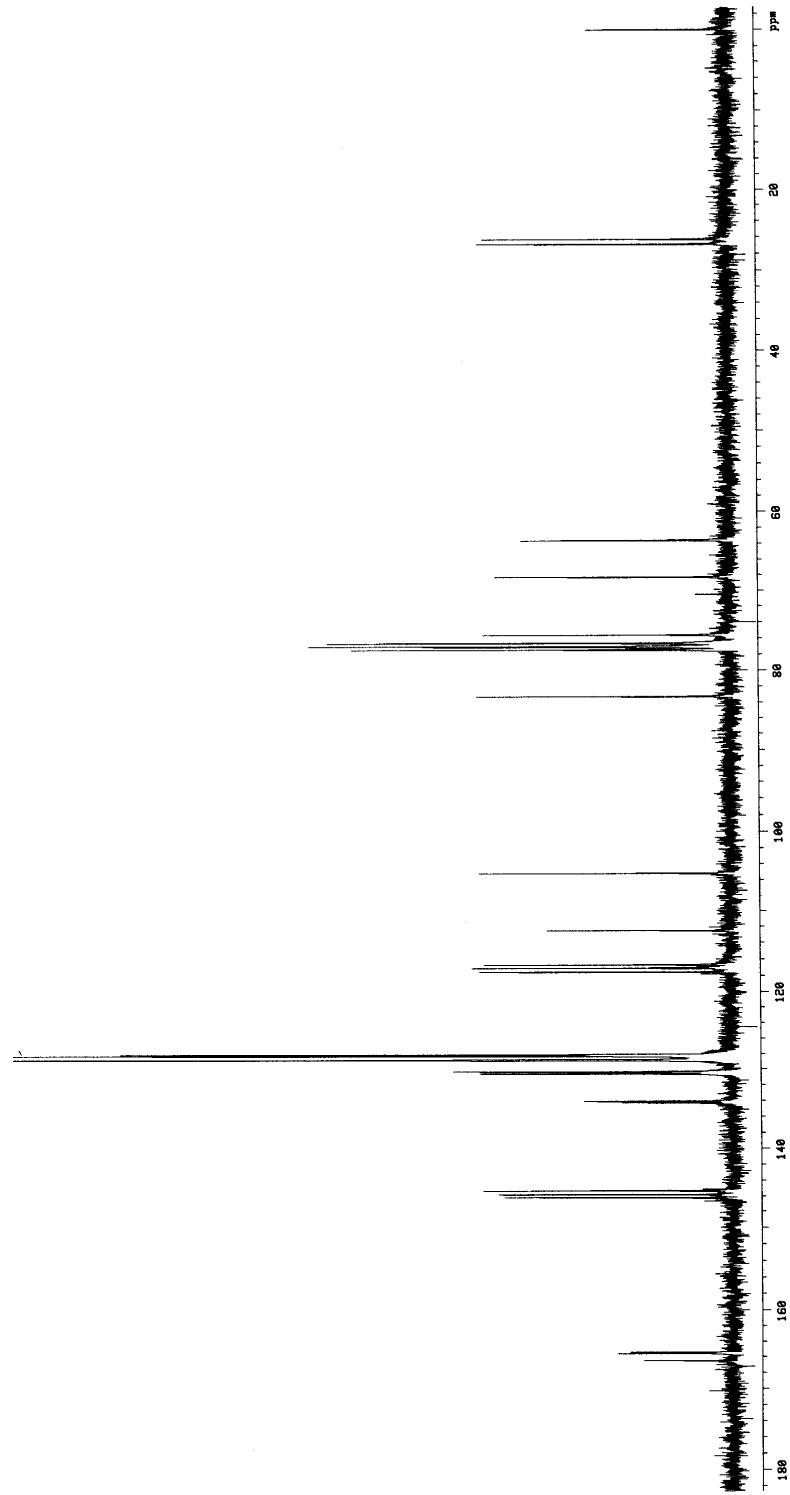


FIGURA A3.19

Espectro de ^{13}C r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

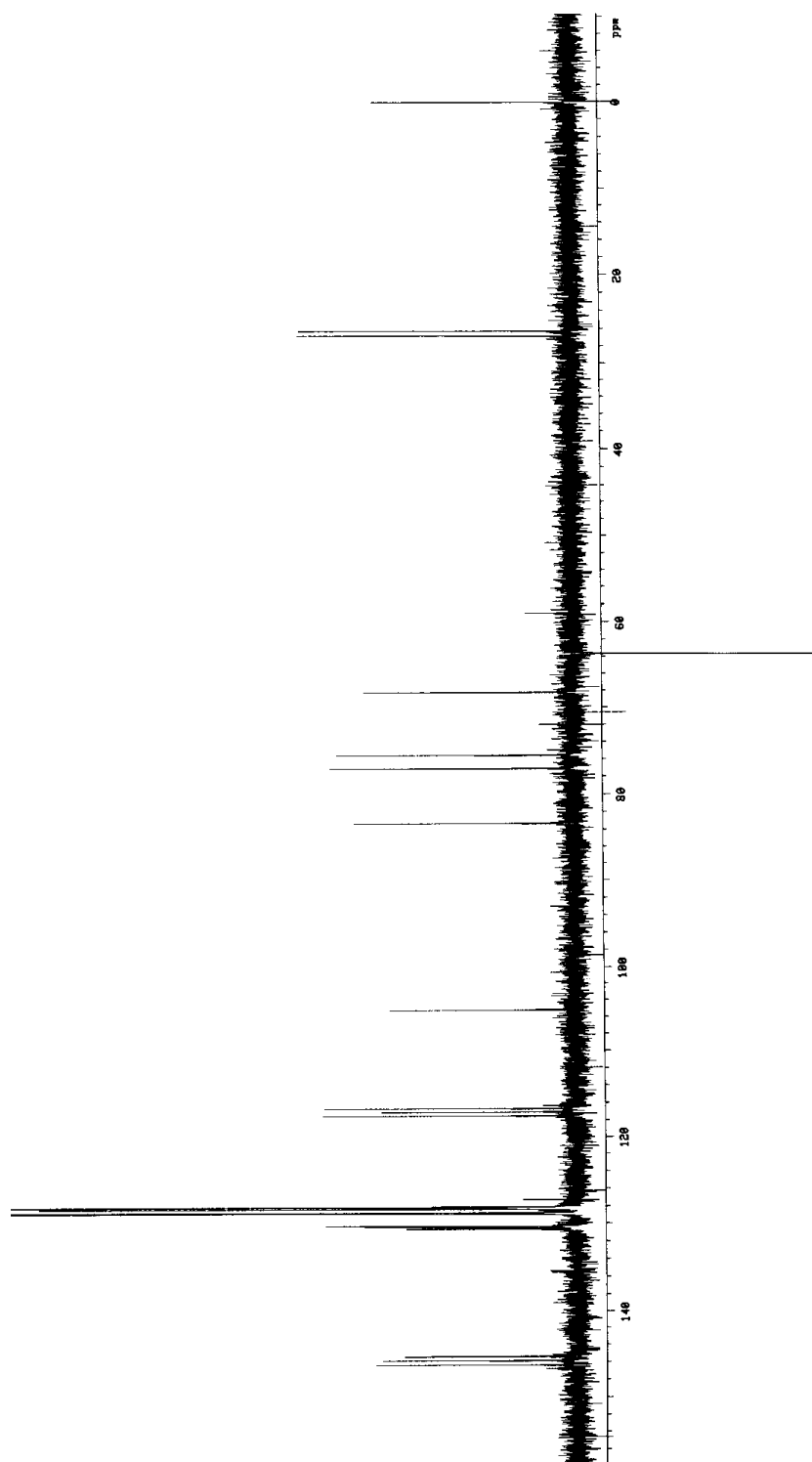


FIGURA A3.20

Espectro de ¹³C r.m.n. ("DEPT") del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén-α-D-glucofuranosa.

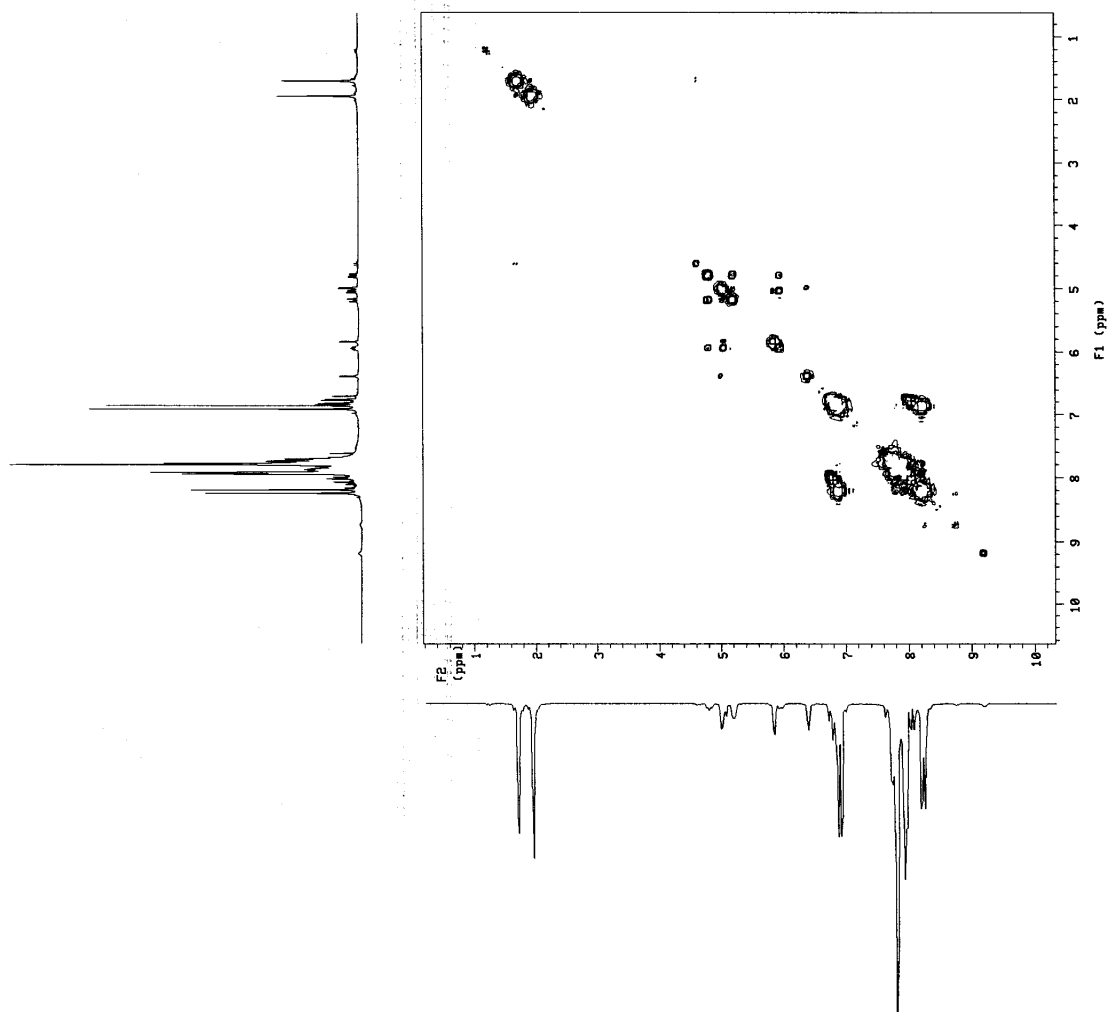


FIGURA A3.21

Espectro COSY del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

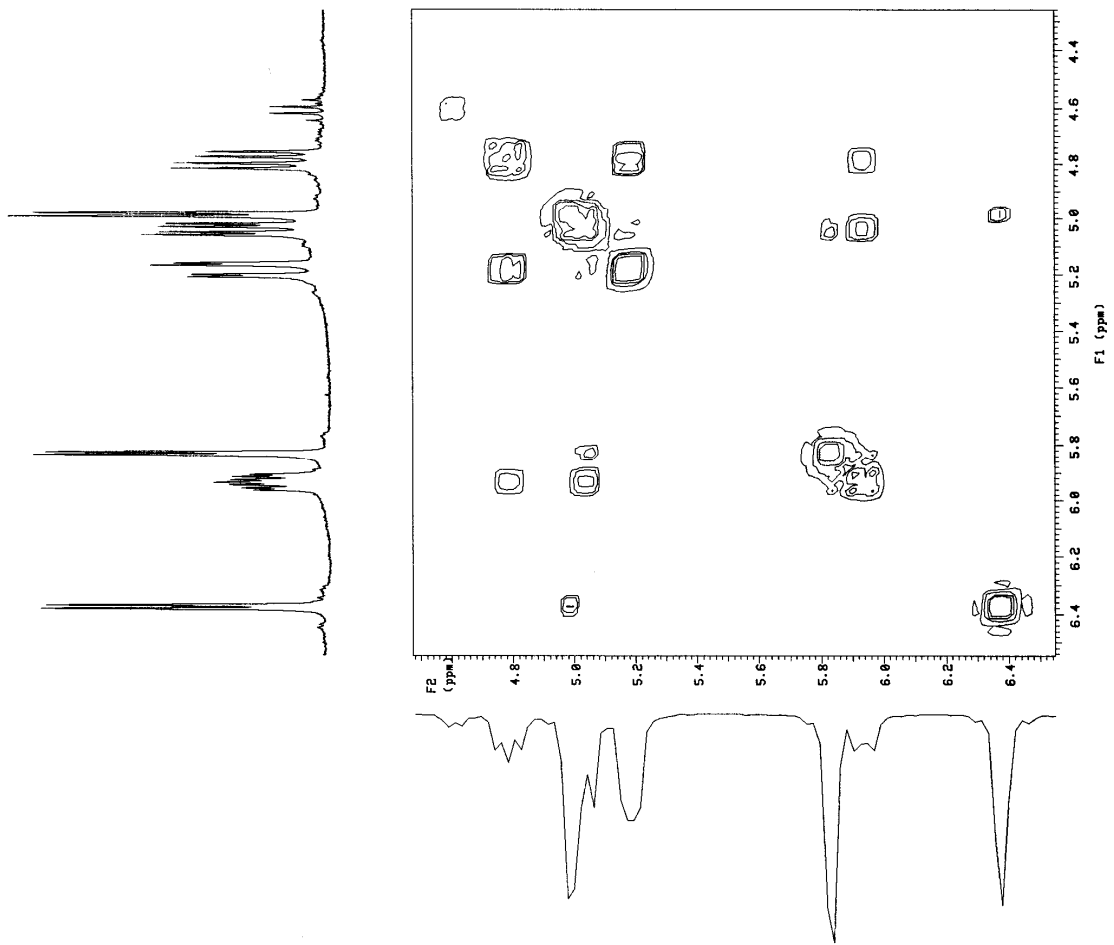


FIGURA A3.22

Espectro COSY del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

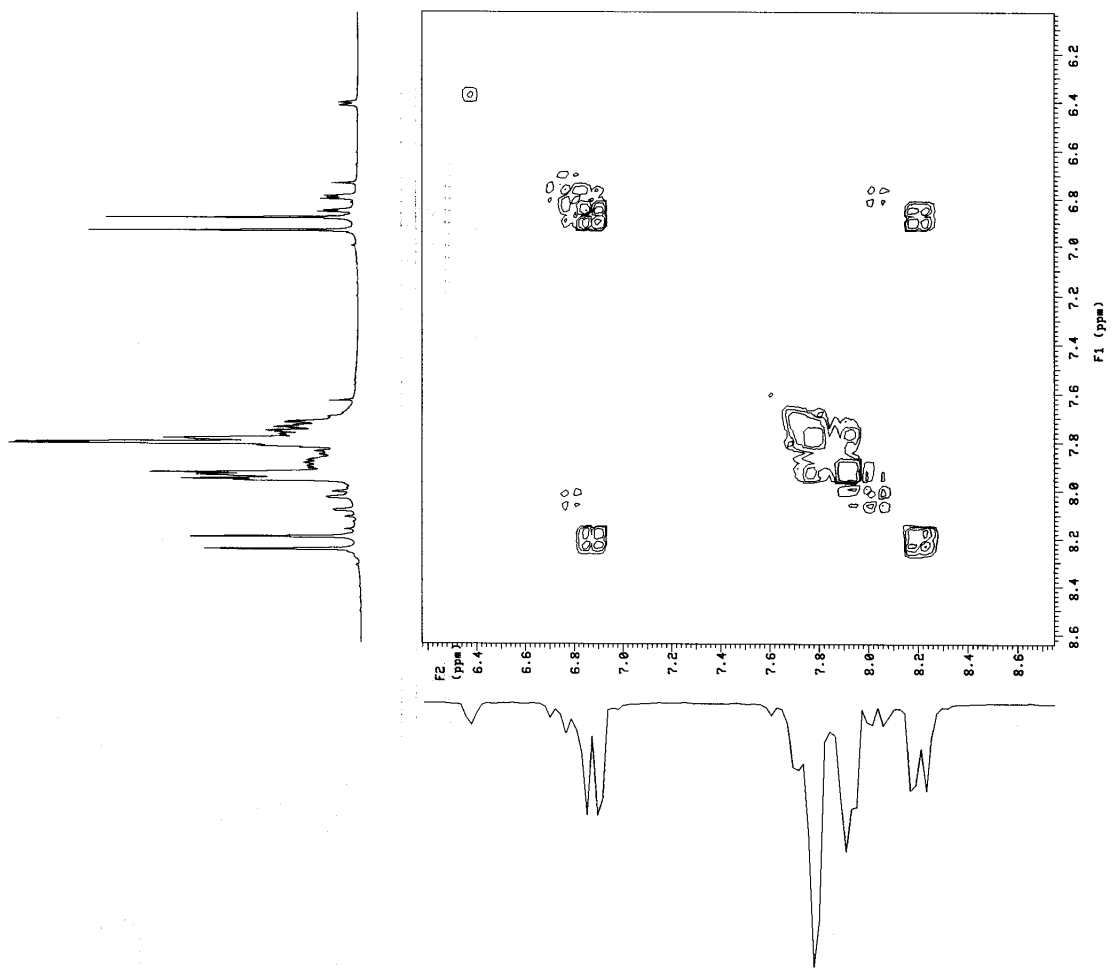


FIGURA A3.23

Espectro COSY del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

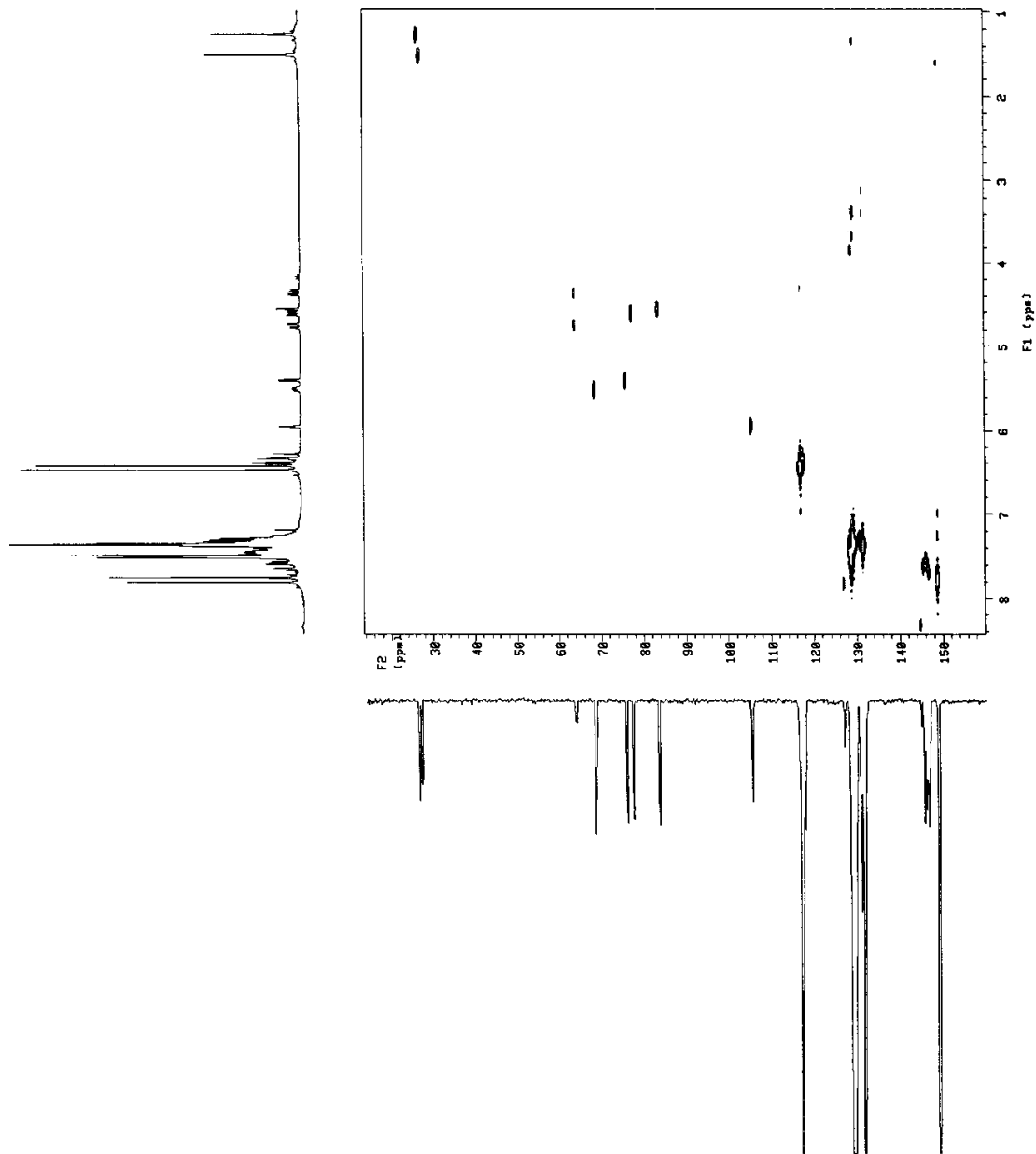


FIGURA A3.24

Correlación C/H del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

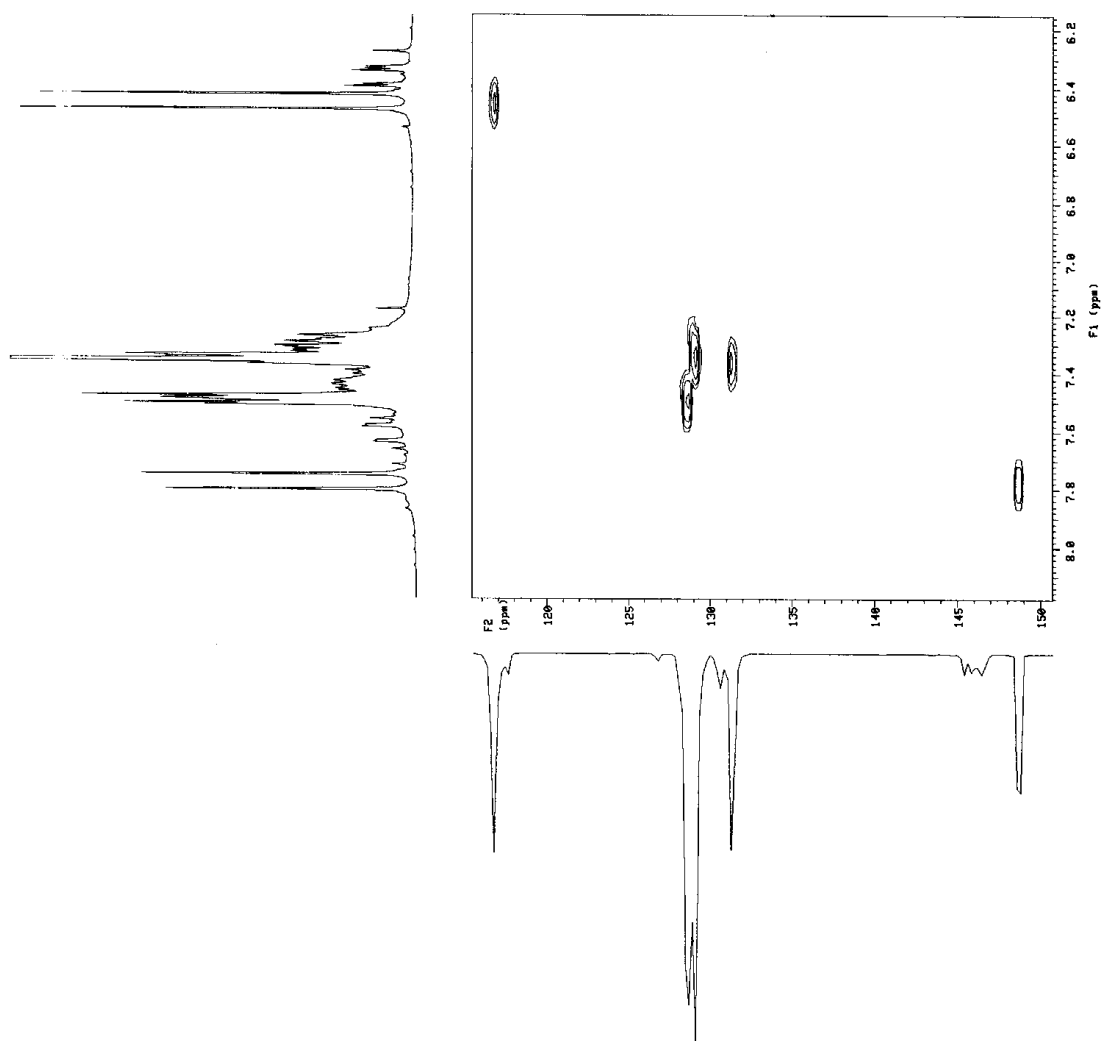


FIGURA A3.25

Correlación C/H del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

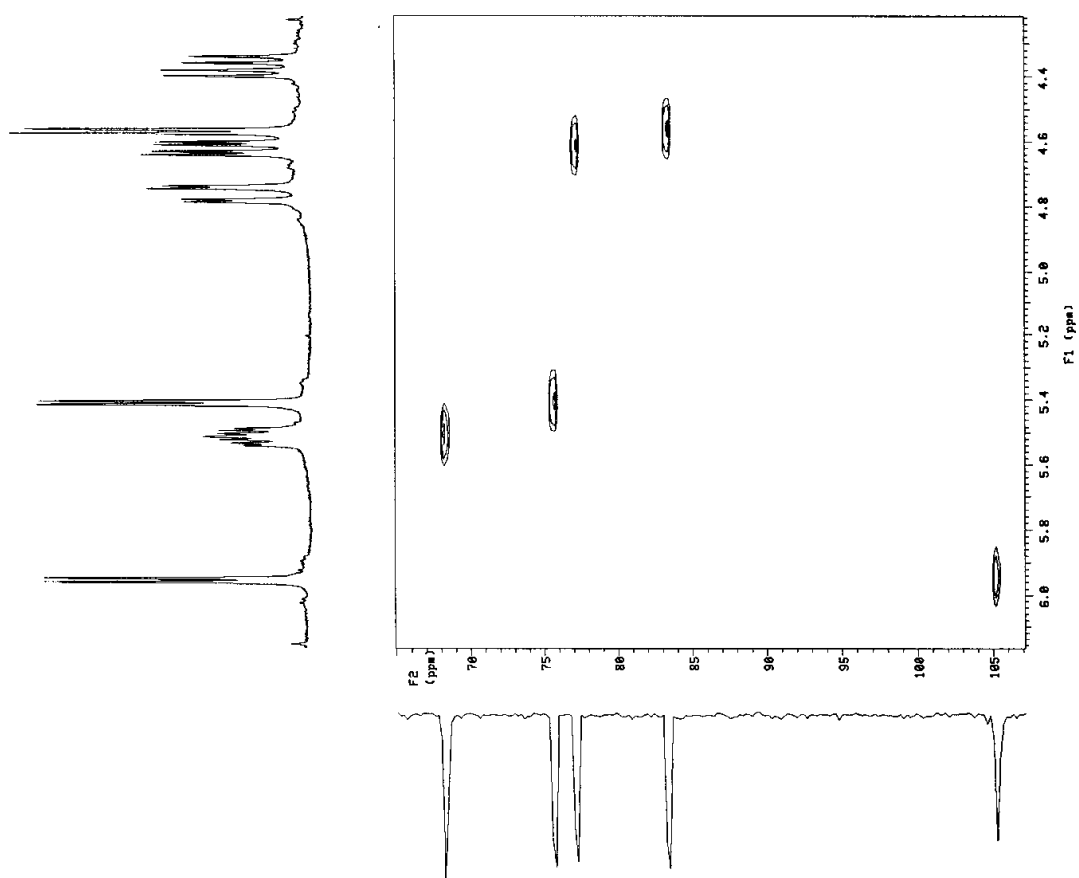


FIGURA A3.26

Correlación C/H del derivado totalmente cinnamoylado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucosilano.

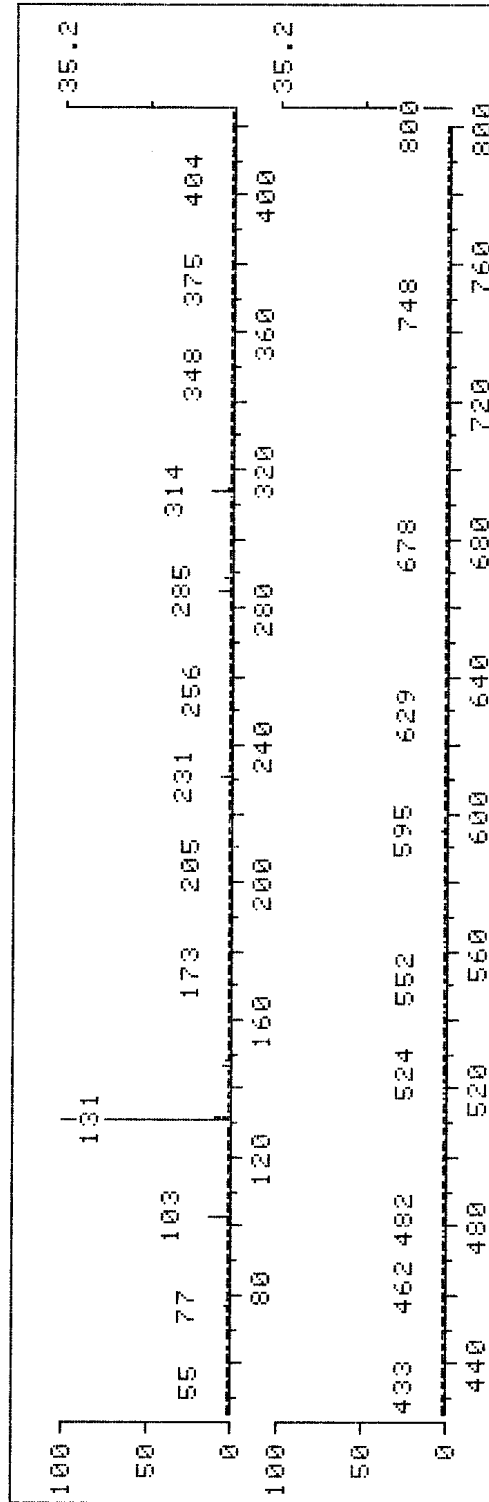


FIGURA A3.27

Espectro de masas del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén-α-D-glucofuranosa.

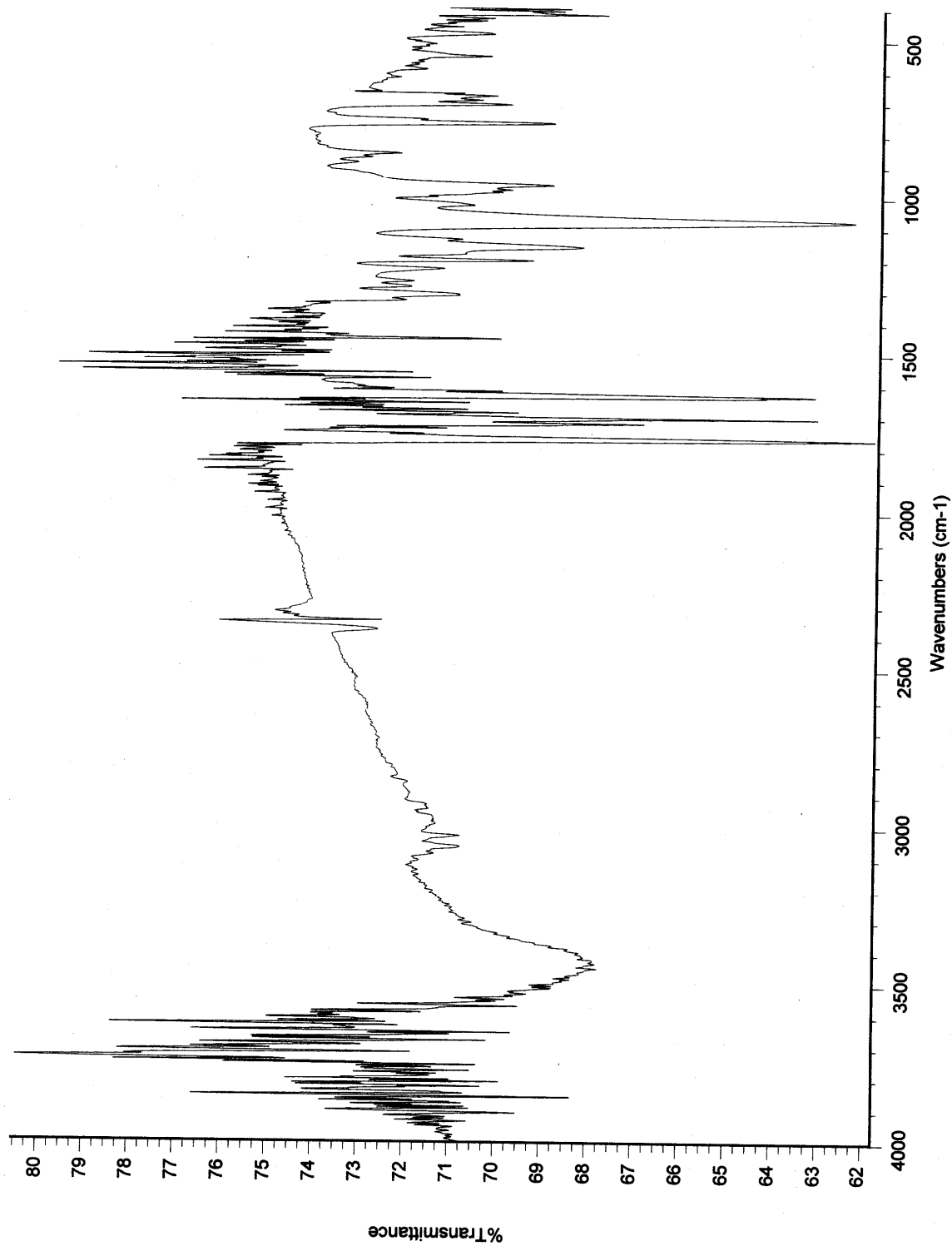


FIGURA A3.28

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

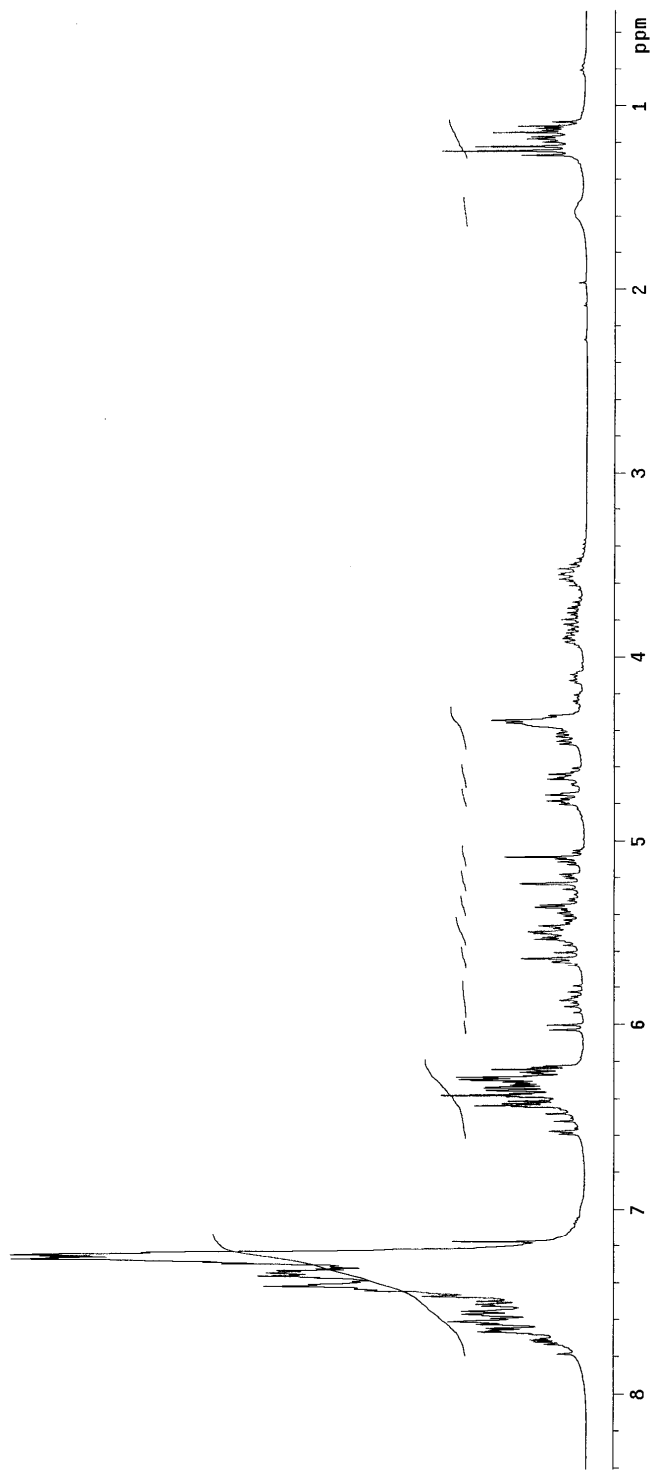


FIGURA A3.29

Espectro de ¹H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

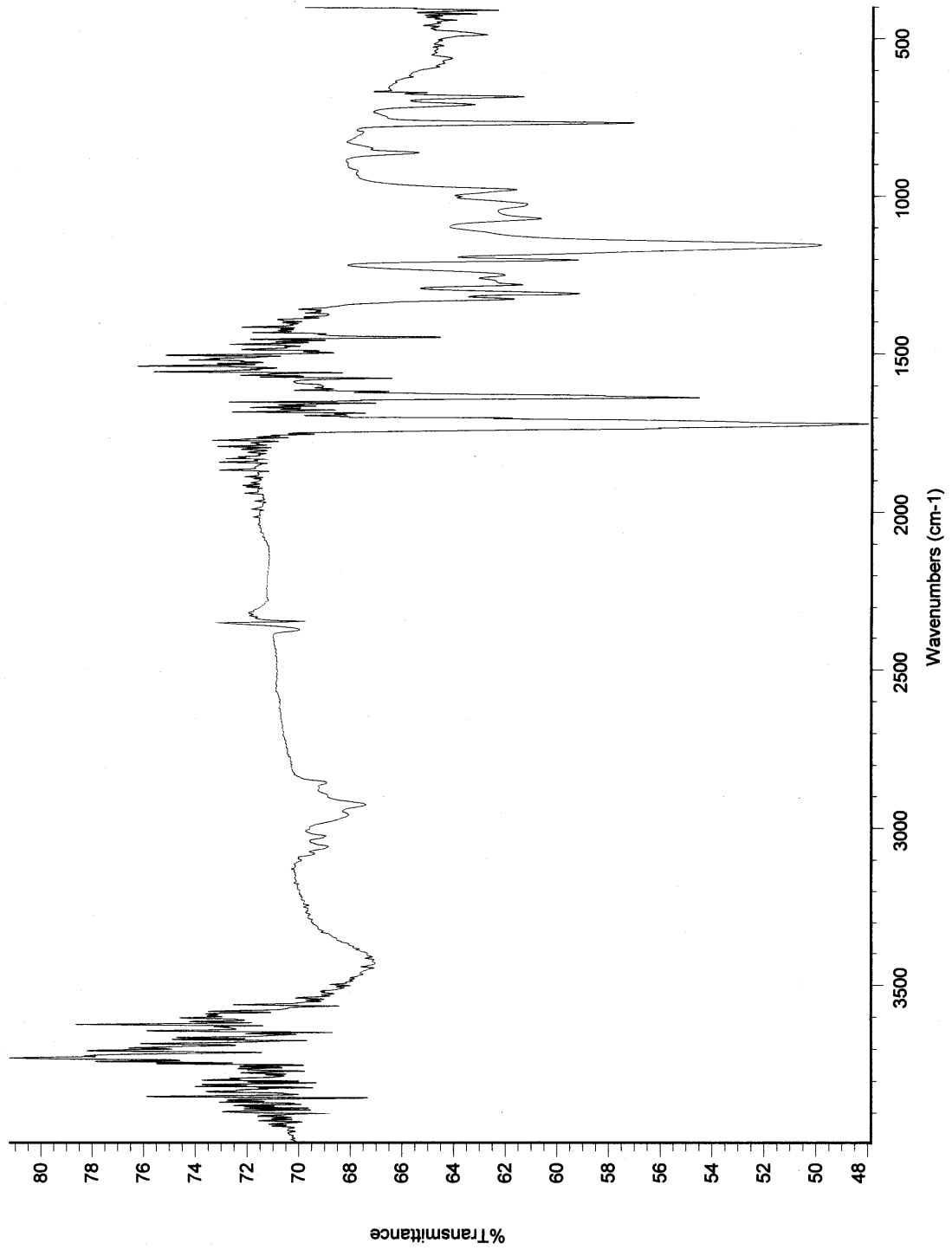


FIGURA A3.30

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

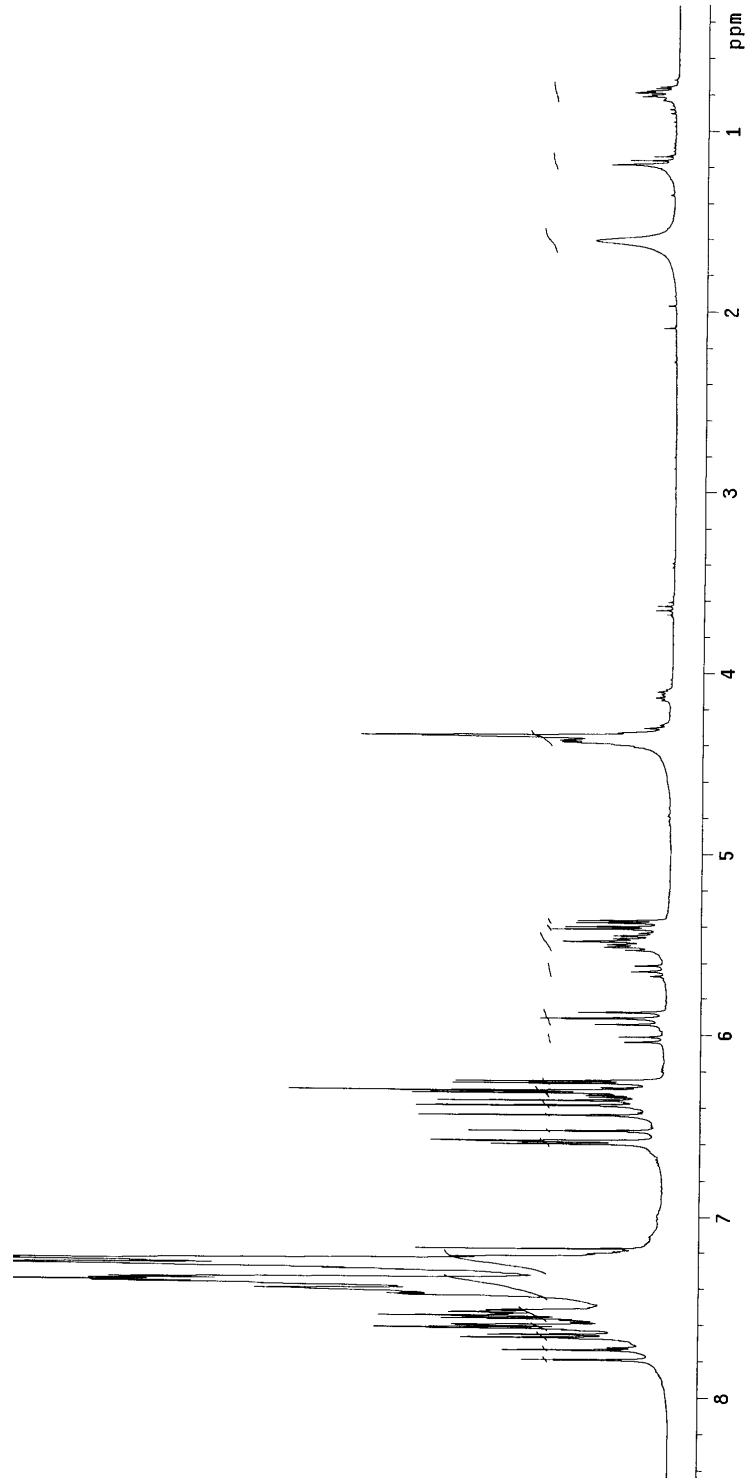


FIGURA A3.31

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

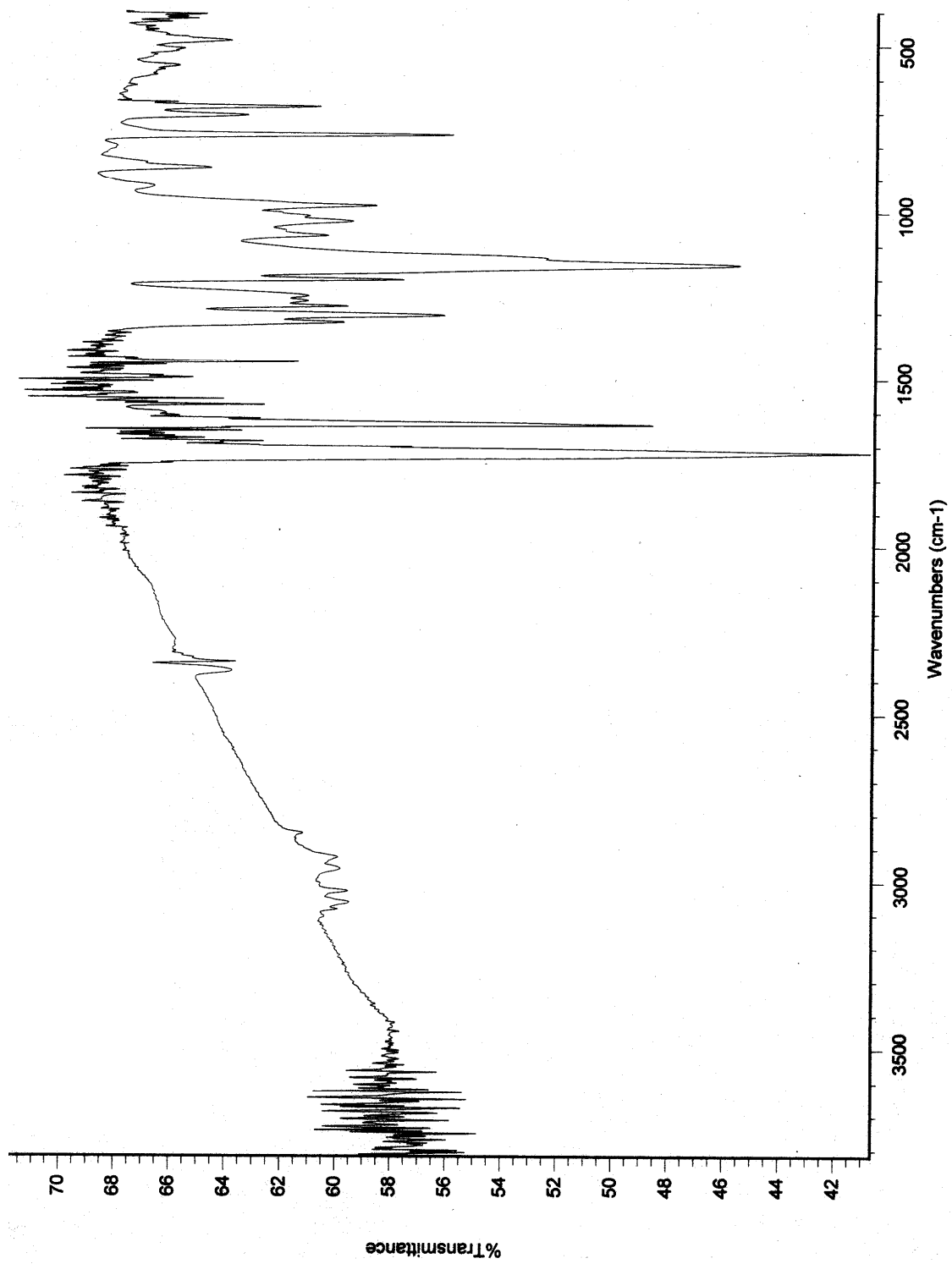


FIGURA A3.32

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

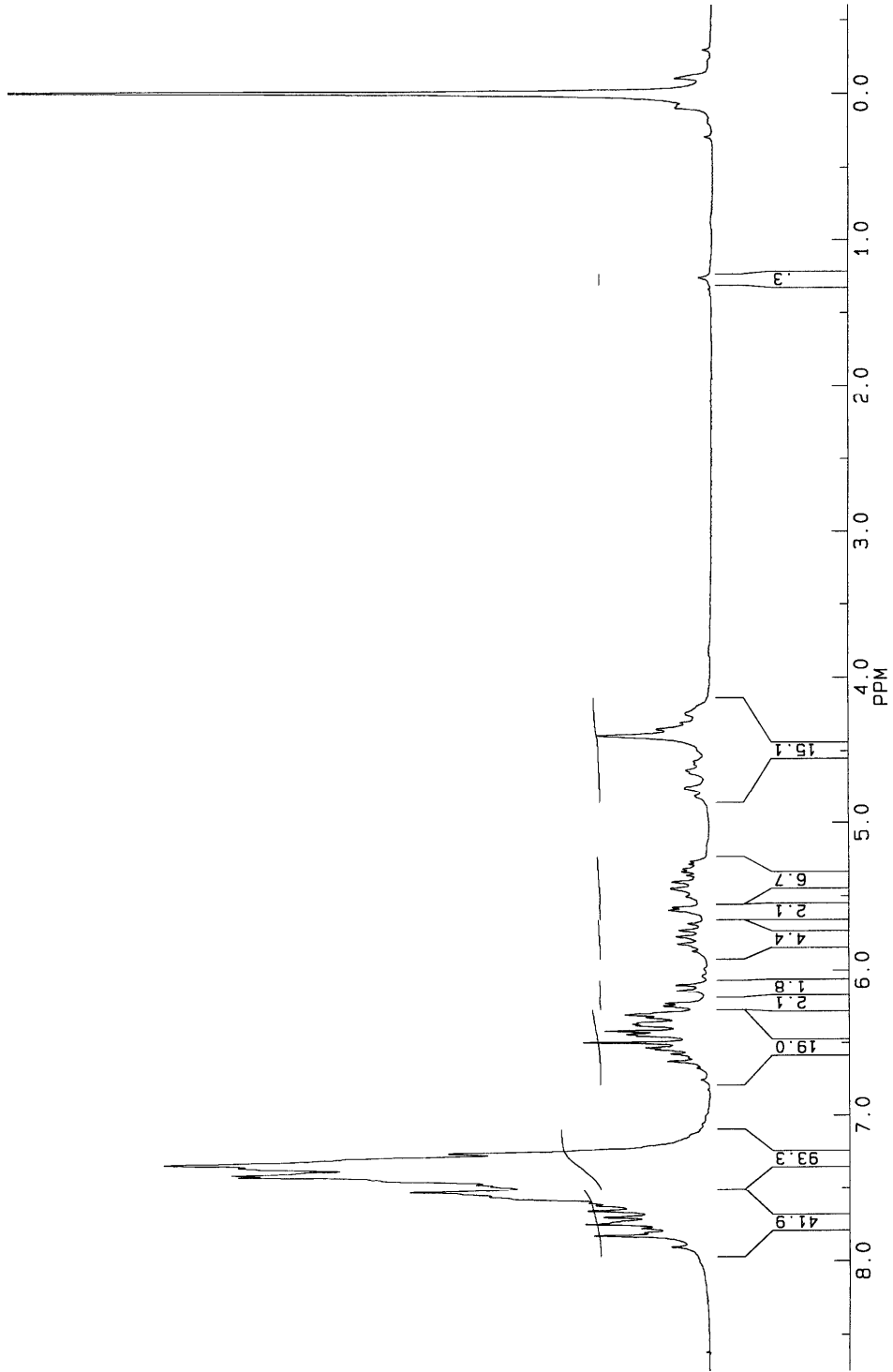


FIGURA A3.33

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinnamoylado de maltosa.

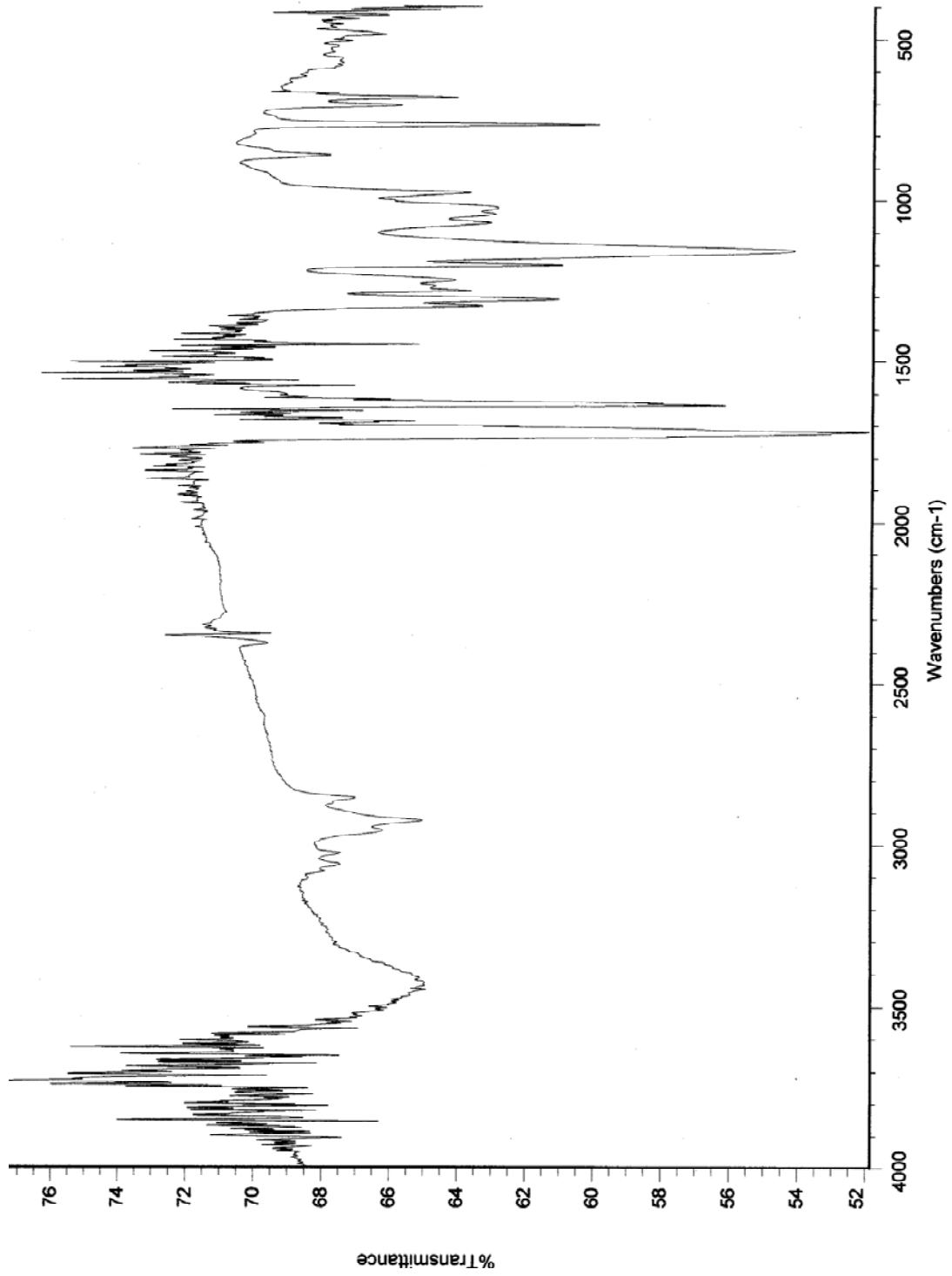


FIGURA A3.34

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de maltosa.

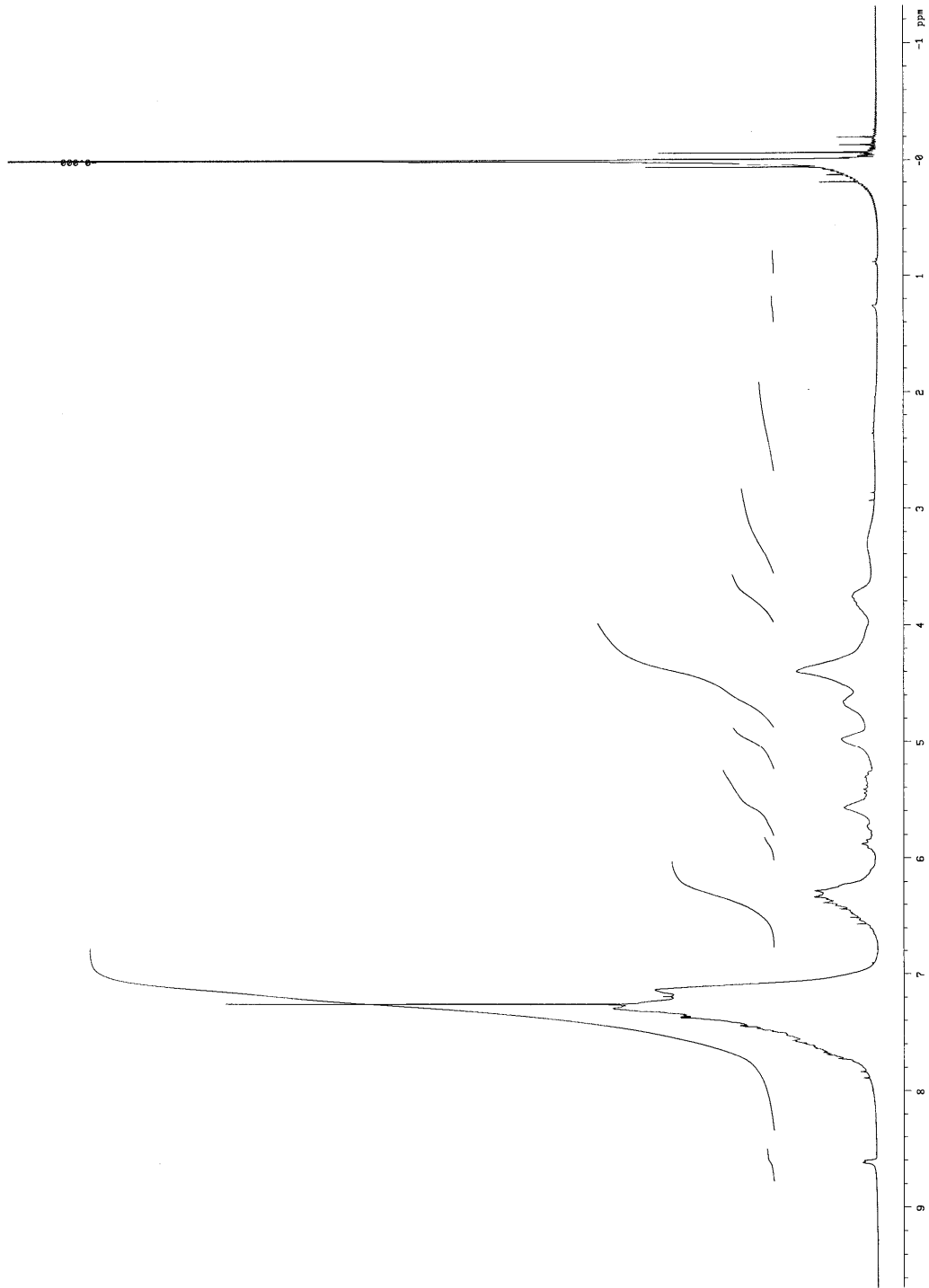


FIGURA A3.35

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

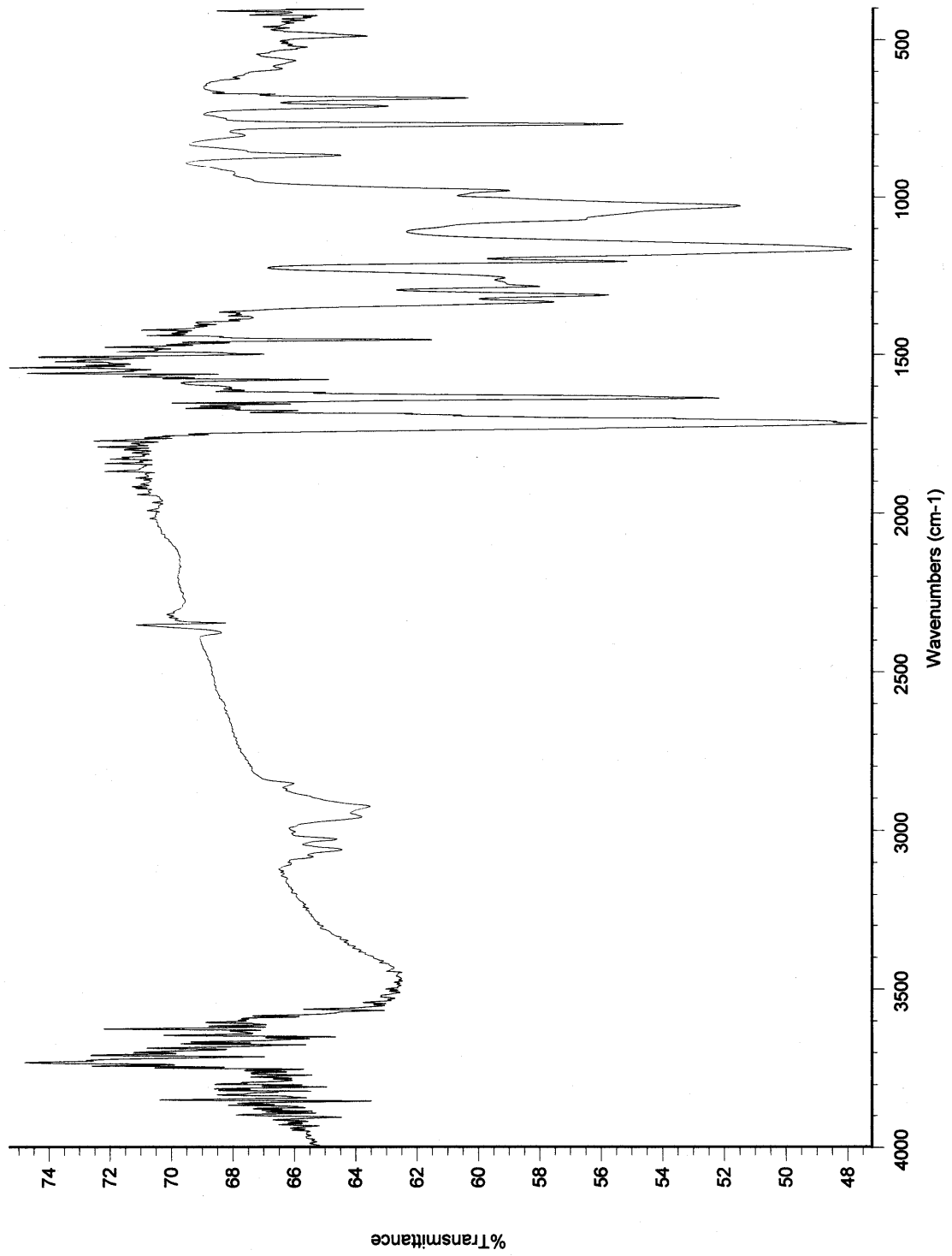


FIGURA A3.36

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

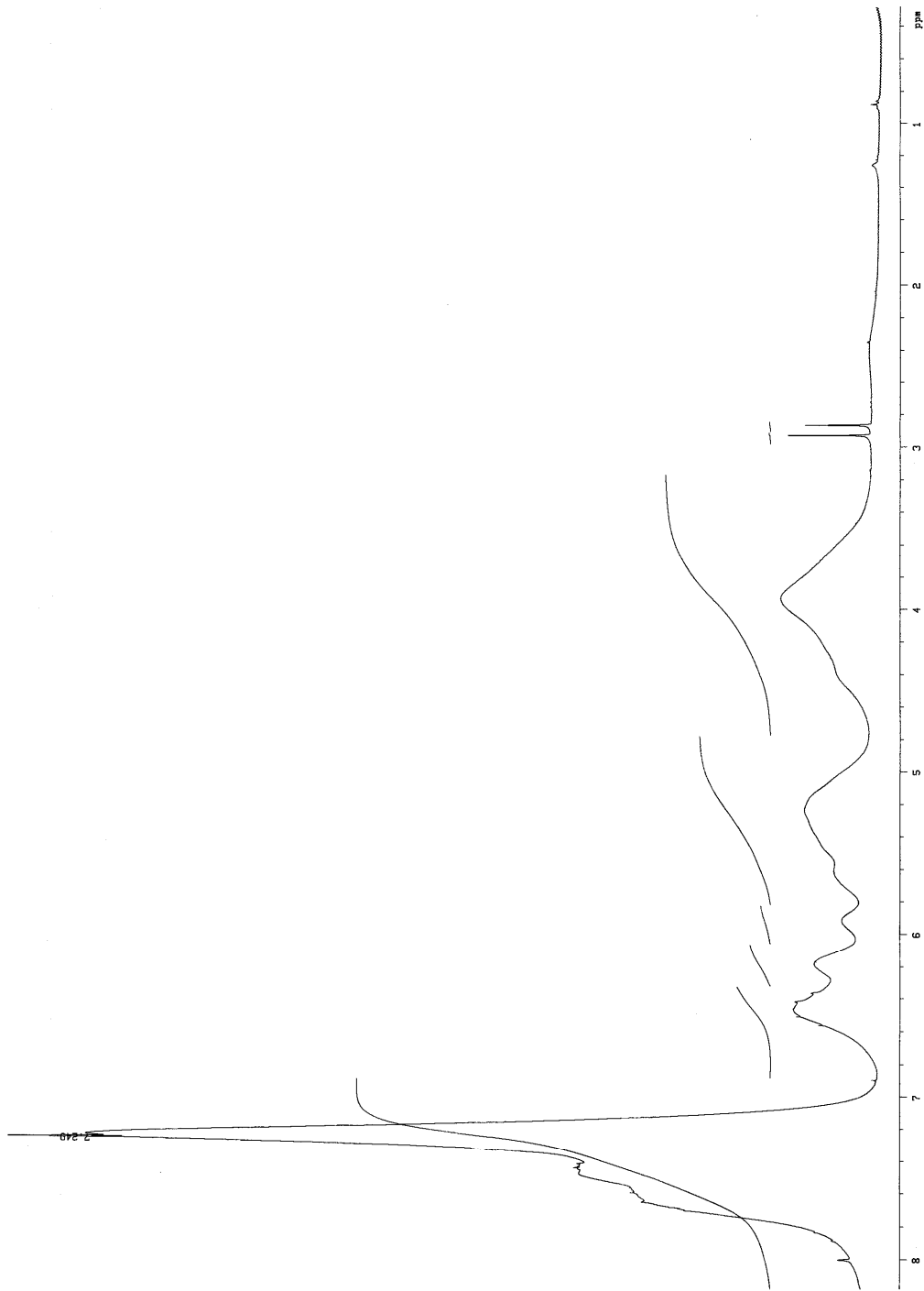


FIGURA A3.37

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinnamoylado de dextrano.

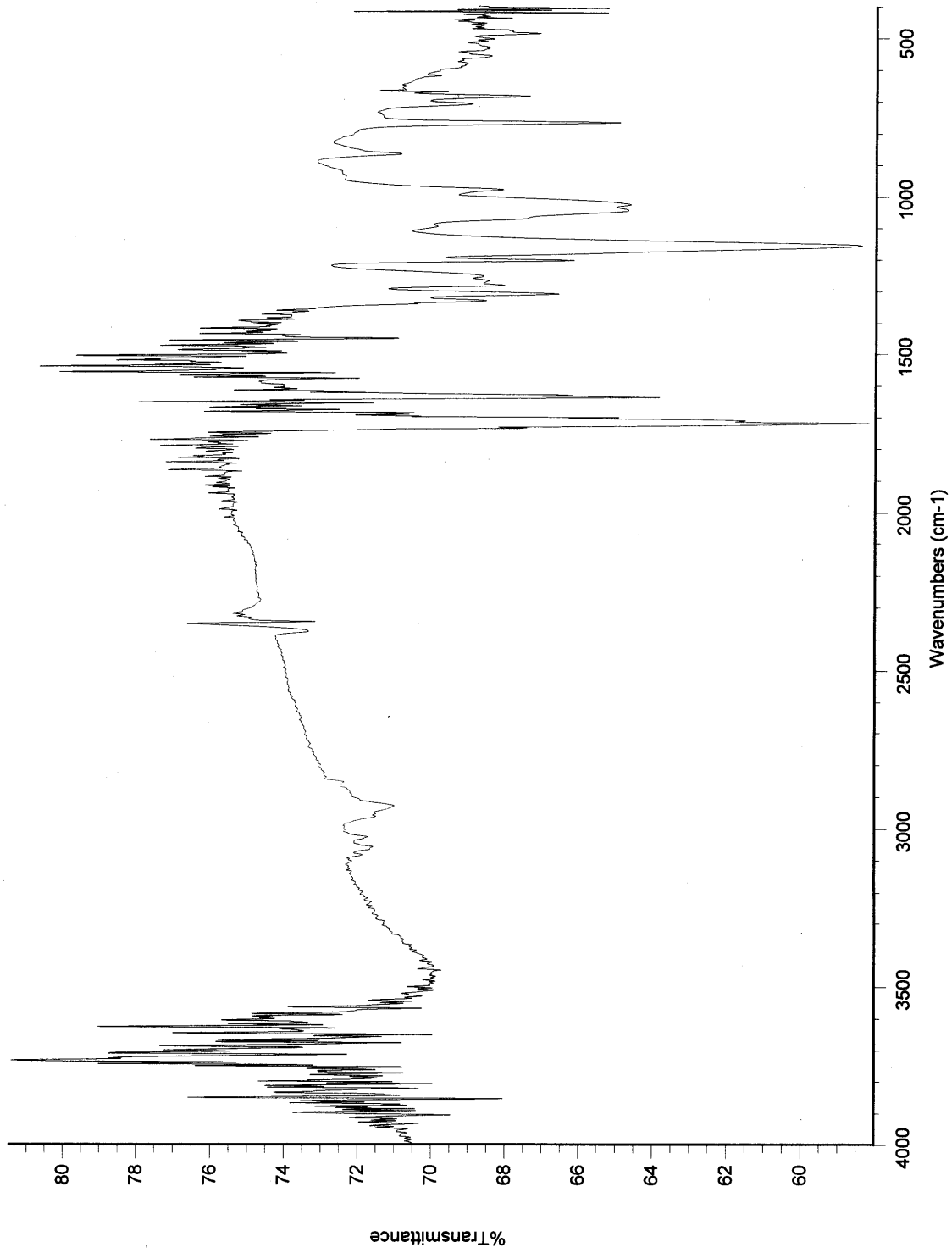


FIGURA A3.38

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de dextrano.

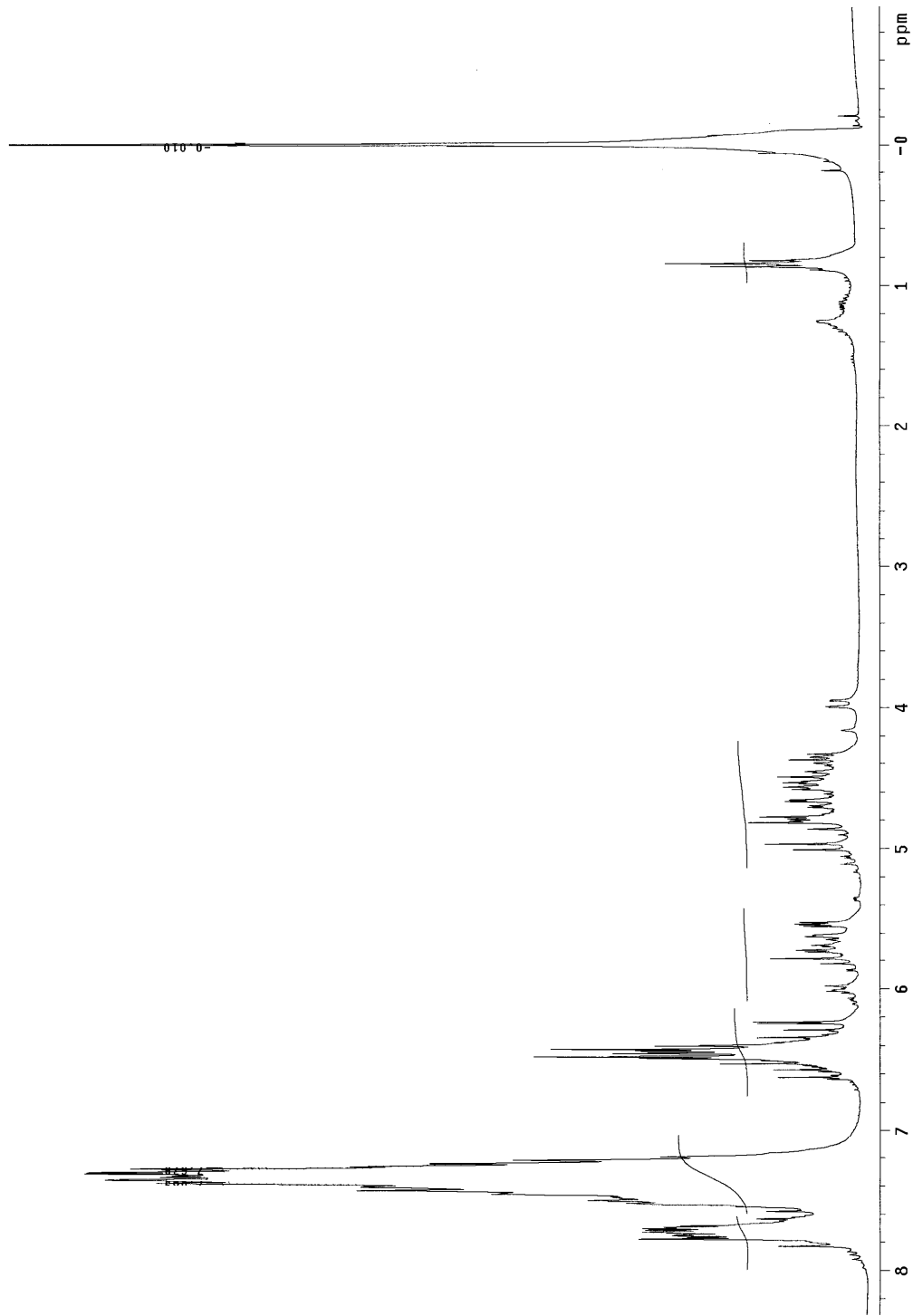


FIGURA A3.39

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinnamoylado de D-fructosa.

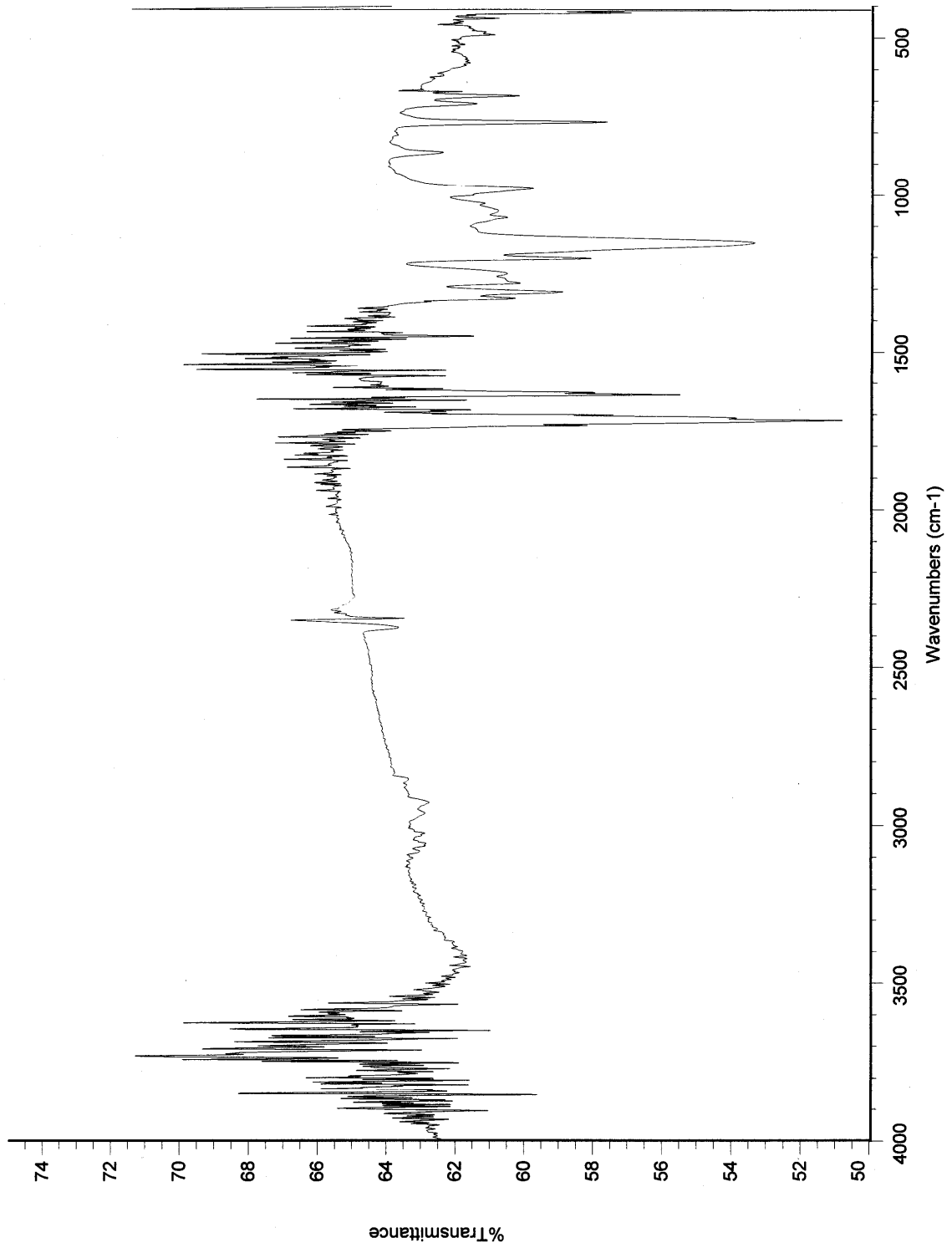


FIGURA A3.40

Espectro de ir. del derivado totalmente cinnamoylado de D-fructosa.



FIGURA A3.41

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa (Ampliación). Contiene ácido cinámico como referencia.

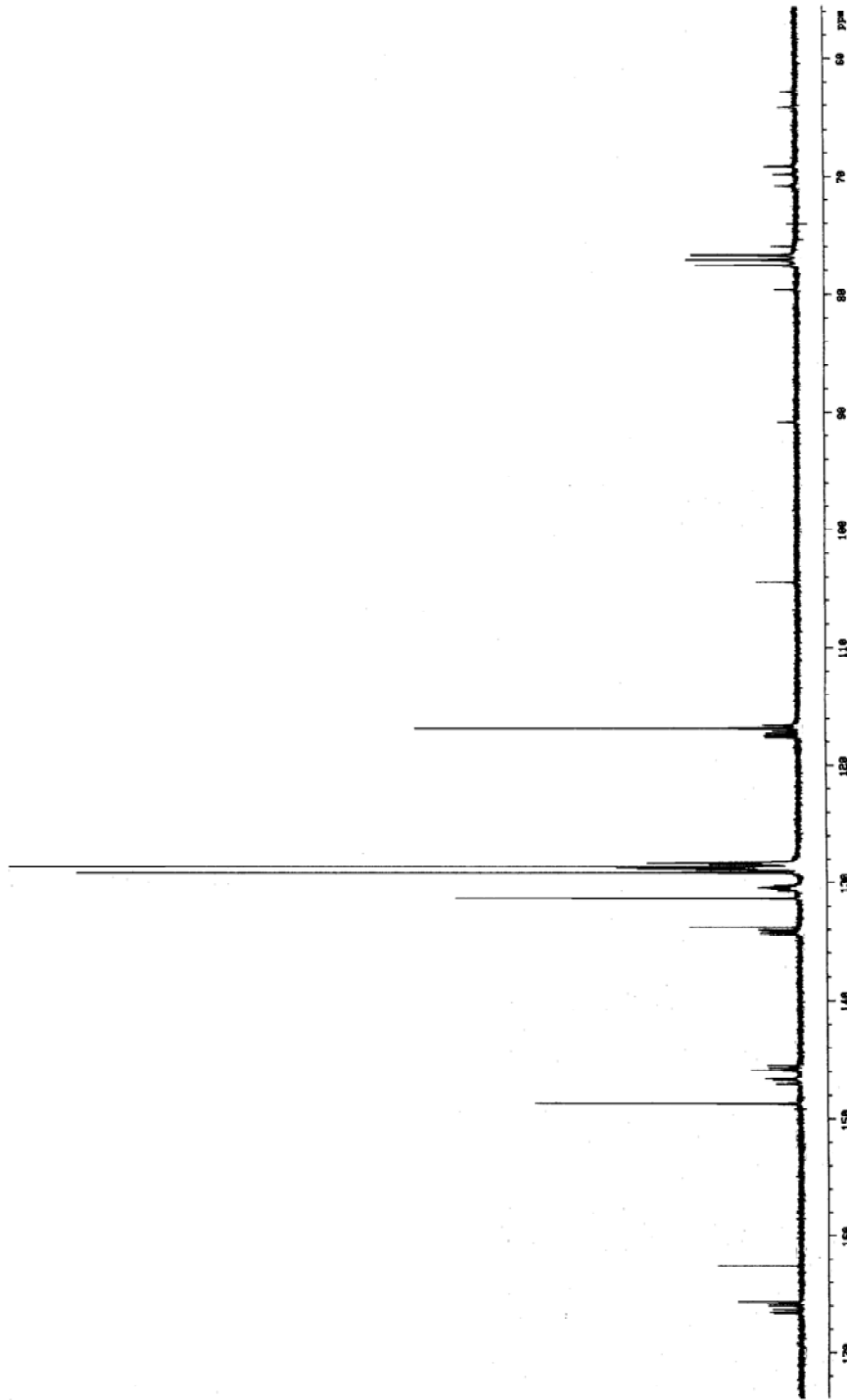


FIGURA A3.42

Espectro de ^{13}C r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.
Contiene ácido cinámico como referencia.

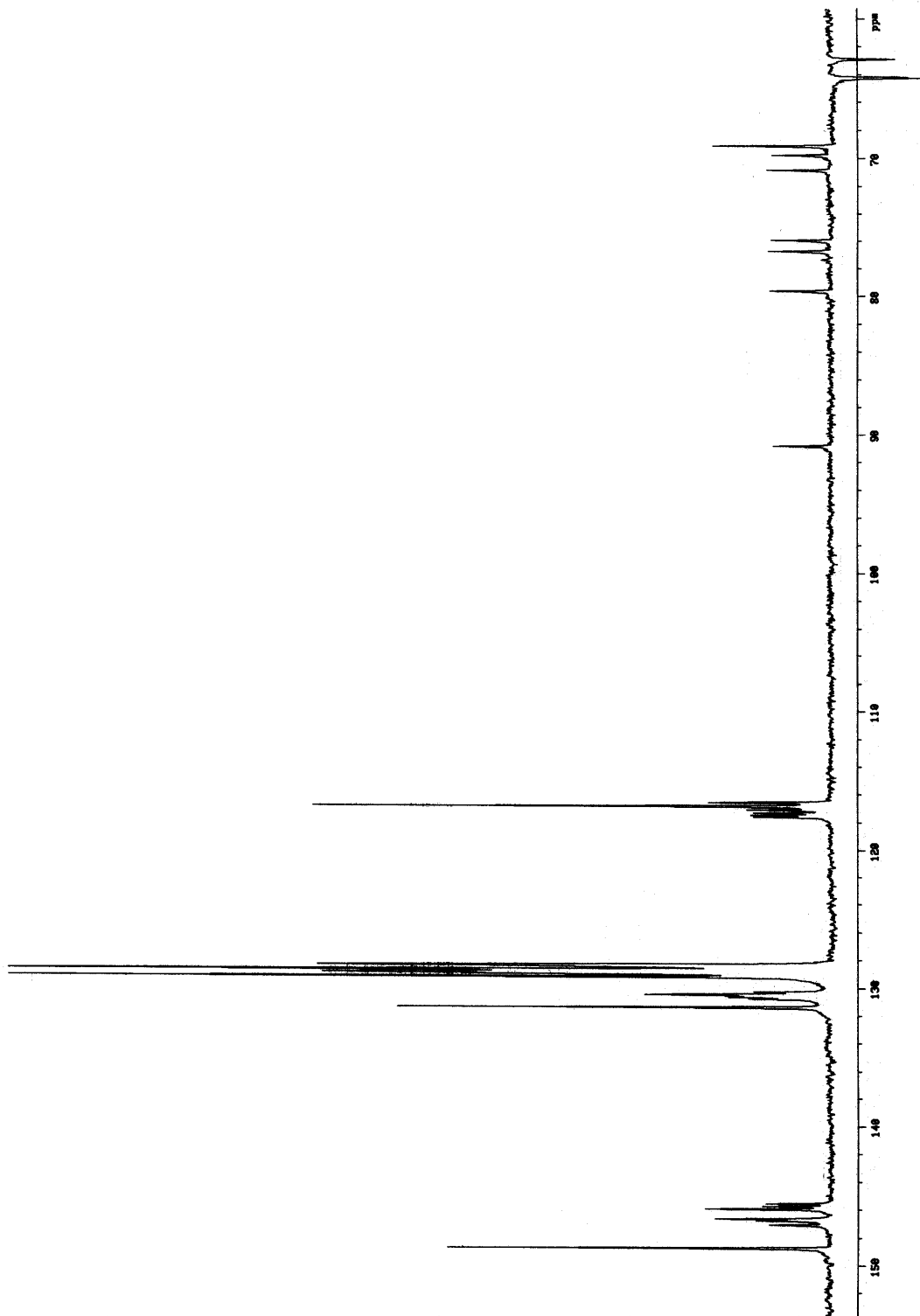


FIGURA A3.43

Espectro de ¹³C r.m.n. ("DEPT") del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

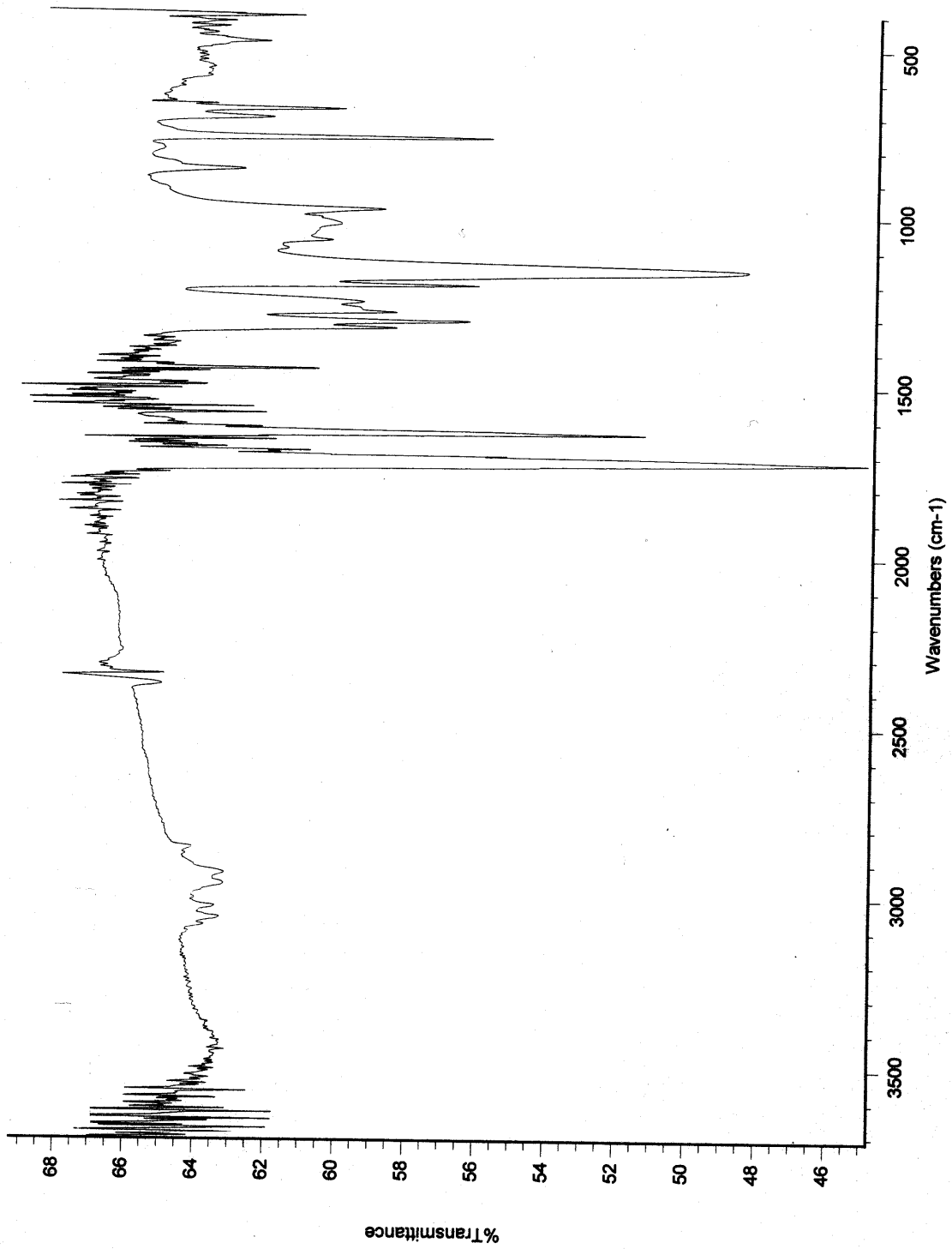


FIGURA A3.44

Espectro de ir. del derivado totalmente cinnamoylado de sacarosa.

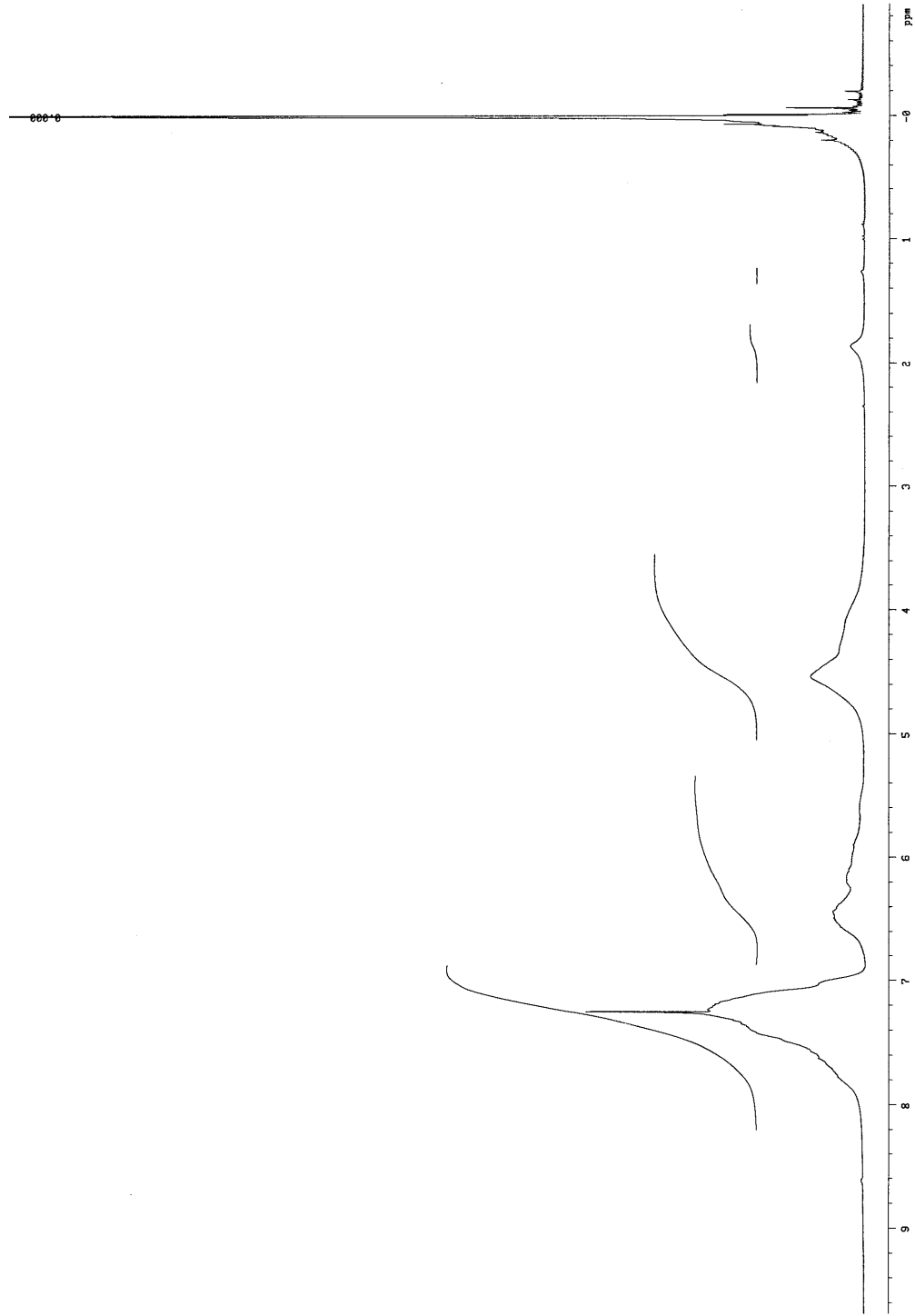


FIGURA A3.45

Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de inulina.

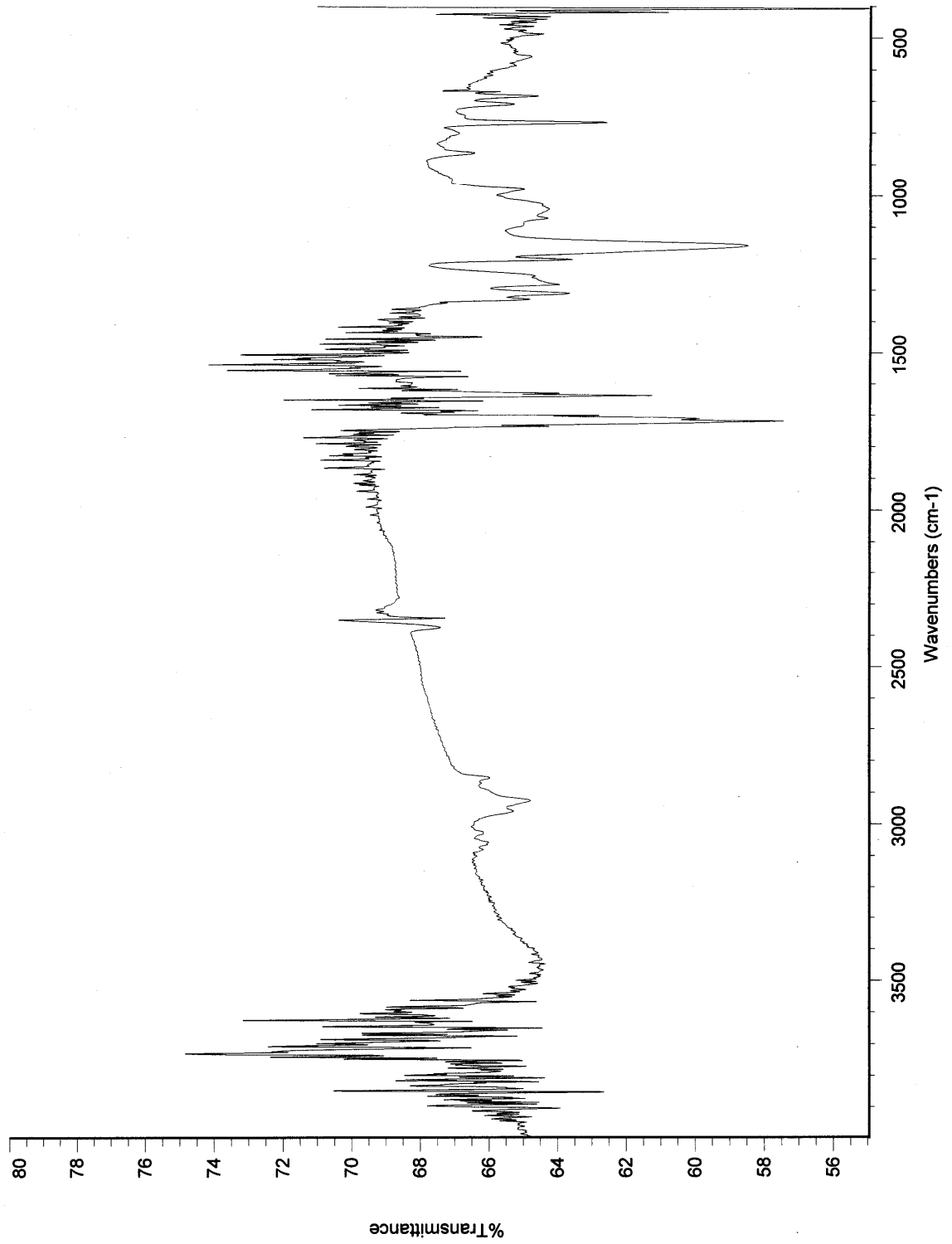


FIGURA A3.46
Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de inulina.

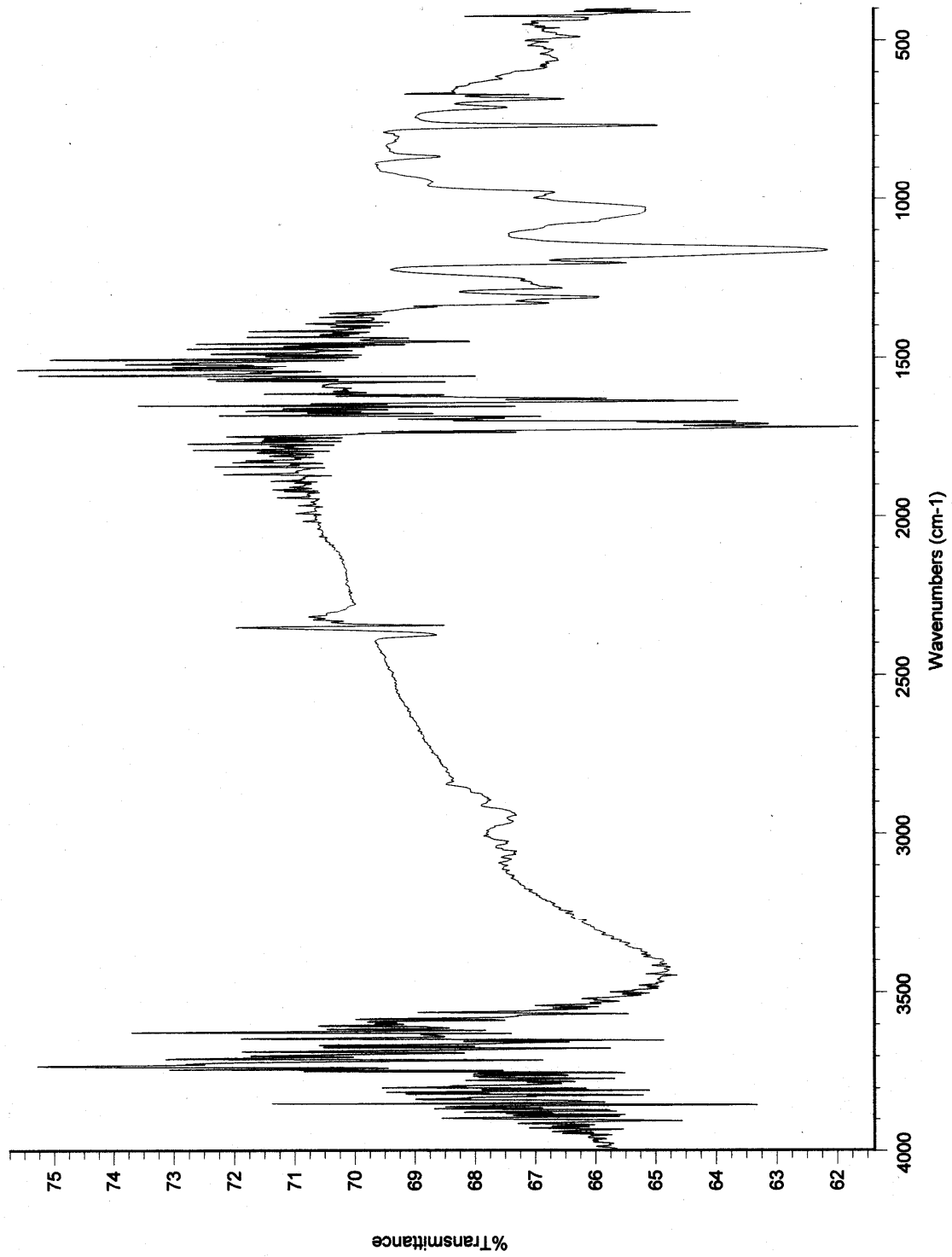


FIGURA A3.47

Espectro de ir. del derivado de inulina cinamoilado un 49%.

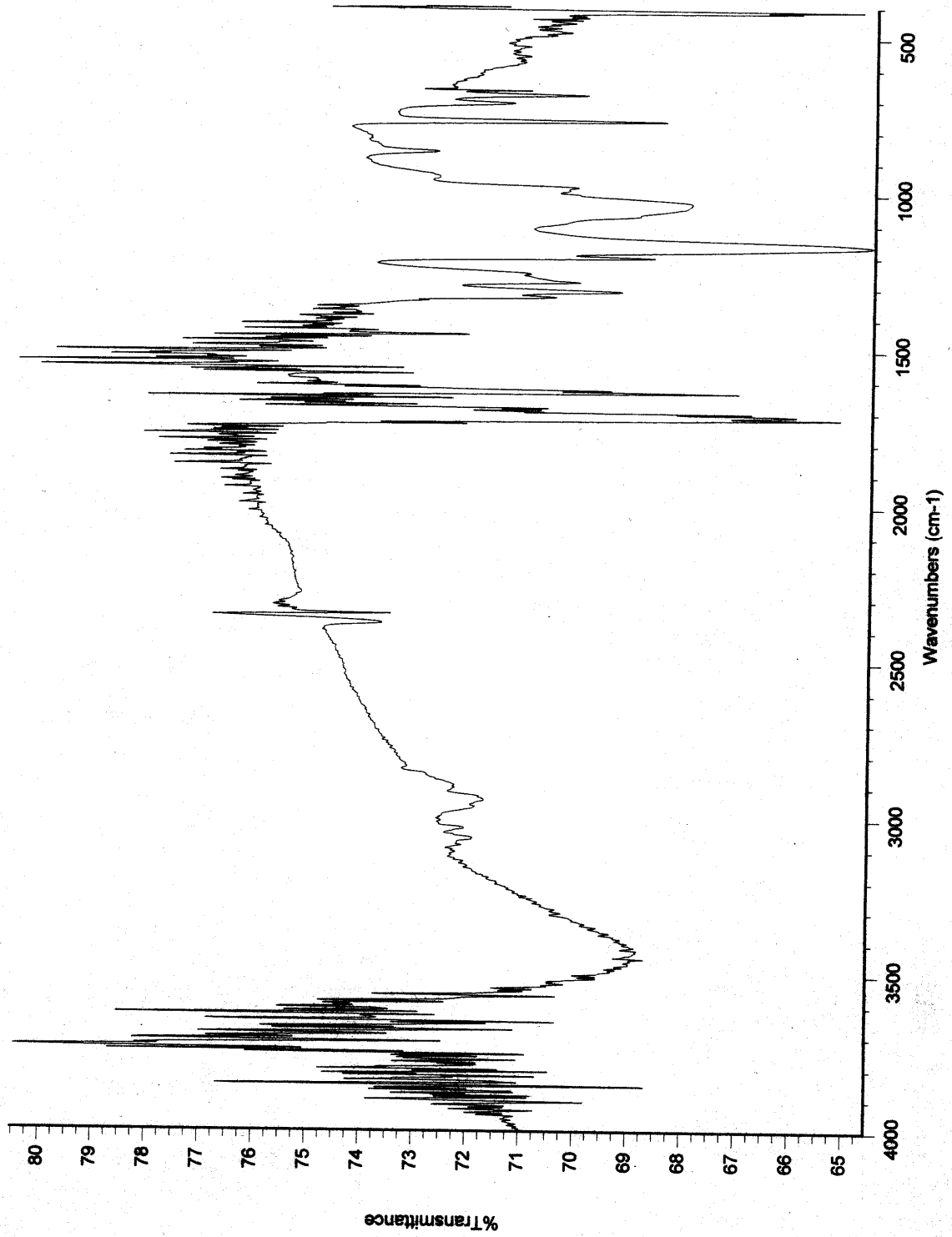


FIGURA A3.48

Espectro de ir. del derivado de inulina cinamoilado un 41%.

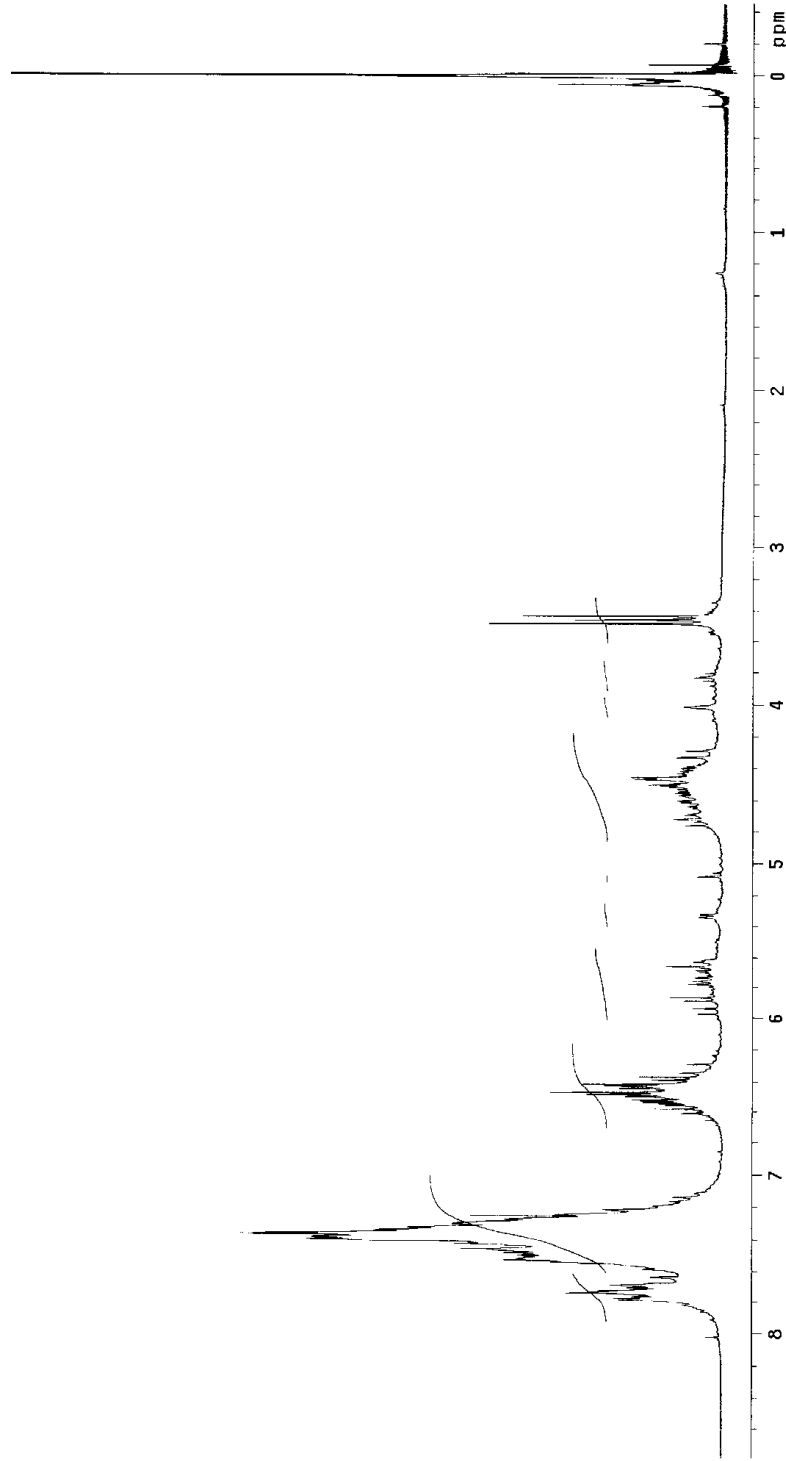


FIGURA A3.49
Espectro de ^1H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

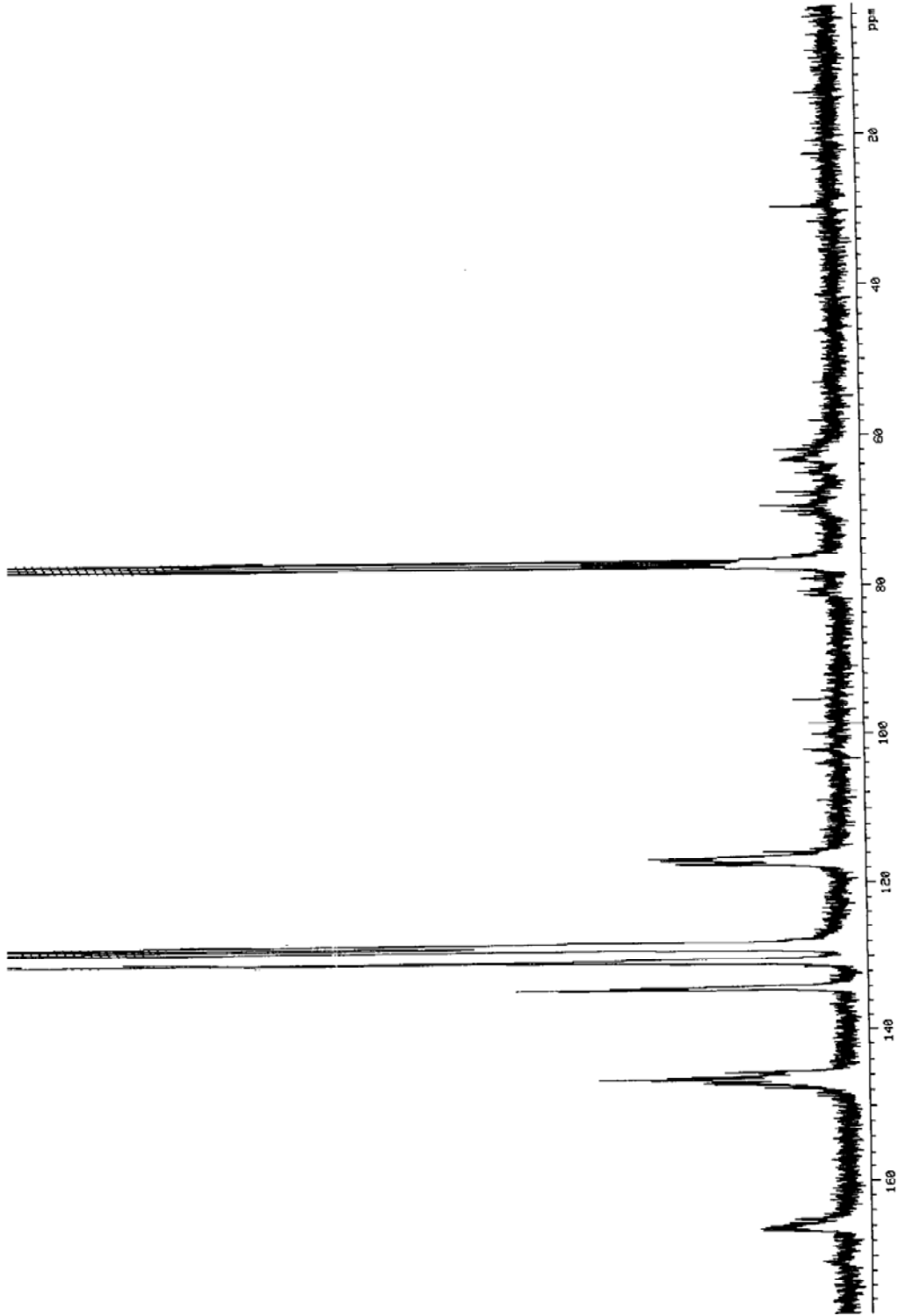


FIGURA A3.50

Espectro de ^{13}C r.m.n. del derivado totalmente cinnamoylado de D-glucosona.

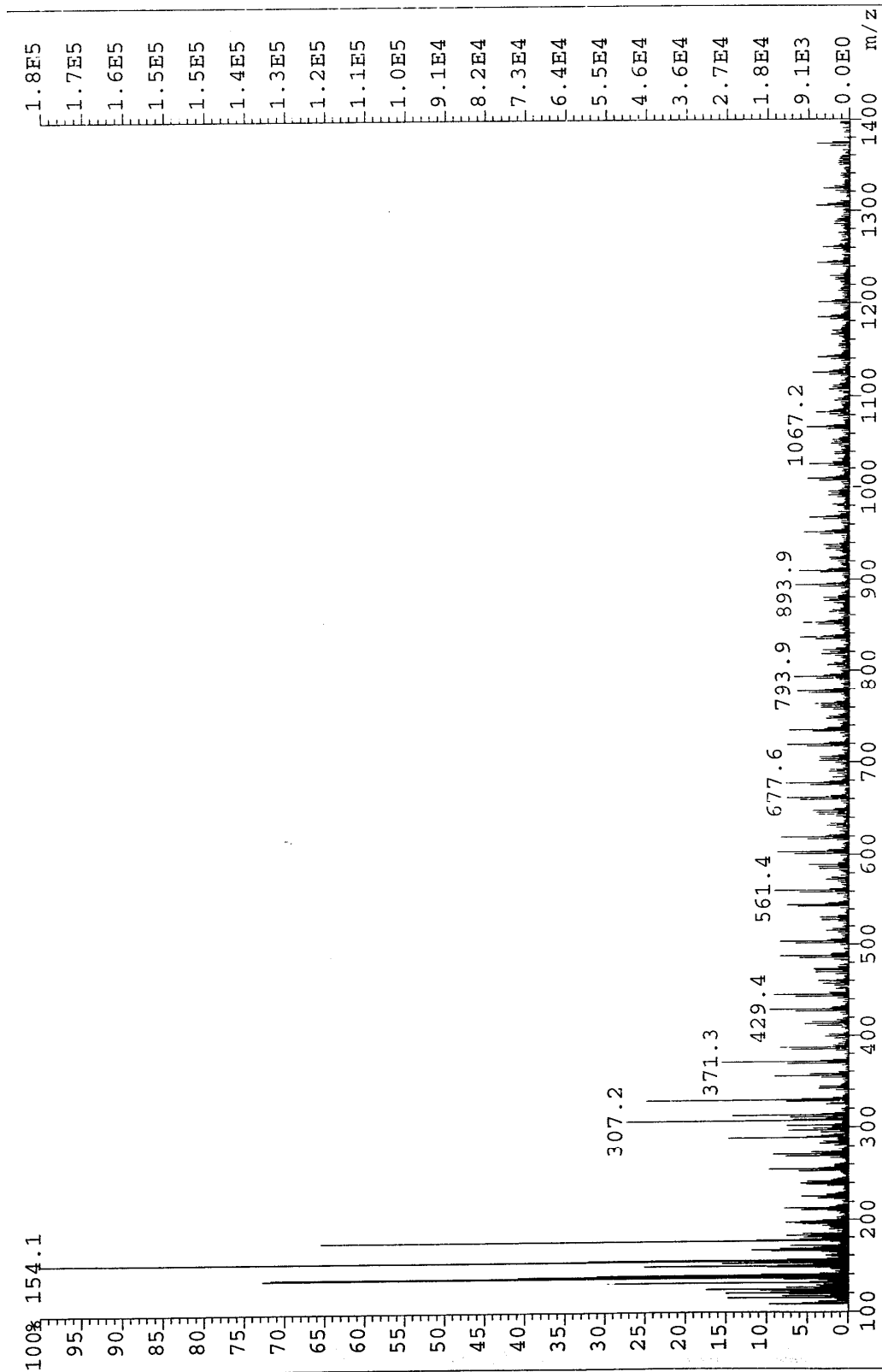


FIGURA A3.51

Espectro de masas (FAB⁺) del derivado totalmente cinamiloado de D-glucosona.

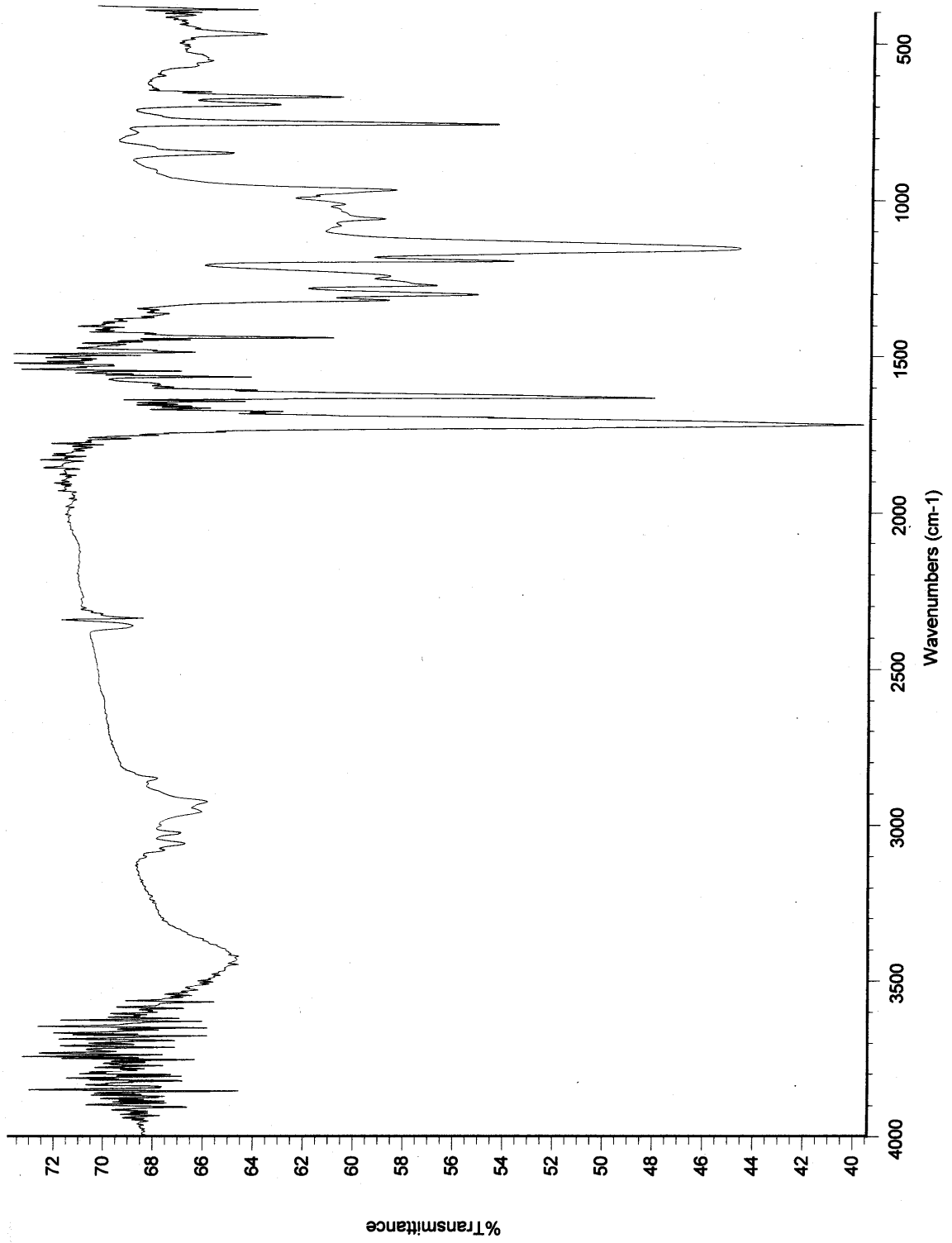


FIGURA A3.52

Espectro de ir. del derivado totalmente cinnamoylado de D-glucosona.

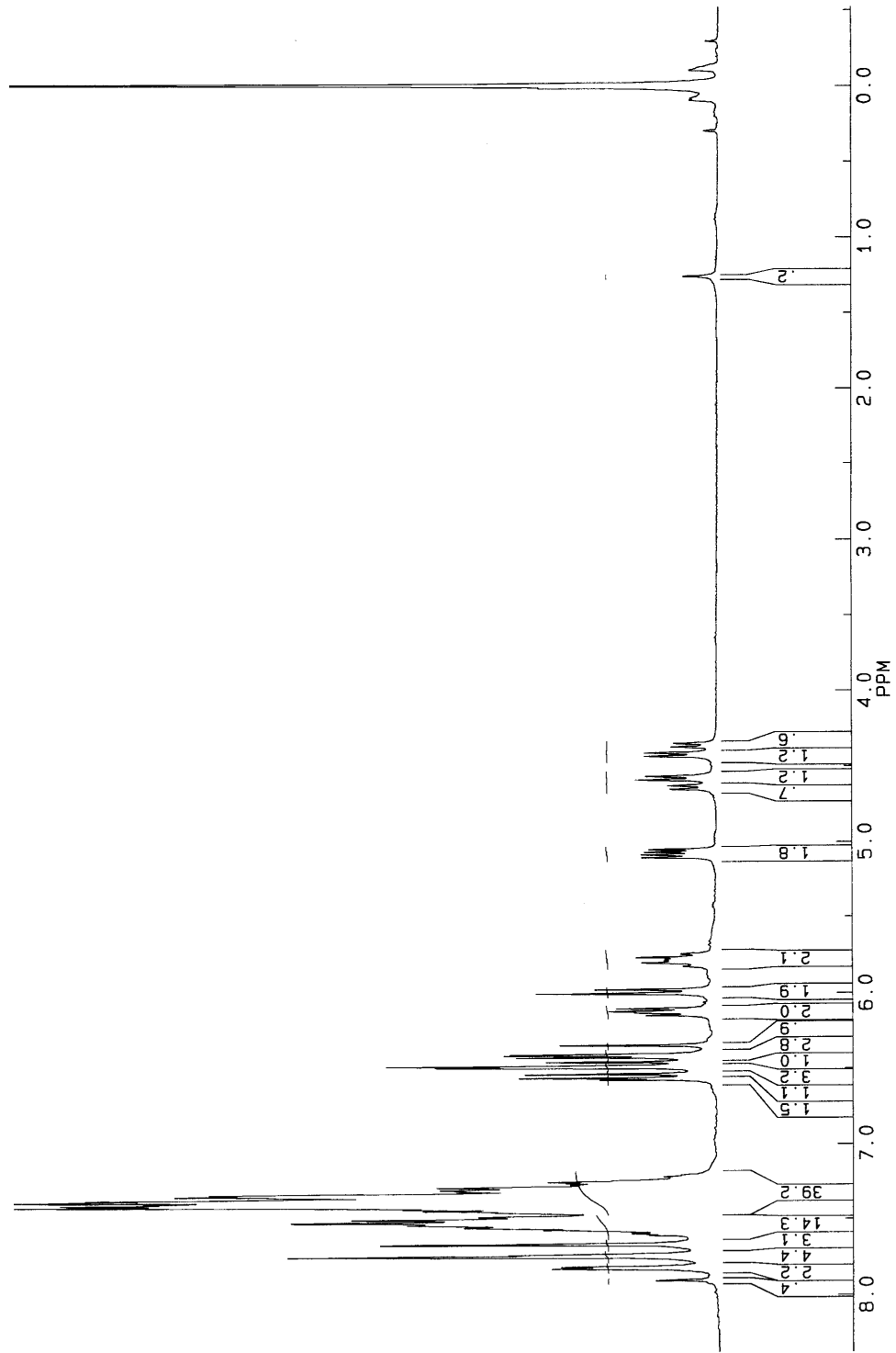


FIGURA A3.53

Espectro de ¹H r.m.n. del derivado totalmente cinnamoylado del ácido D-gulónico.

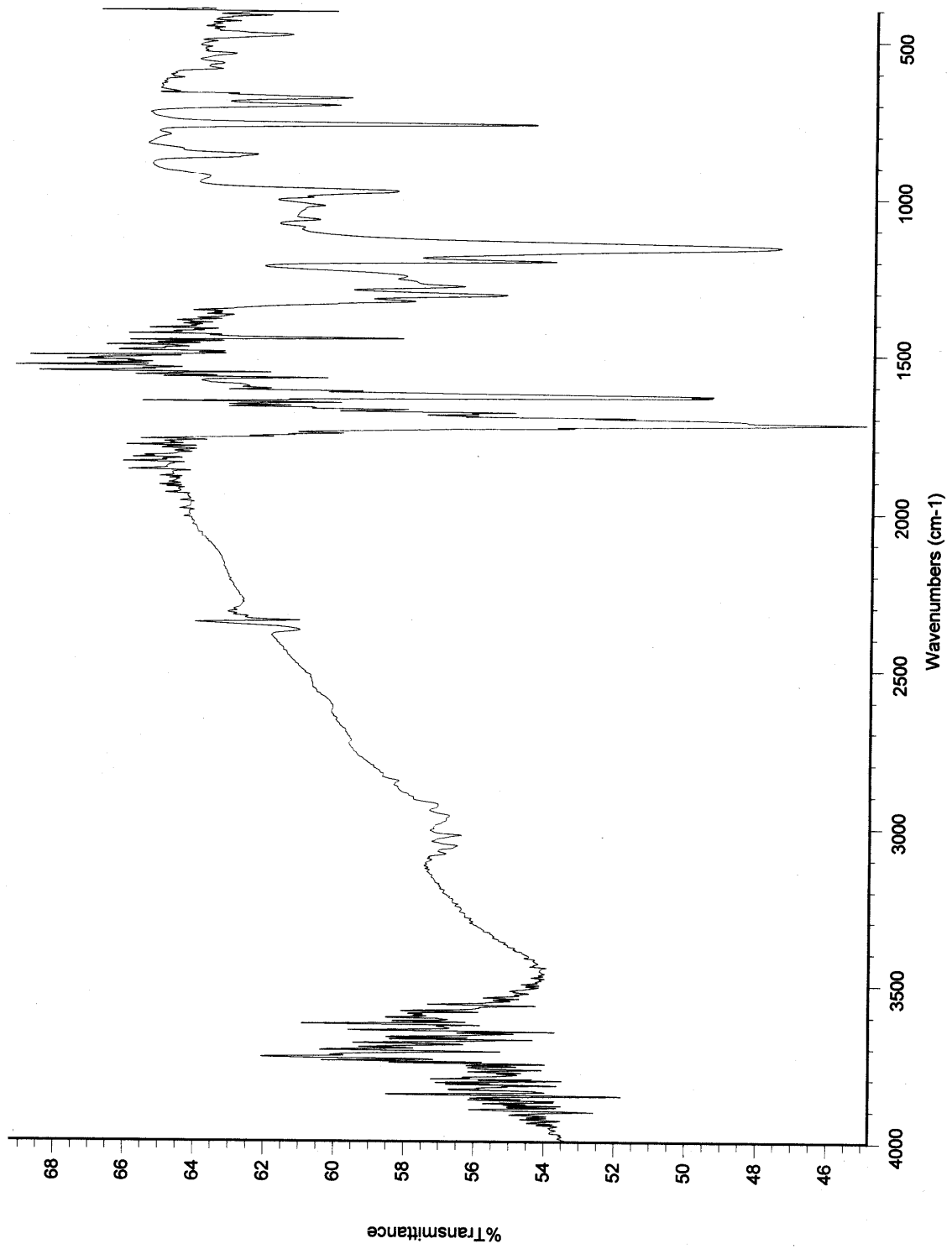


FIGURA A3.54

Espectro de ir. del derivado totalmente cinnamoylado del ácido D-gulónico.

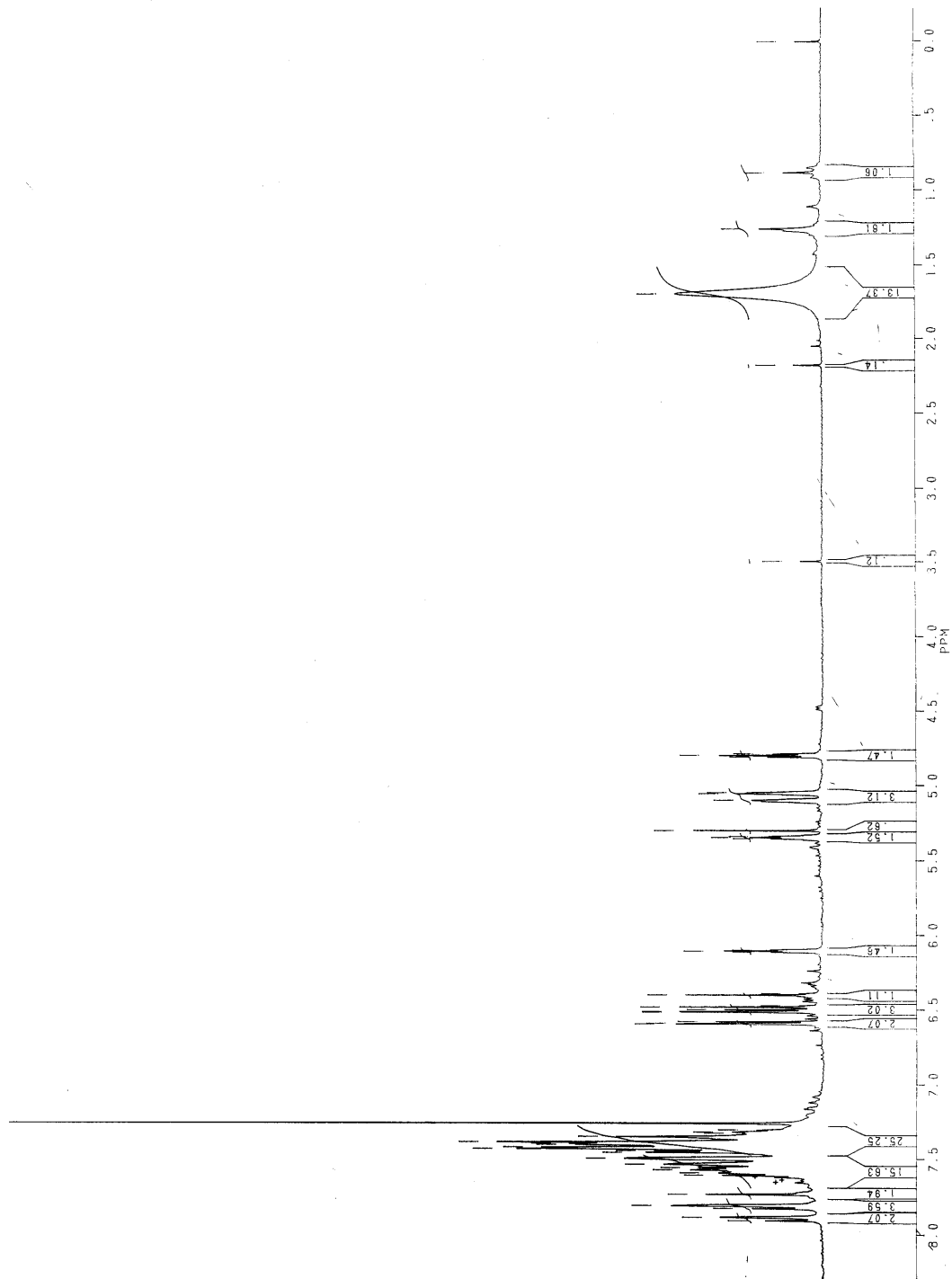


FIGURA A3.55

Espectro de ¹H r.m.n. del derivado totalmente cinamoilado del ácido D-glucurónico.
Contiene ácido cinámico como referencia.



FIGURA A3.56

**Espectro de ^{13}C r.m.n. del derivado totalmente cinnamoylado del ácido D-glucurónico.
Contiene ácido cinámico como referencia.**

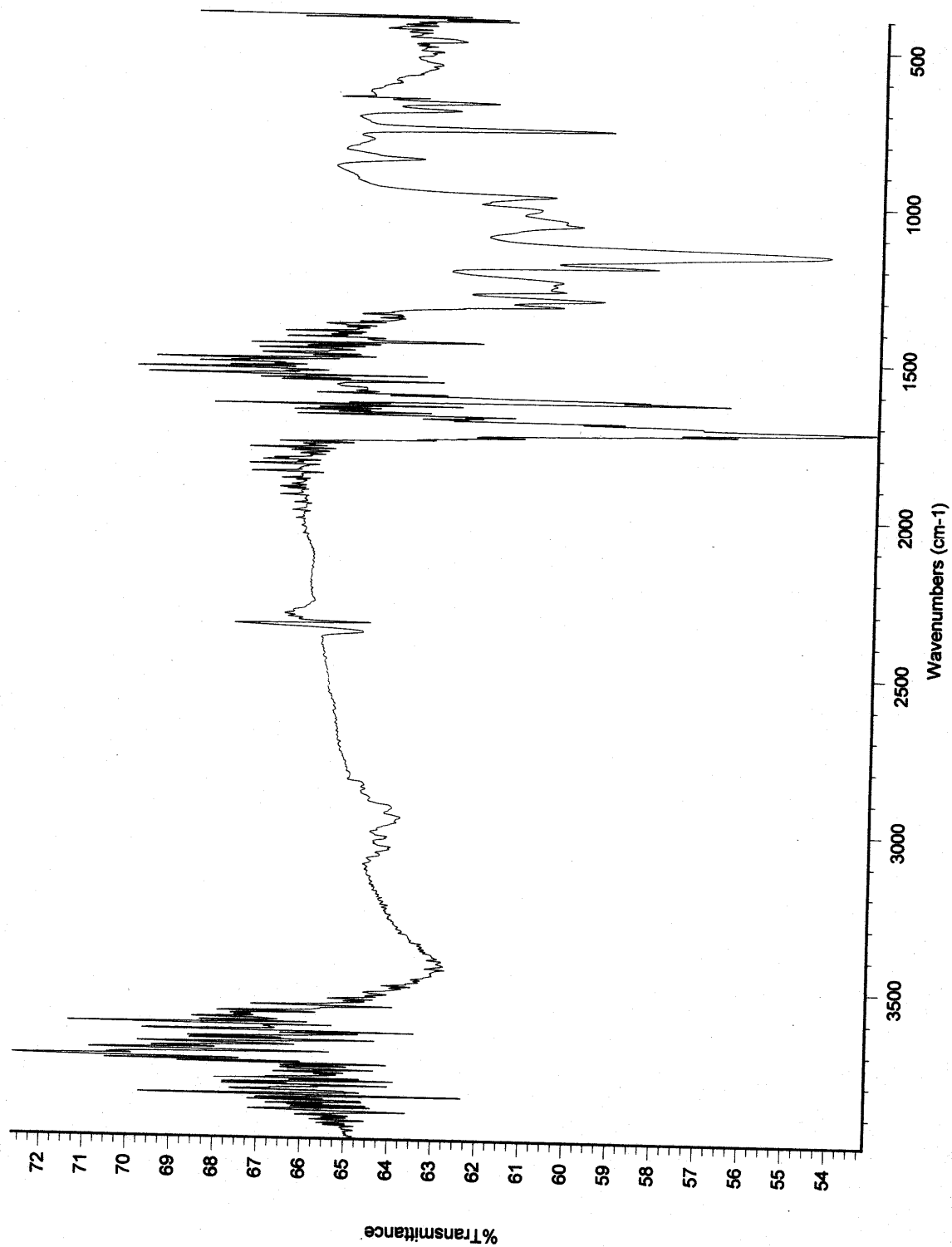


FIGURA A3.57

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado del ácido D-glucurónico.

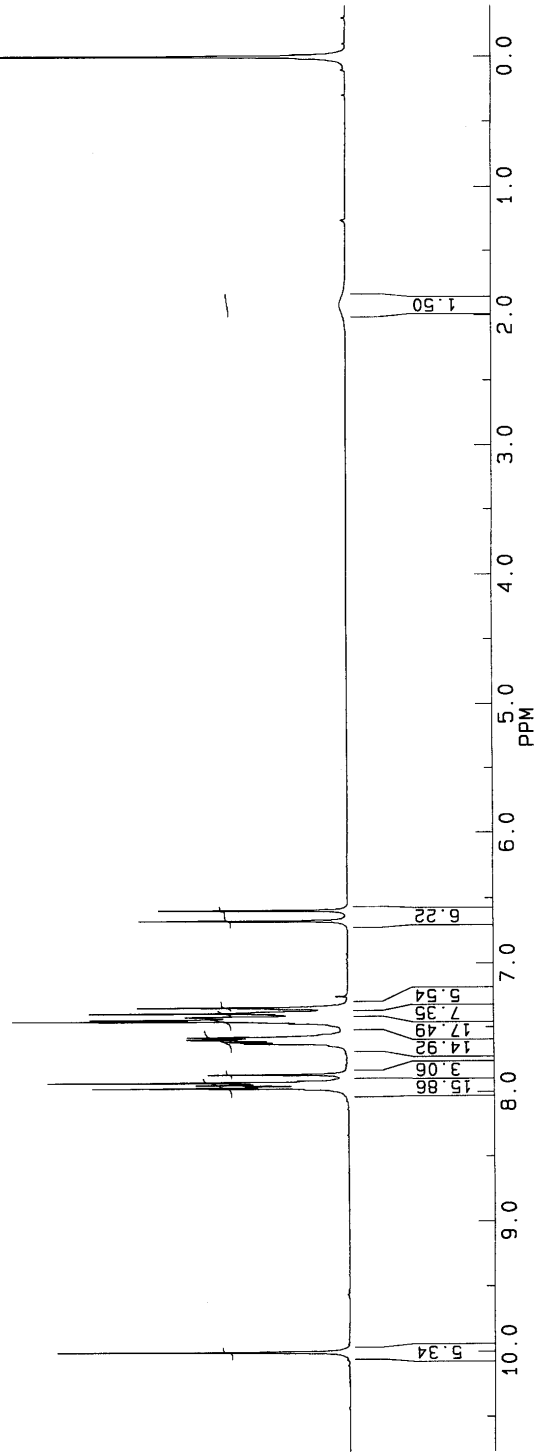


FIGURA A3.58

Espectro de ¹H r.m.n. del derivado totalmente metilado de *p*-hidroxibenzaldehído.

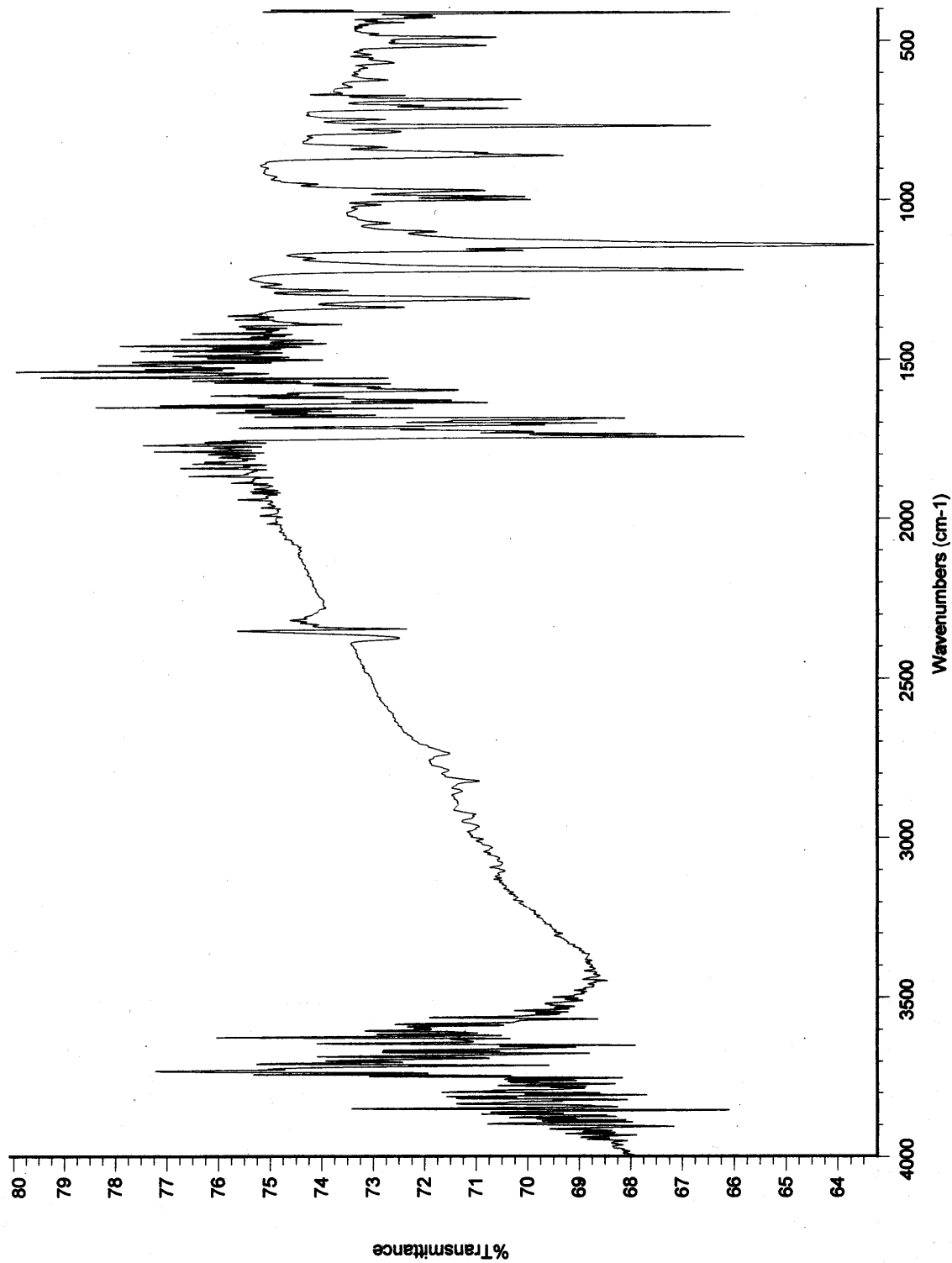


FIGURA A3.59

Espectro de ir. del derivado totalmente cinamoilado de *p*-hidroxibenzaldehído.

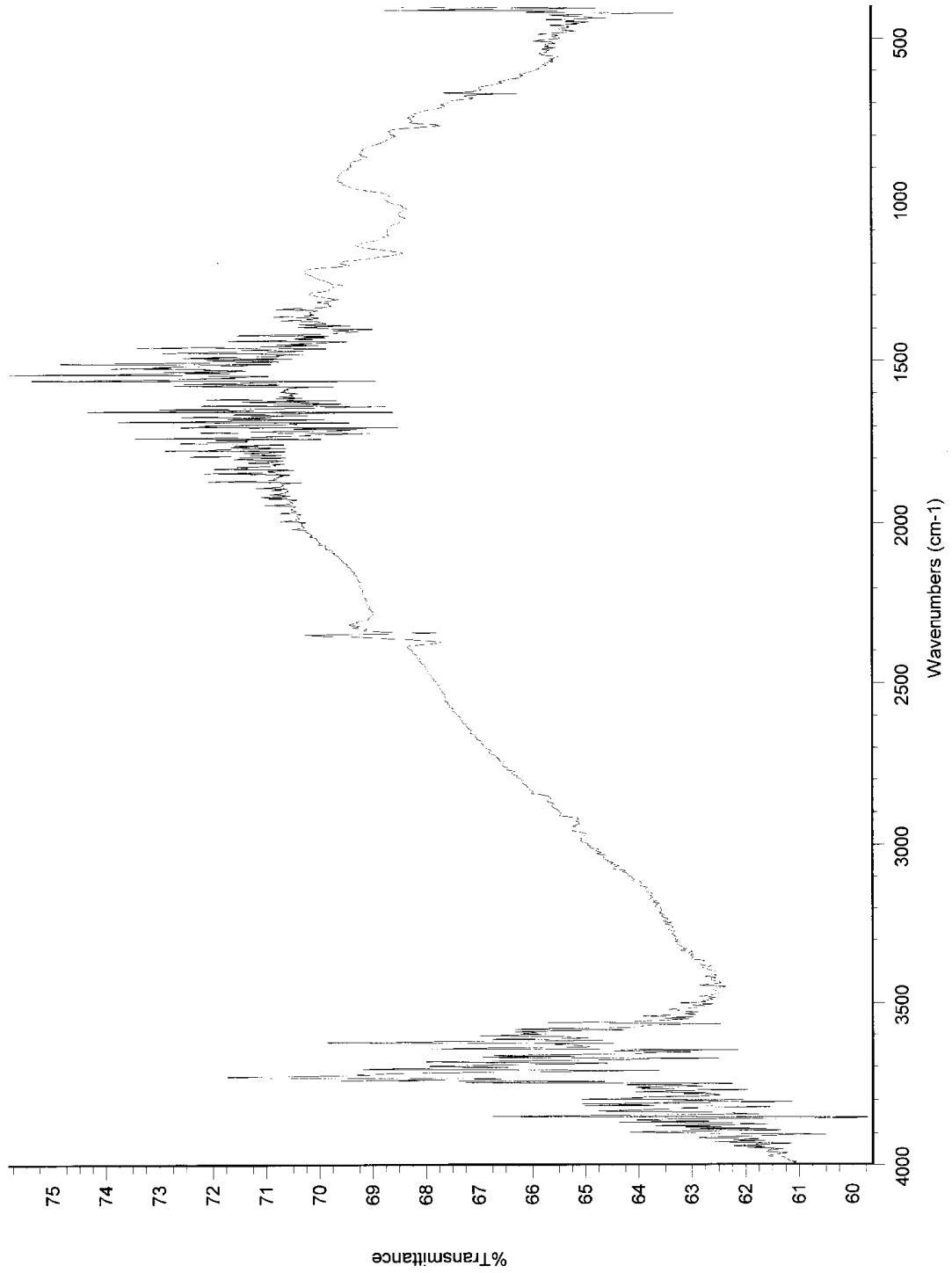


FIGURA A3.60

Espectro de ir. del derivado totalmente cinnamiloado de alcohol polivinílico.

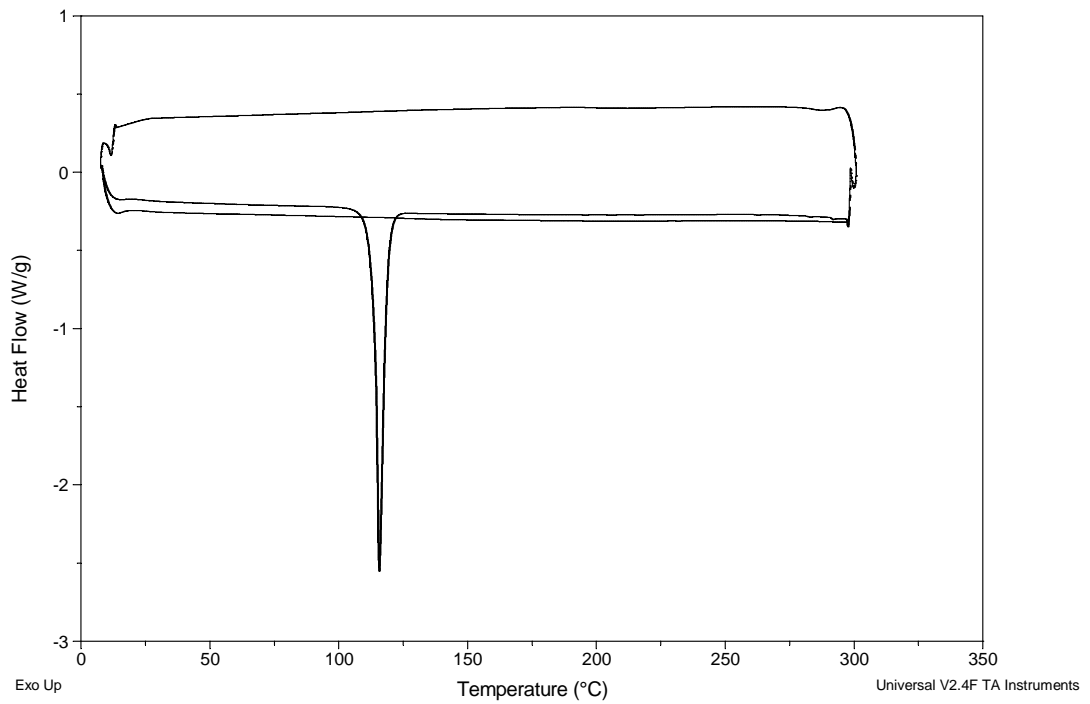


FIGURA A3.61

DSC del derivado totalmente cinamoilado de glicerina.

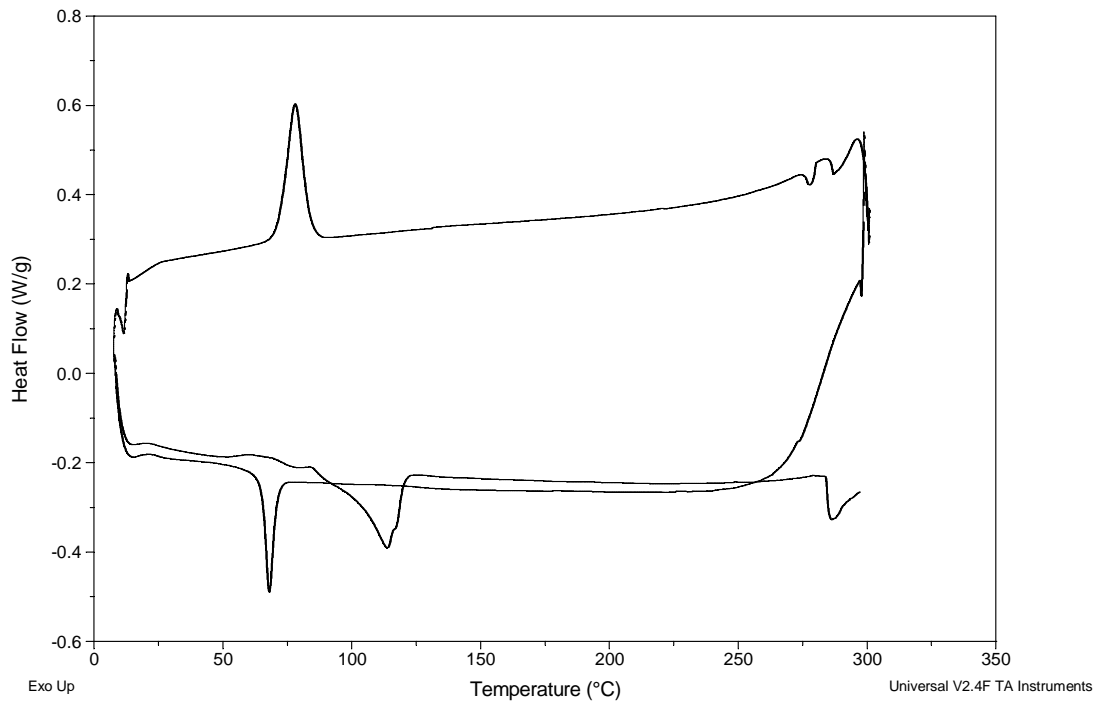


FIGURA A3.62

DSC del derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

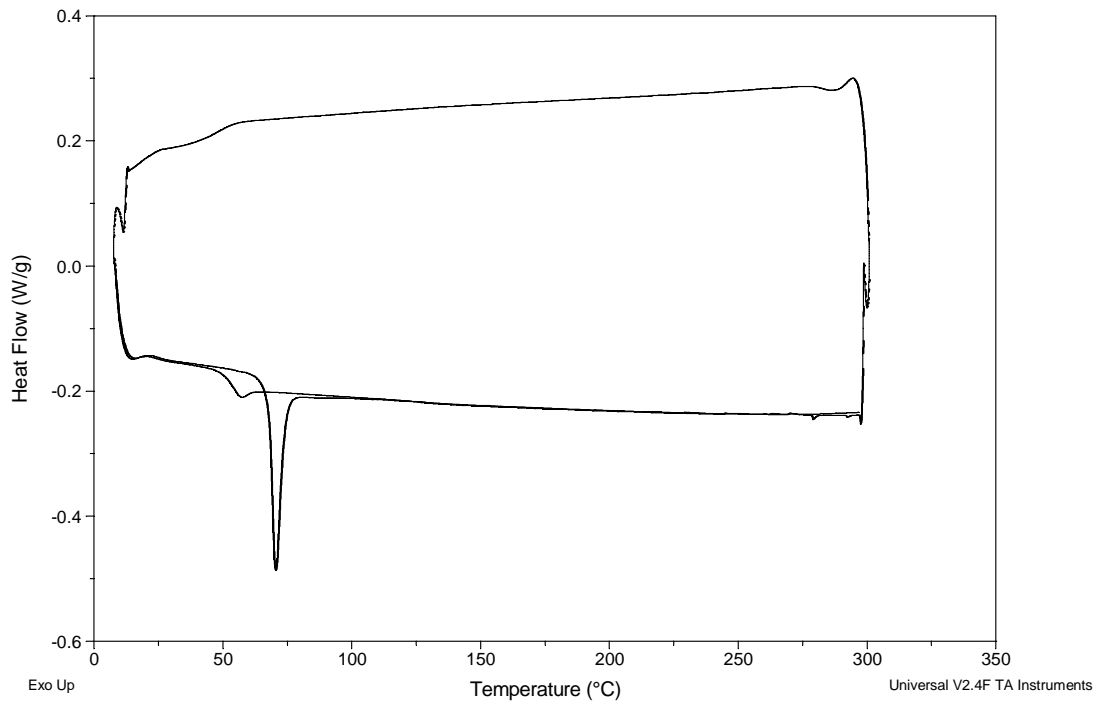


FIGURA A3.63

DSC del derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

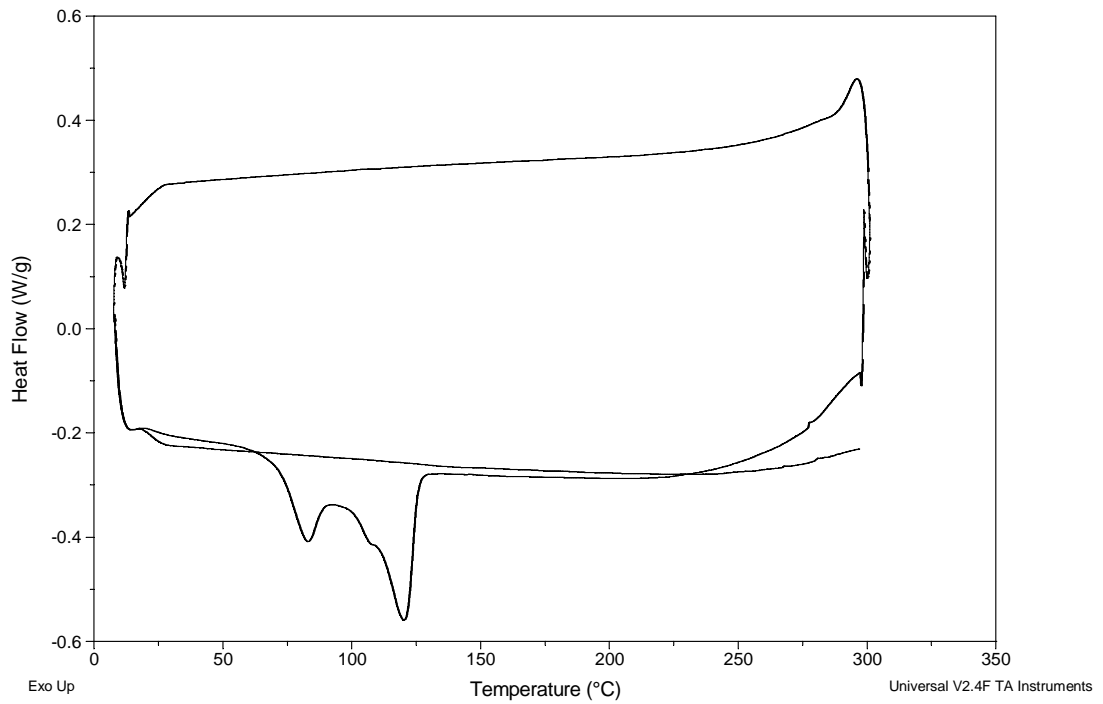


FIGURA A3.64

DSC del derivado totalmente cinamoilado de D-manitol.

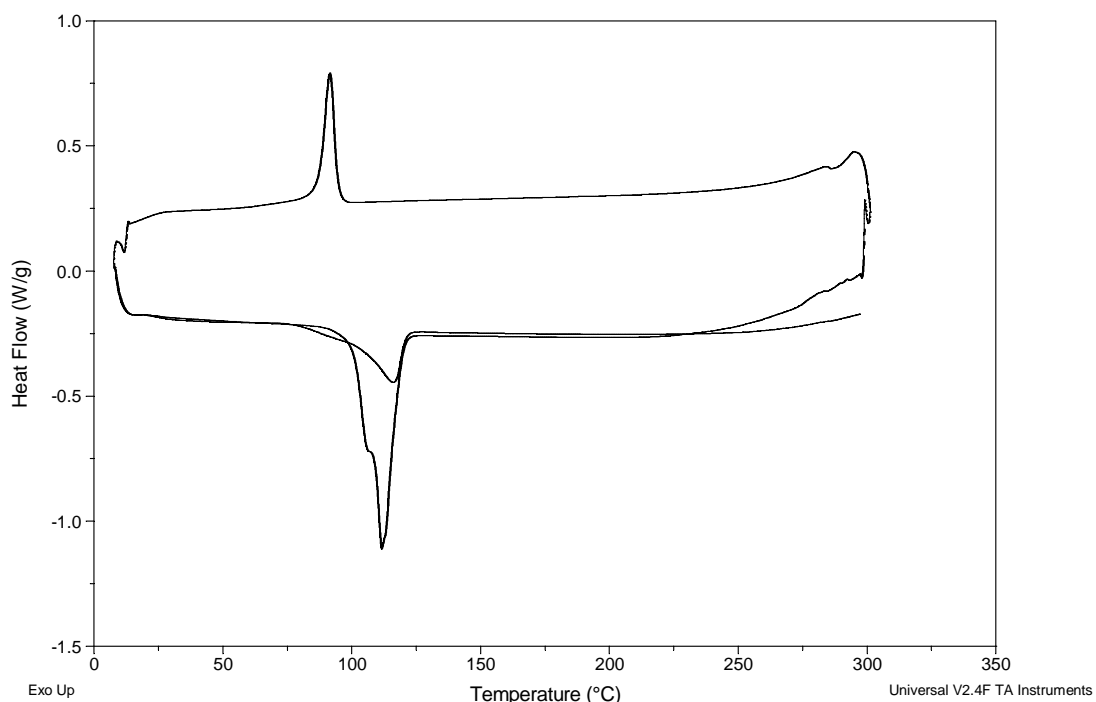


FIGURA A3.65

DSC del derivado totalmente cinamoilado de 1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa.

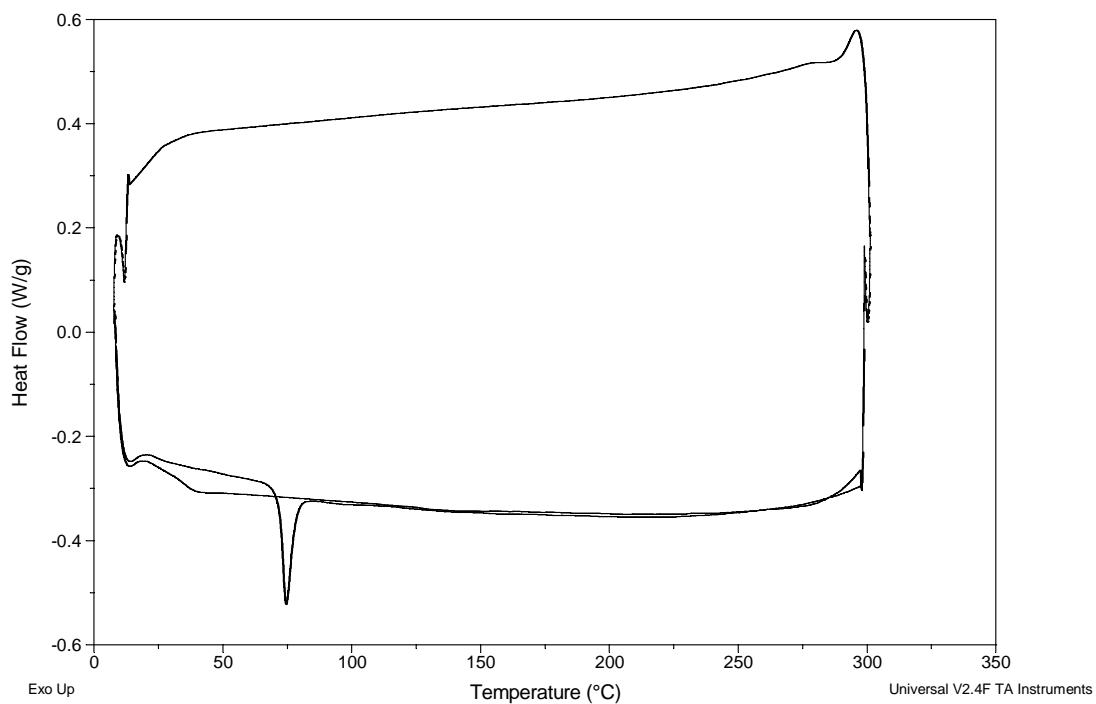


FIGURA A3.66

DSC del derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranósido.

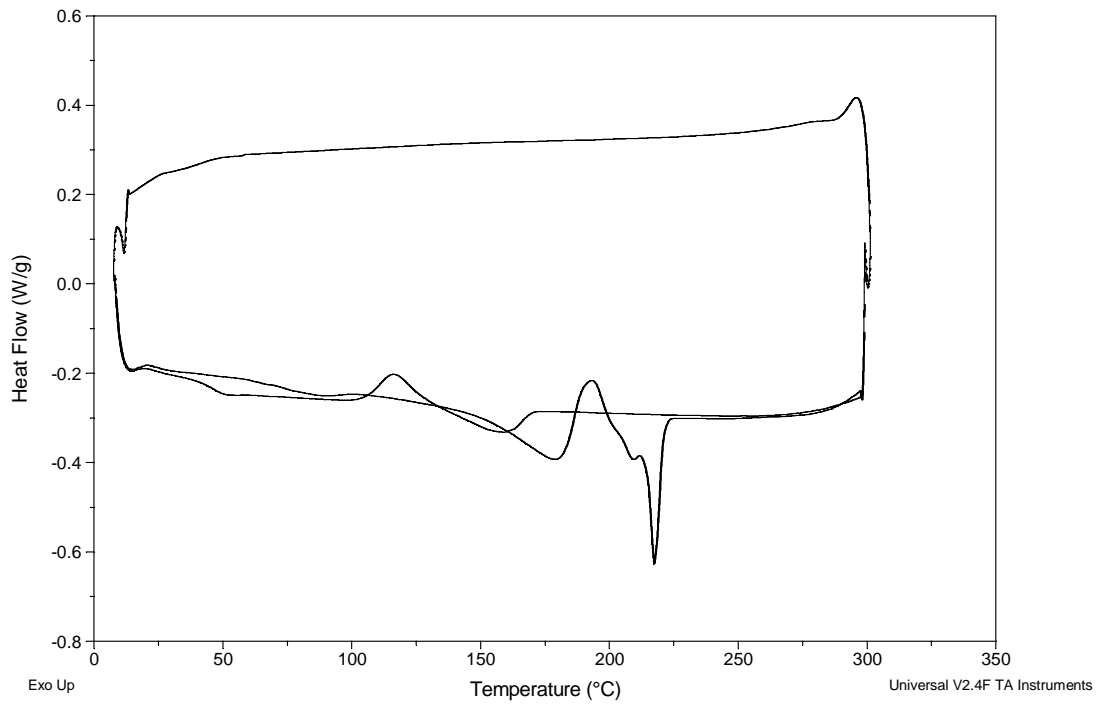


FIGURA A3.67

DSC del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

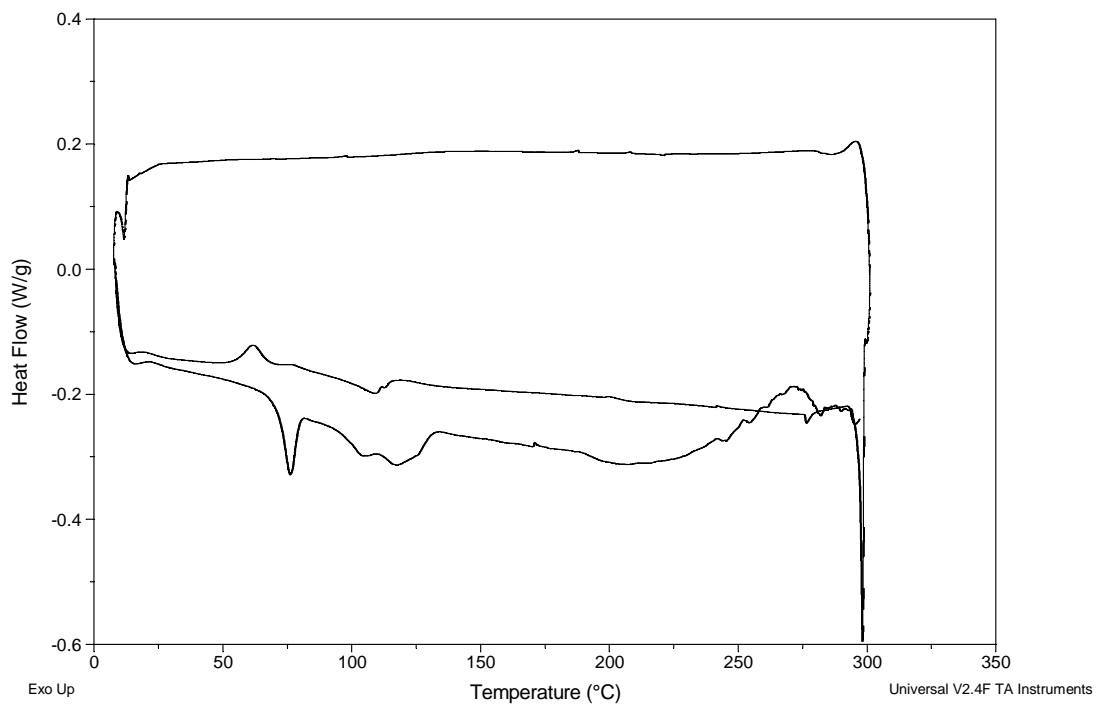


FIGURA A3.68

DSC del derivado totalmente cinamoilado de maltosa.

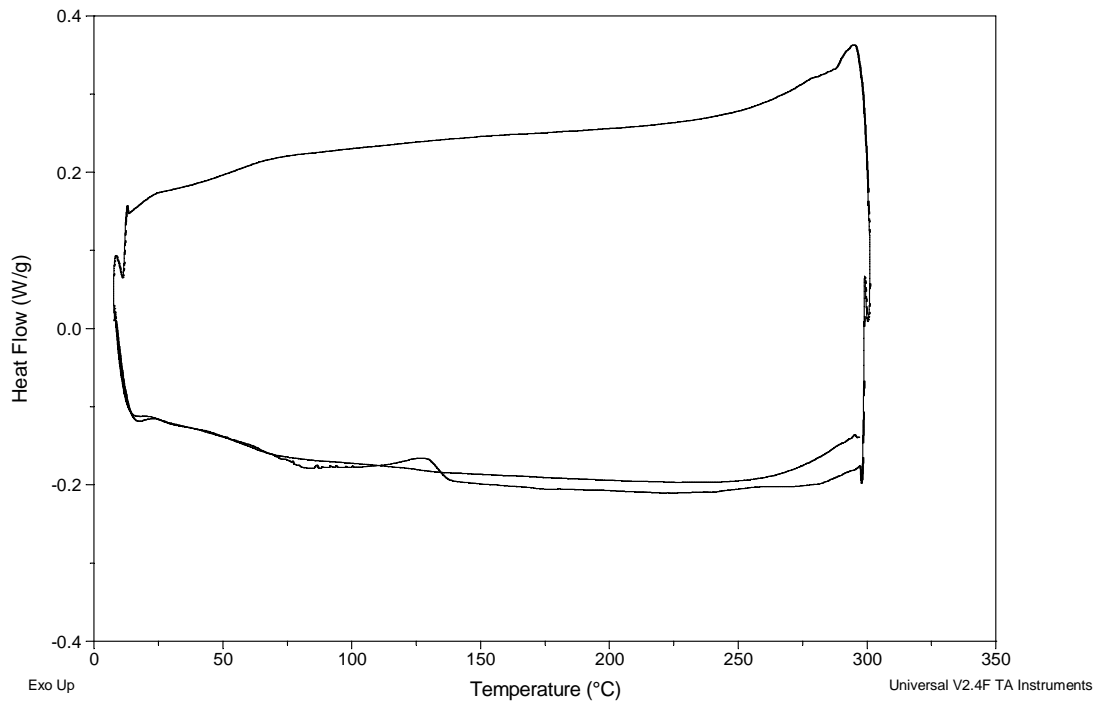


FIGURA A3.69

DSC del derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

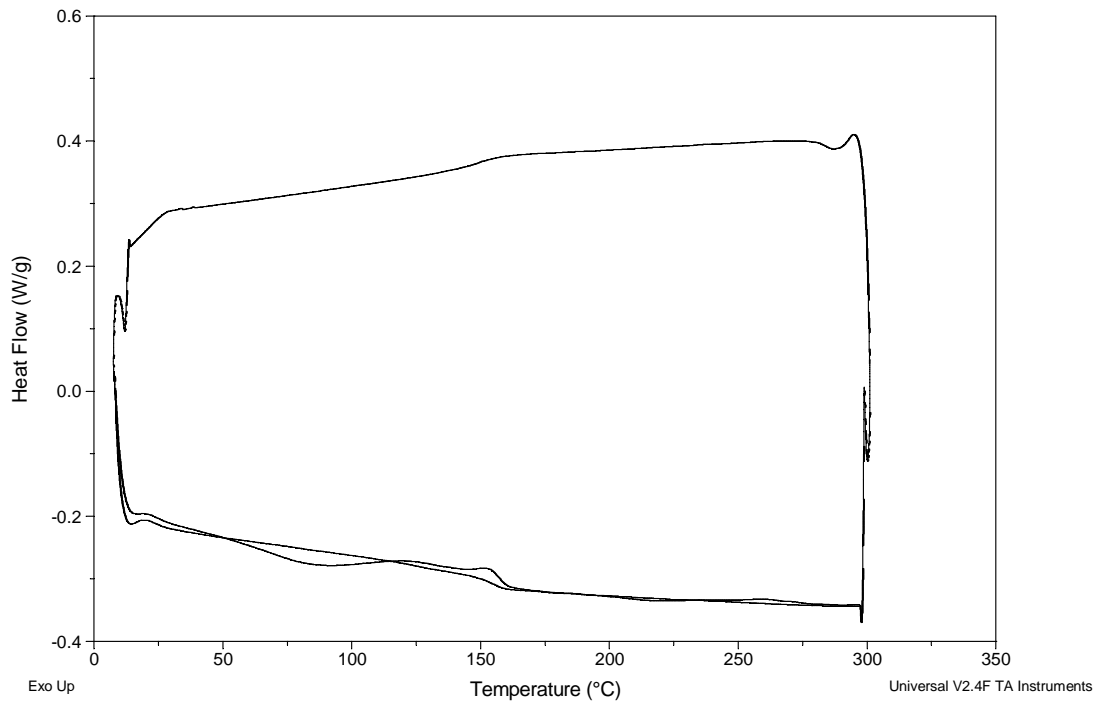


FIGURA A3.70

DSC del derivado totalmente cinamoilado de dextrano.

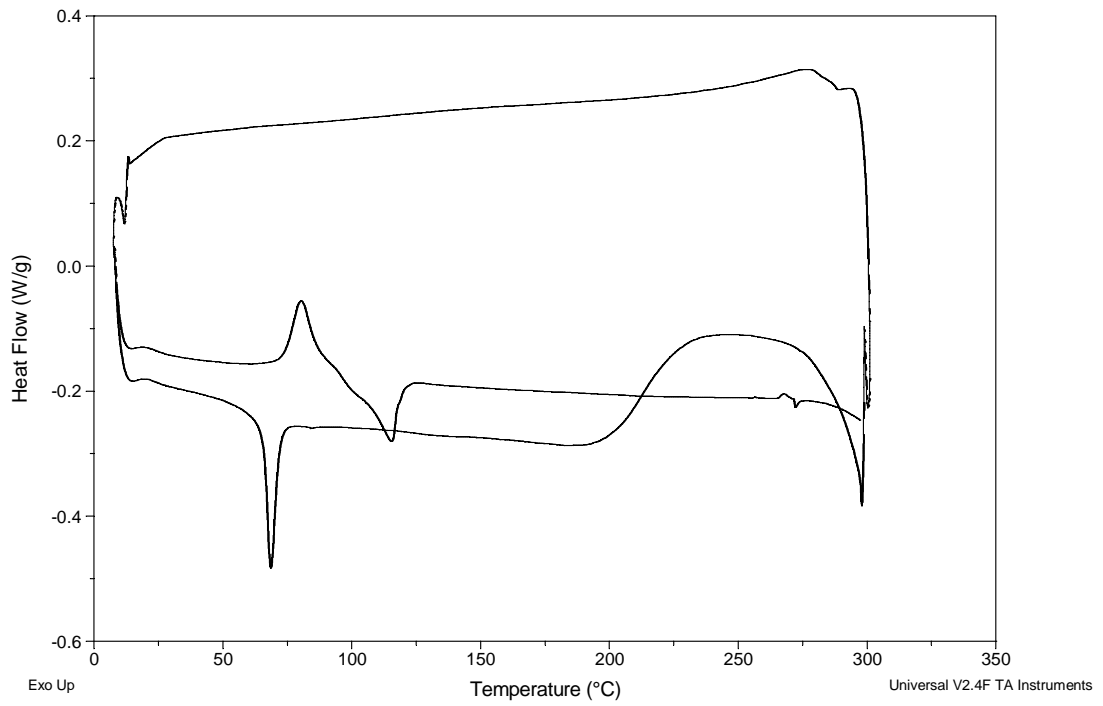


FIGURA A3.71

DSC del derivado totalmente cinamoilado de D-fructosa.

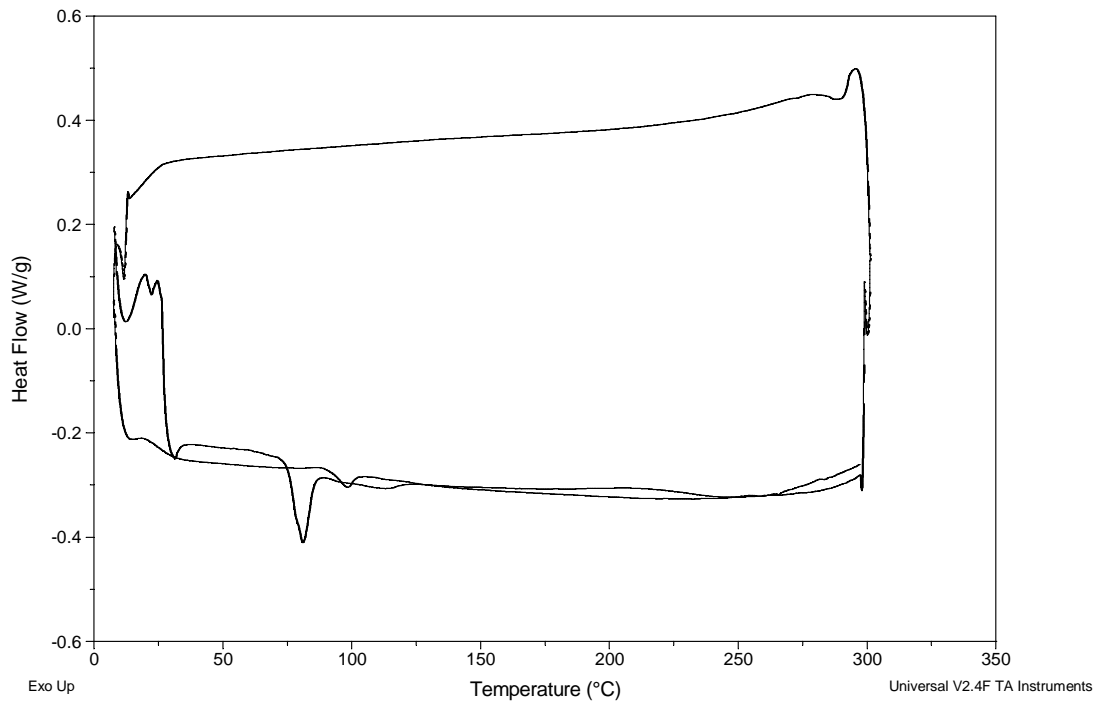


FIGURA A3.72

DSC del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

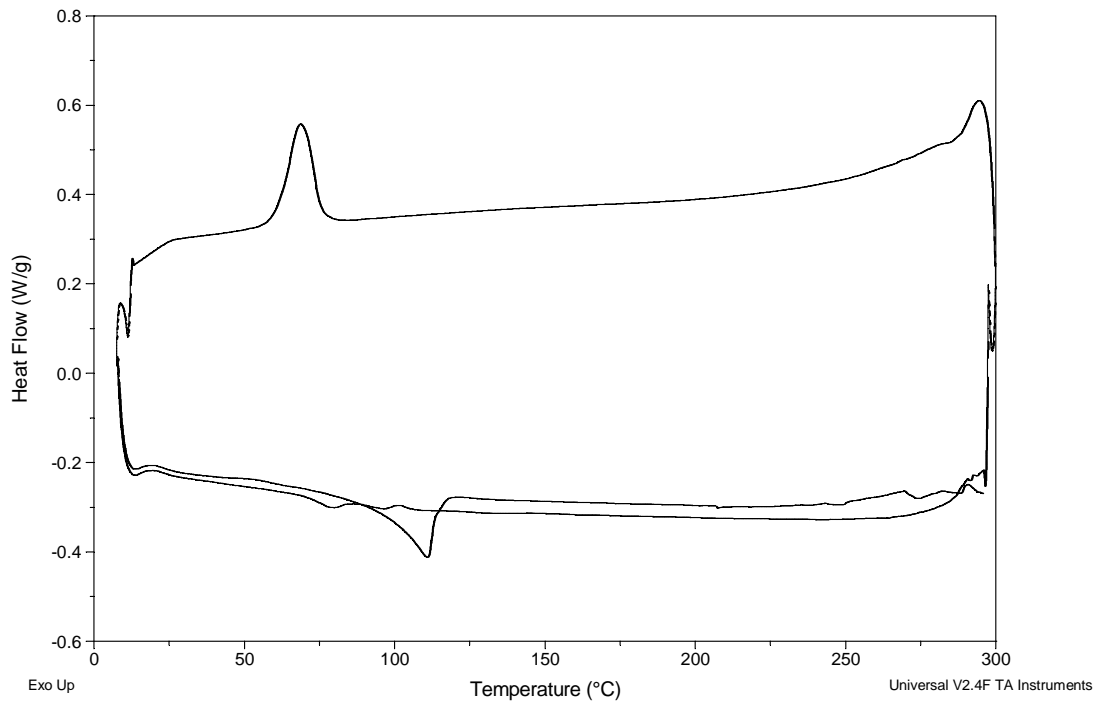


FIGURA A3.73

DSC del derivado totalmente cinamoilado de inulina.

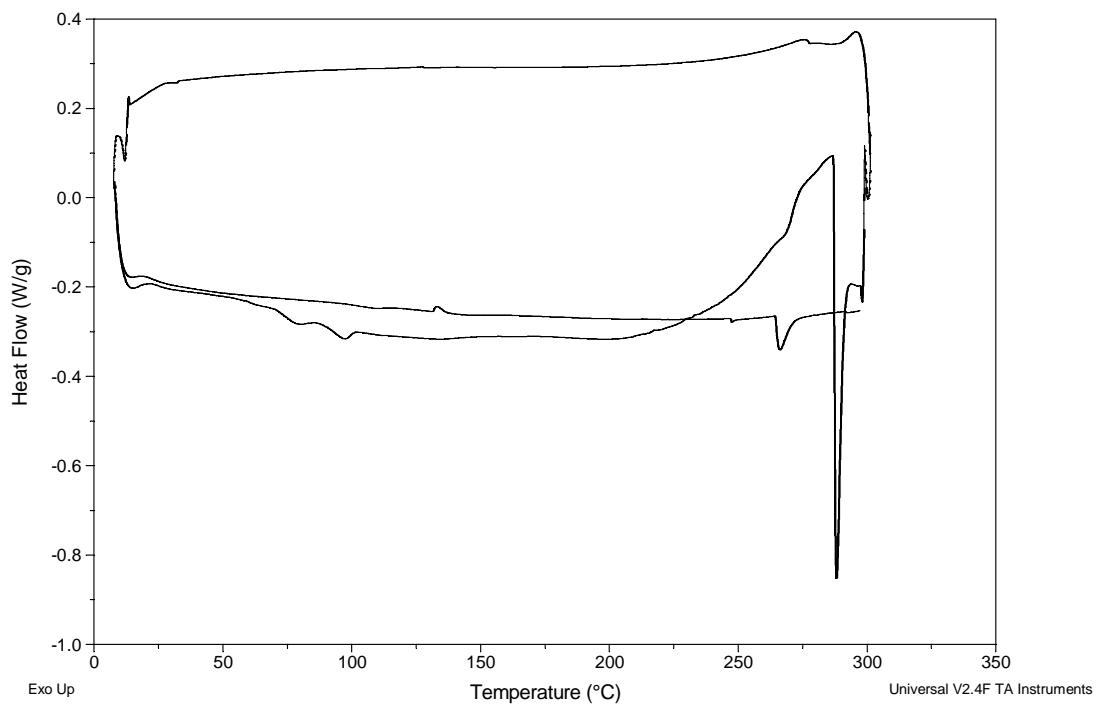


FIGURA A3.74

DSC del derivado de inulina cinamoilado un 49%.

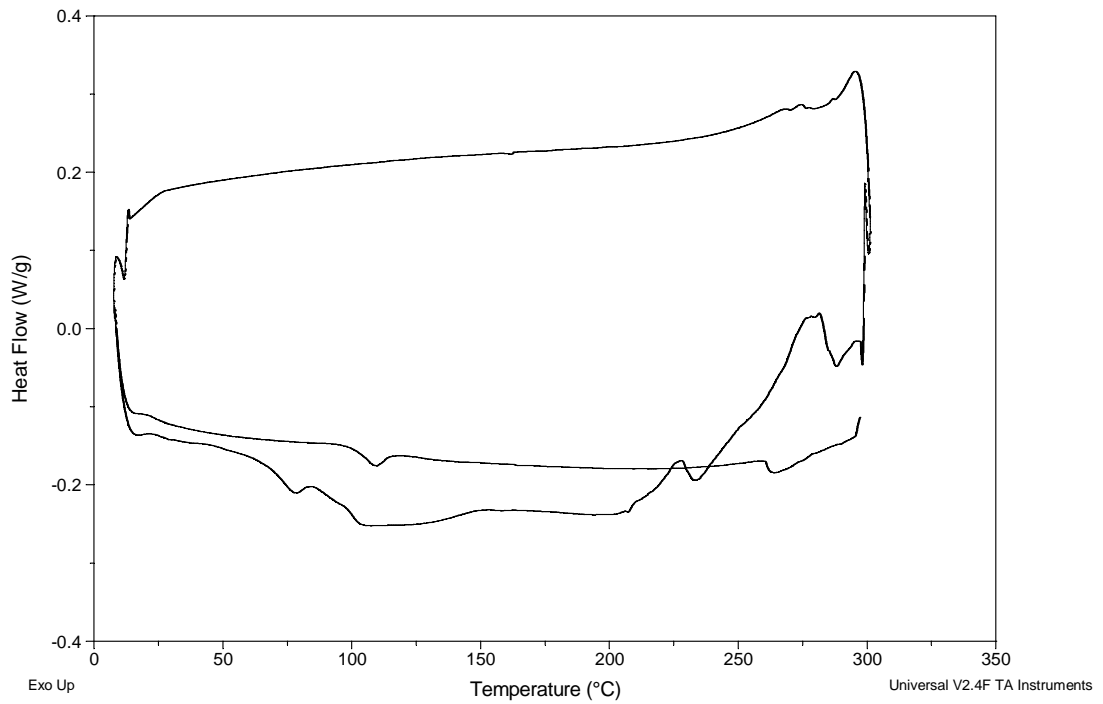


FIGURA A3.75

DSC del derivado de inulina cinamoilado un 41%.

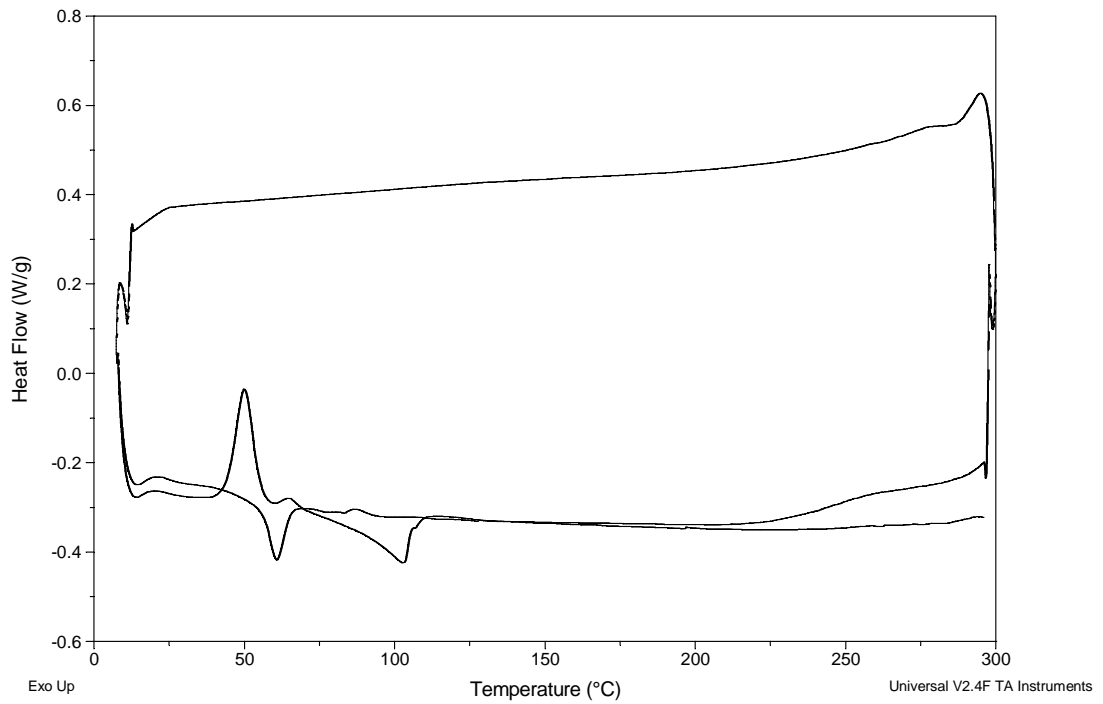


FIGURA A3.76

DSC del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

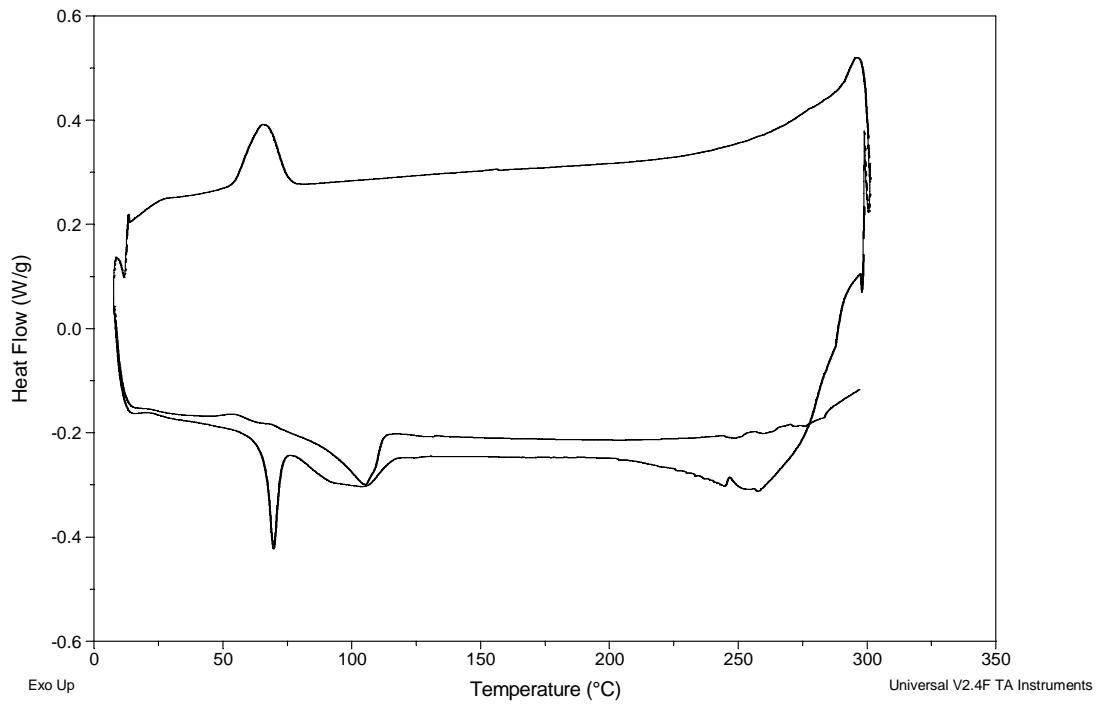


FIGURA A3.77

DSC del derivado totalmente cinamoilado del ácido D-gulónico.

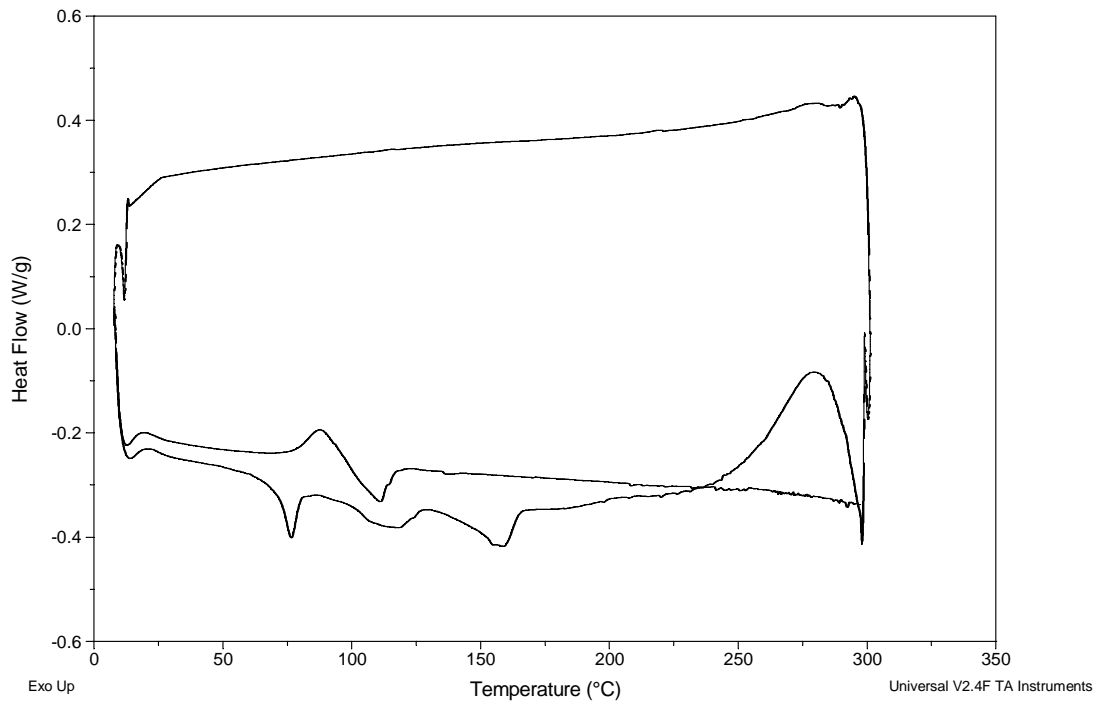


FIGURA A3.78

DSC del derivado totalmente cinamoilado del ácido D-glucurónico.

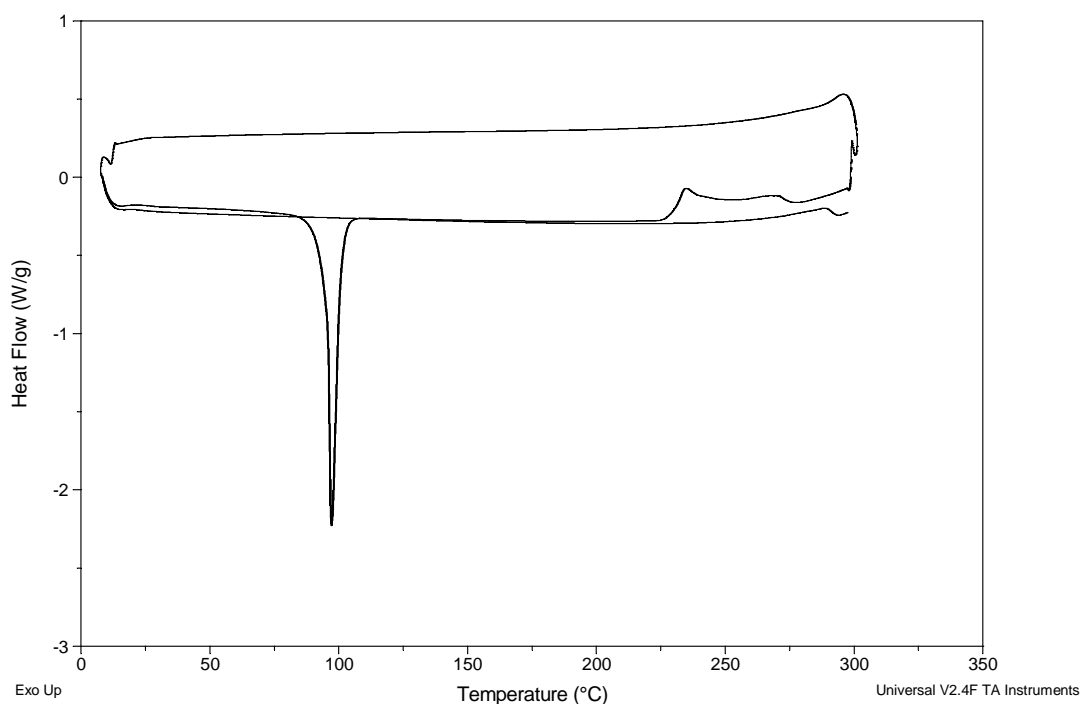


FIGURA A3.79

DSC del derivado totalmente cinamoilado de *p*-hidroxibenzaldehído.

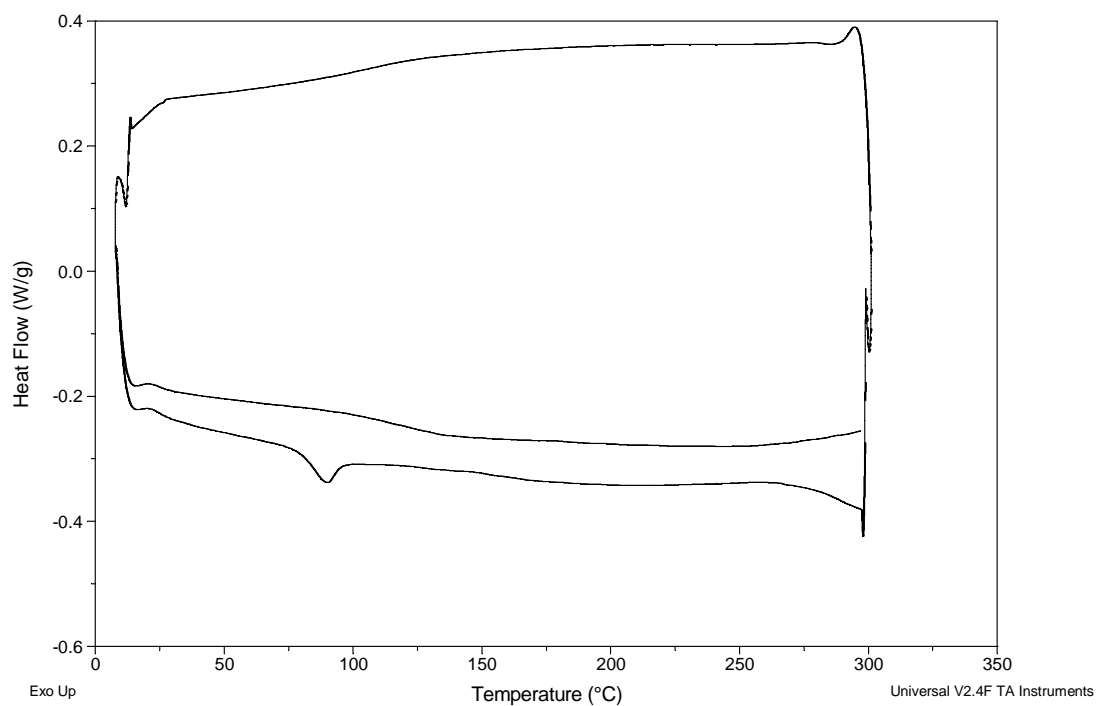


FIGURA A3.80

DSC del derivado totalmente cinamoilado de alcohol polivinílico.

TABLA A3.1

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de glicerina.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0
(s)	($\Delta A/\text{min}$)
0	0,151
10	0,188
16	0,218
40	0,213
80	0,260
100	0,307
140	0,288
300	0,244
600	0,228

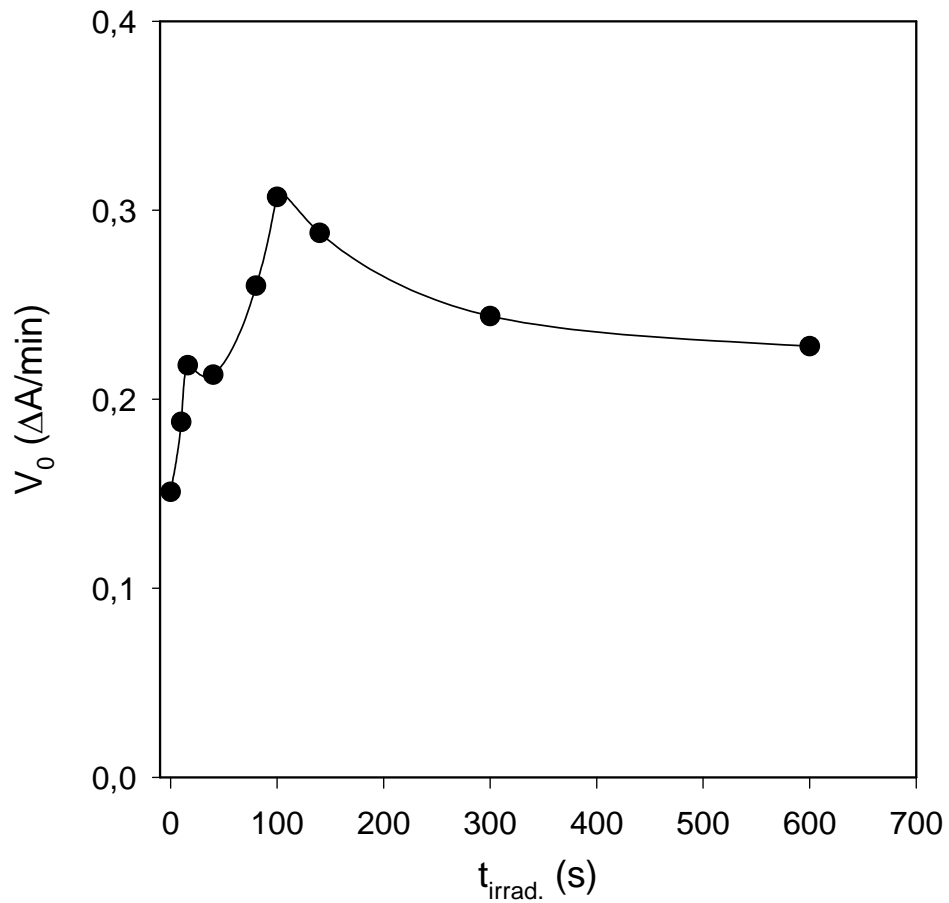


FIGURA A3.81

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de glicerina.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente al tiempo de irradiación, t_{irrad} (s).

TABLA A3.2

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de glicerina, tras un mes de almacenado.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0	V_f	R
(s)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	(%)
0	0,151	0,016	10,60
10	0,188	0,022	11,70
16	0,218	0,024	11,01
40	0,213	0,025	11,74
80	0,260	0,043	16,54
100	0,307	0,049	15,96
140	0,288	0,041	14,24
300	0,244	0,032	13,12
600	0,228	0,026	11,40

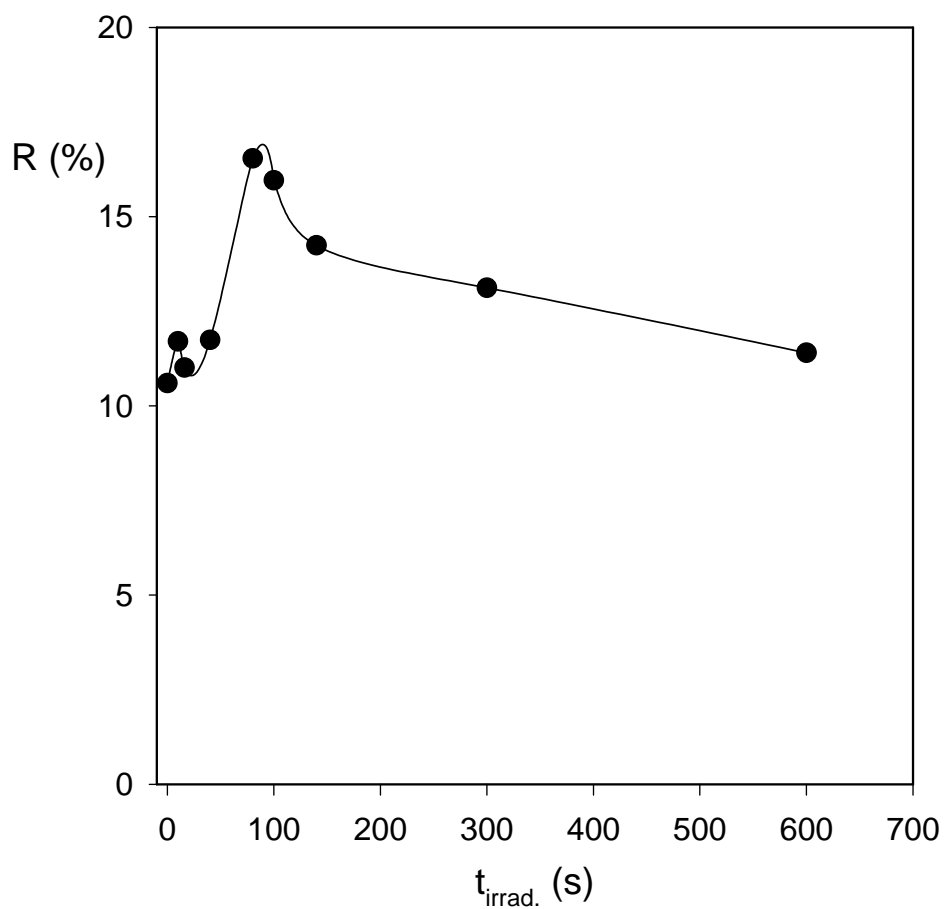


FIGURA A3.82
Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado
totalmente cinamoilado de glicerina, tras un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, R(%), frente al tiempo de irradiación, t_{irrad.} (s).

TABLA A3.3

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0
(s)	($\Delta A/\text{min}$)
0	2,018
10	2,488
16	2,612
40	1,853
80	1,767
100	1,444
140	1,934
300	1,249
600	0,726

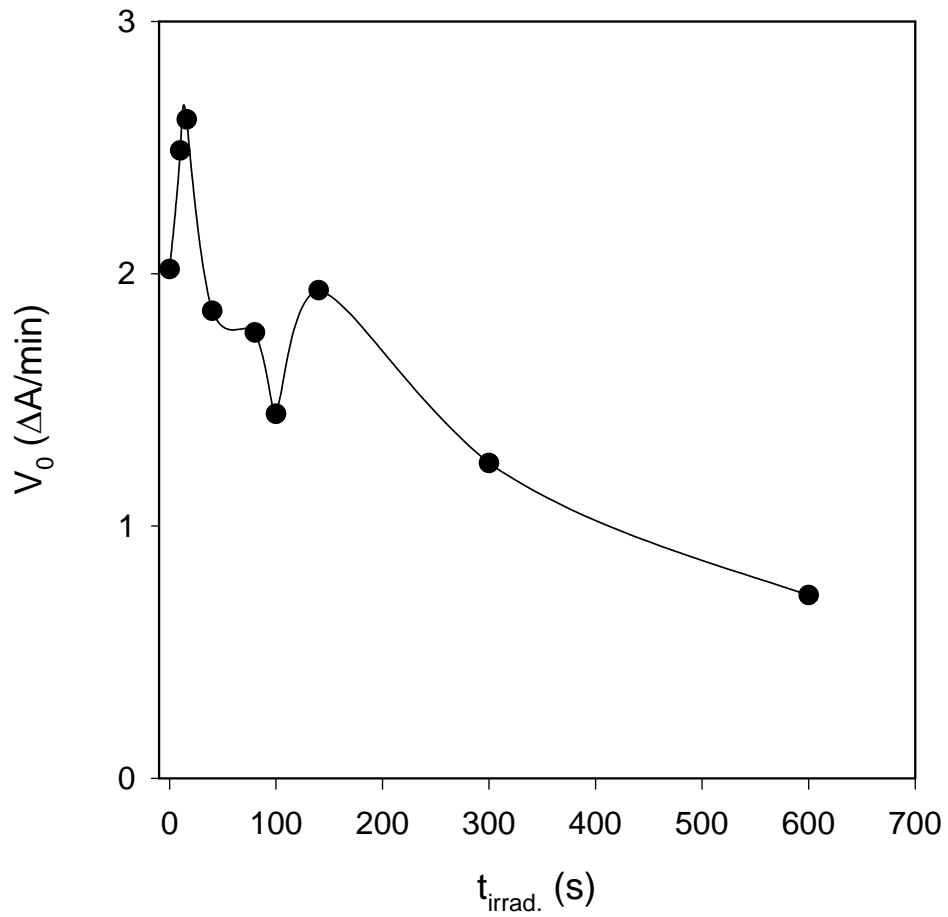


FIGURA A3.83

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta\text{A/min}$), frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}}$ (s).

TABLA A3.4

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa, tras un mes de almacenado.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0	V_f	R
(s)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	(%)
0	2,018	0,322	15,98
10	2,488	0,716	28,78
16	2,612	0,749	28,67
40	1,853	0,411	22,19
80	1,767	0,368	20,83
100	1,444	0,282	19,51
140	1,934	0,434	22,44
300	1,249	0,211	16,87
600	0,726	0,107	14,69

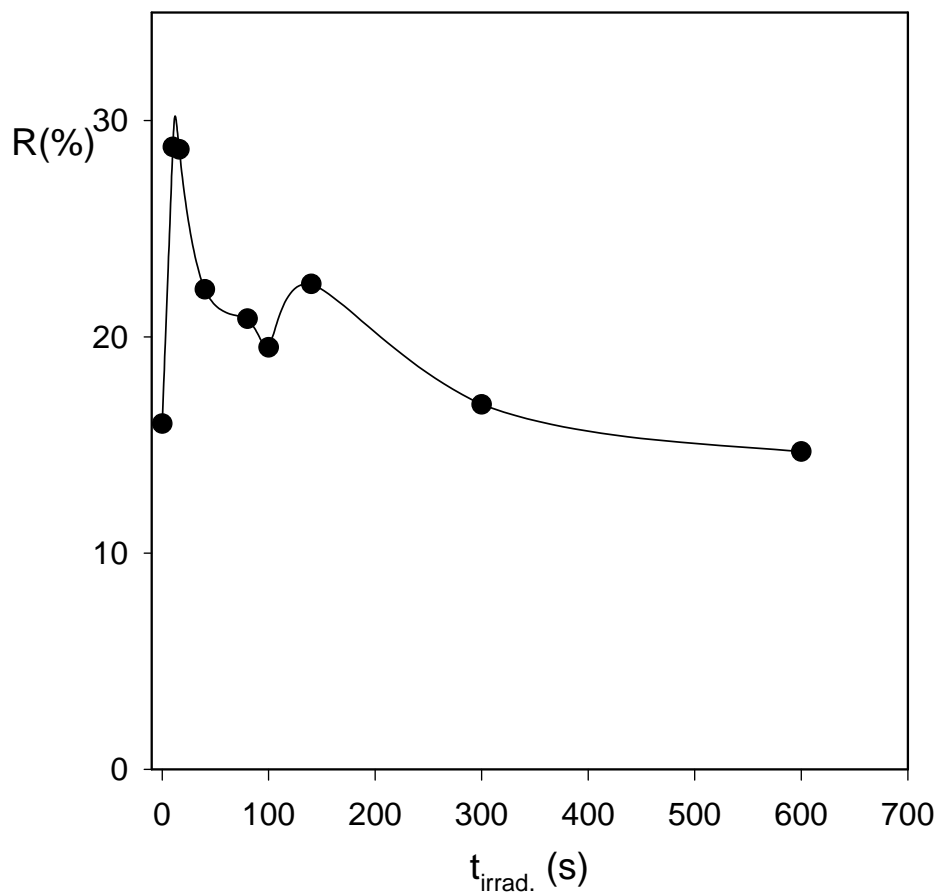


FIGURA A3.84

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa, tras un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, $R(\%)$, frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}} \text{ (s)}$.

TABLA A3.5

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0
(s)	($\Delta A/\text{min}$)
0	1,144
10	1,348
16	1,042
40	1,352
80	1,305
140	0,824
300	0,802
600	0,467

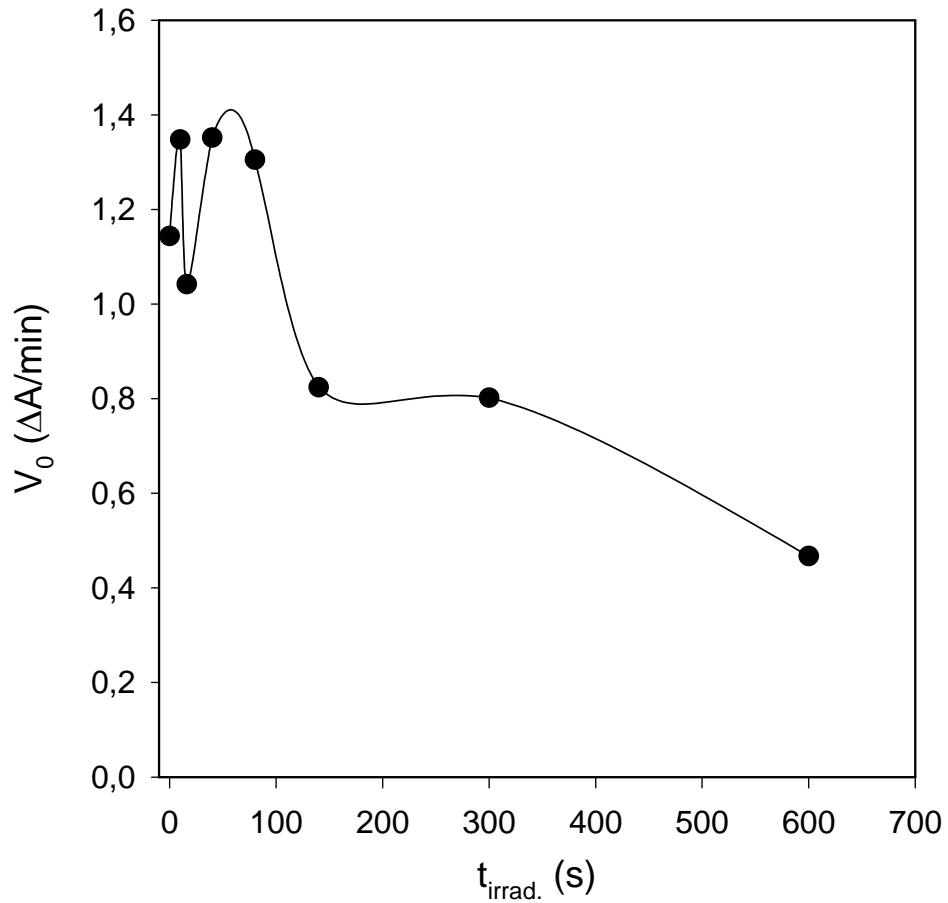


FIGURA A3.85

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta\text{A/min}$), frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}}$ (s).

TABLA A3.6

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, tras un mes de almacenado.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0	V_f	R
(s)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	(%)
0	1,144	0,377	32,93
10	1,348	0,695	51,59
16	1,042	0,371	35,56
40	1,352	0,645	47,67
80	1,305	0,549	42,06
140	0,824	0,258	31,35
300	0,802	0,224	27,97
600	0,467	0,107	22,88

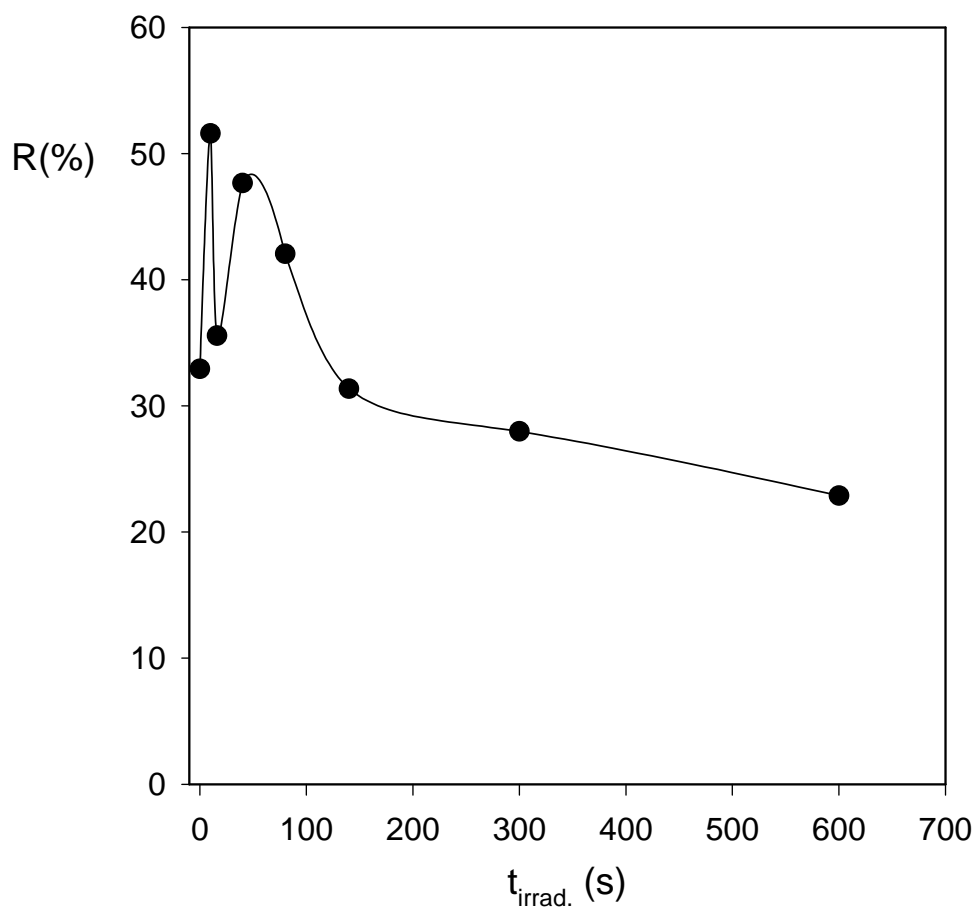


FIGURA A3.86

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona, tras un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, $R(\%)$, frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}} \text{ (s)}$.

TABLA A3.7

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0
(s)	($\Delta A/\text{min}$)
0	3,186
10	2,023
16	1,739
40	1,995
80	1,493
100	1,290
140	1,254
300	1,089
600	0,658

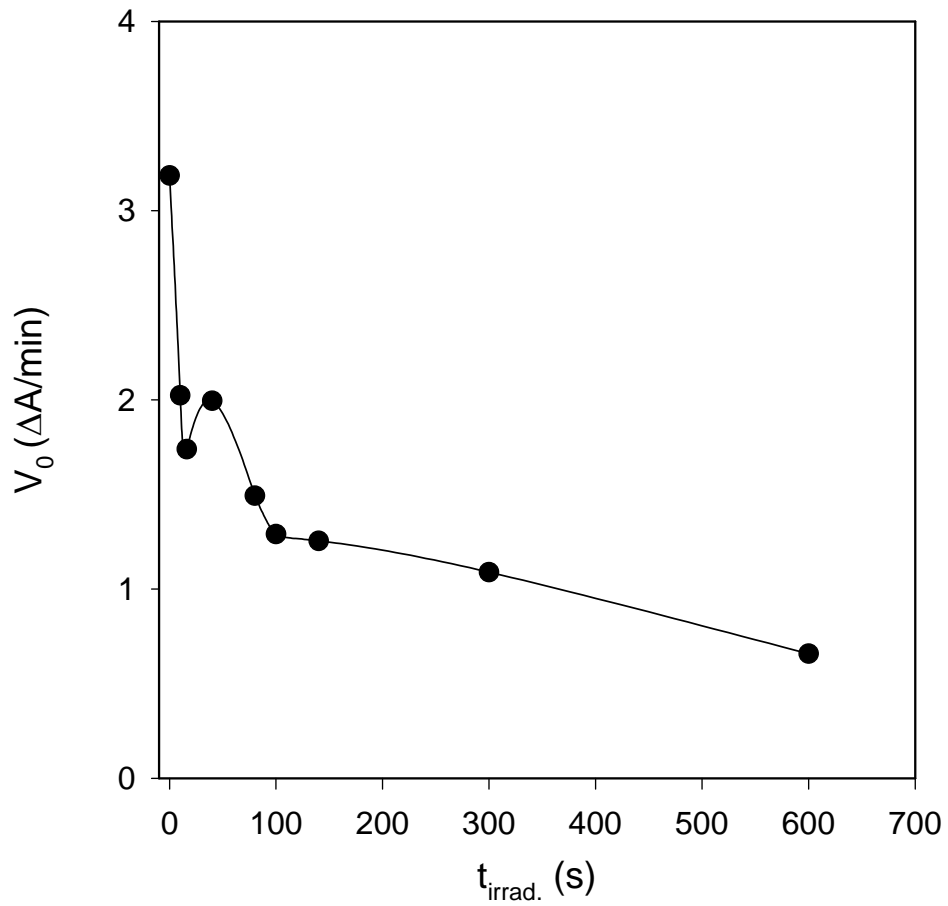


FIGURA A3.87

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta\text{A/min}$), frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}}$ (s).

TABLA A3.8
Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado
totalmente cinamoilado de sacarosa, tras un mes de almacenado.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0	V_f	R
(s)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	(%)
0	3,186	0,990	31,08
10	2,023	0,594	29,36
16	1,739	0,449	25,84
40	1,995	0,673	33,72
80	1,493	0,444	29,76
100	1,290	0,335	25,98
140	1,254	0,340	27,13
300	1,089	0,256	23,54
600	0,658	0,122	18,53

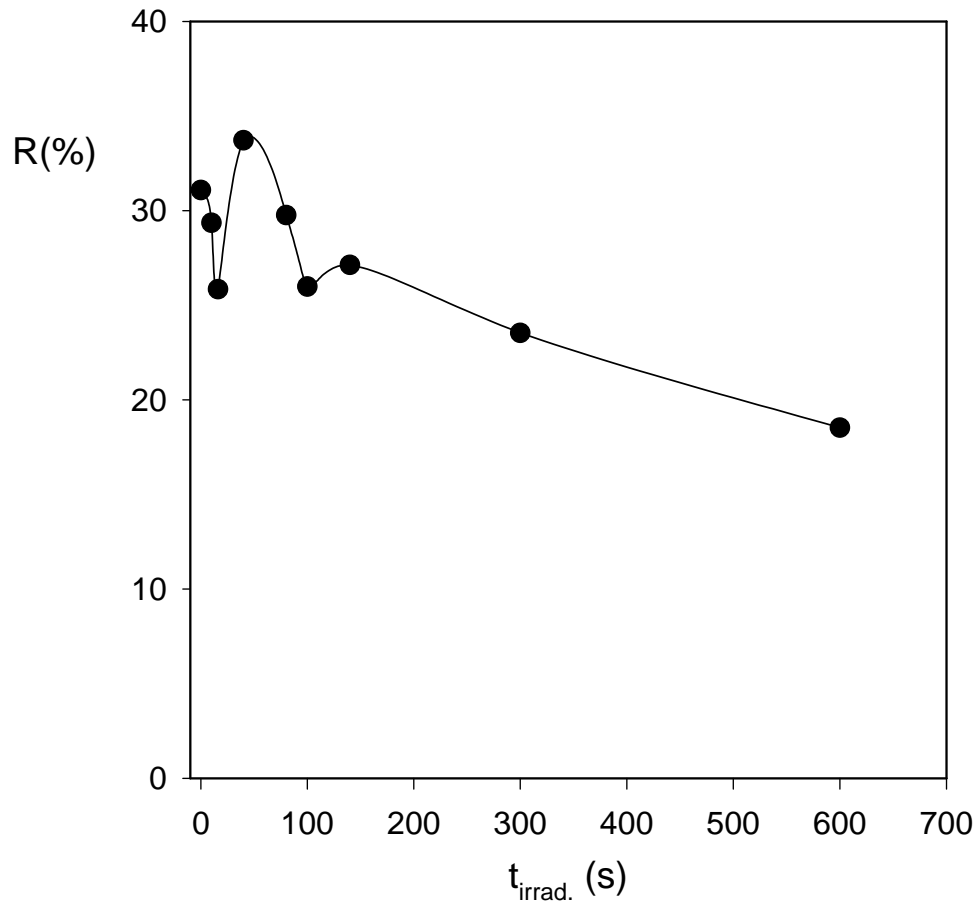


FIGURA A3.88

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa, tras un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, $R(\%)$, frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}} \text{ (s)}$.

TABLA A3.9

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0
(s)	($\Delta A/\text{min}$)
0	0,910
10	0,891
16	0,839
40	0,817
80	0,839
140	0,769
300	0,700
600	0,565

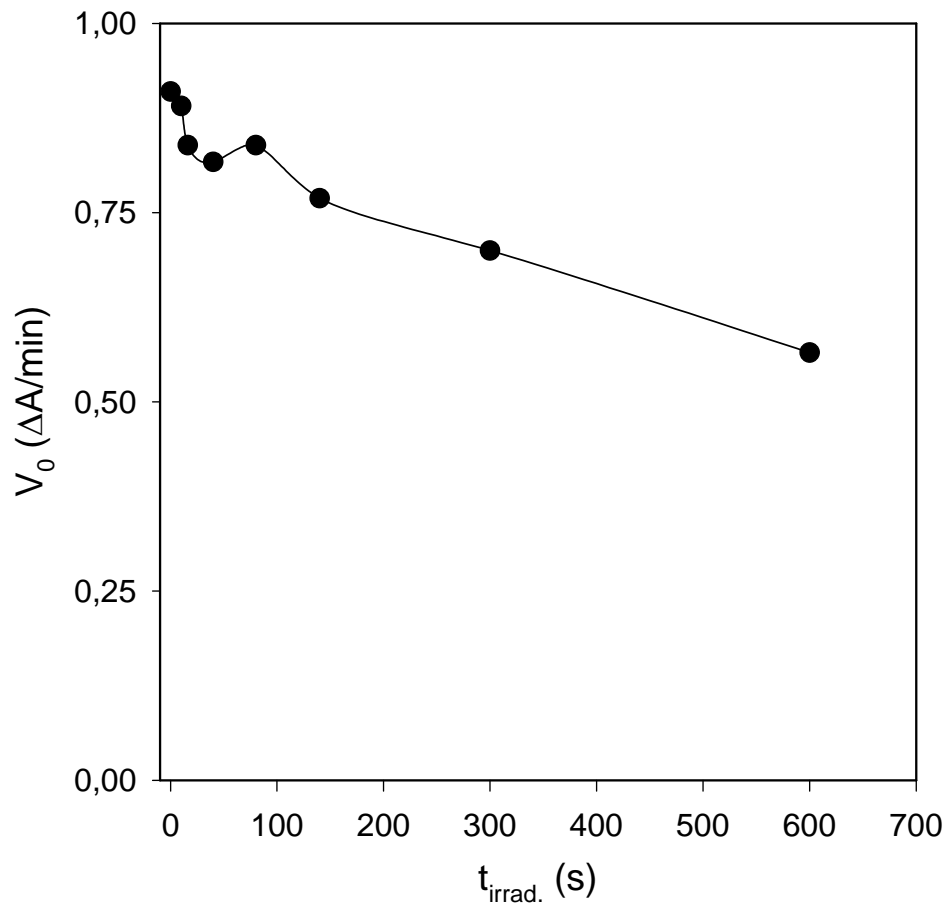


FIGURA A3.89

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad inicialmente retenida por el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente al tiempo de irradiación, $t_{\text{irrad.}}$ (s).

TABLA A3.10

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de inulina, tras un mes de almacenado.

$t_{\text{irrad.}}$	V_0	V_f	R
(s)	($\Delta A/\text{min}$)	($\Delta A/\text{min}$)	(%)
0	0,910	0,112	12,31
10	0,891	0,130	14,59
16	0,839	0,122	14,54
40	0,817	0,116	14,20
80	0,839	0,124	14,78
140	0,769	0,116	15,09
300	0,700	0,108	15,43
600	0,565	0,069	12,21

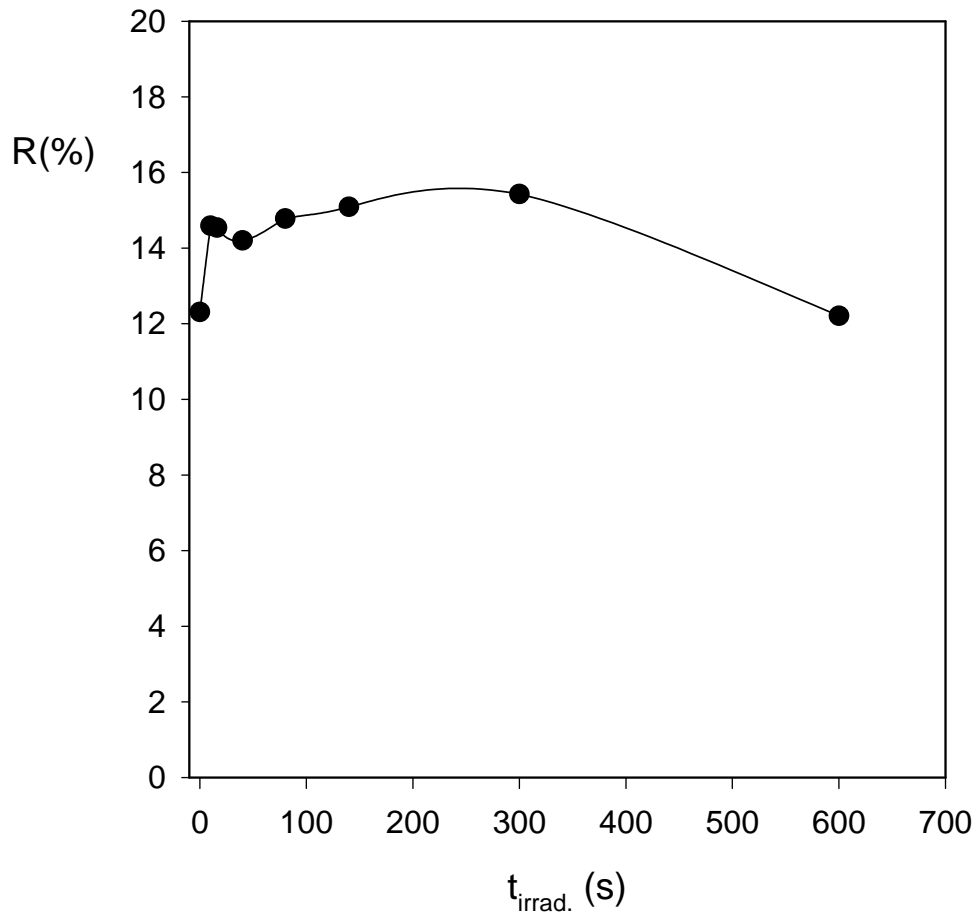


FIGURA A3.90

Efecto del tiempo de irradiación sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de inulina, tras un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, R(%), frente al tiempo de irradiación, t_{irrad.} (s).

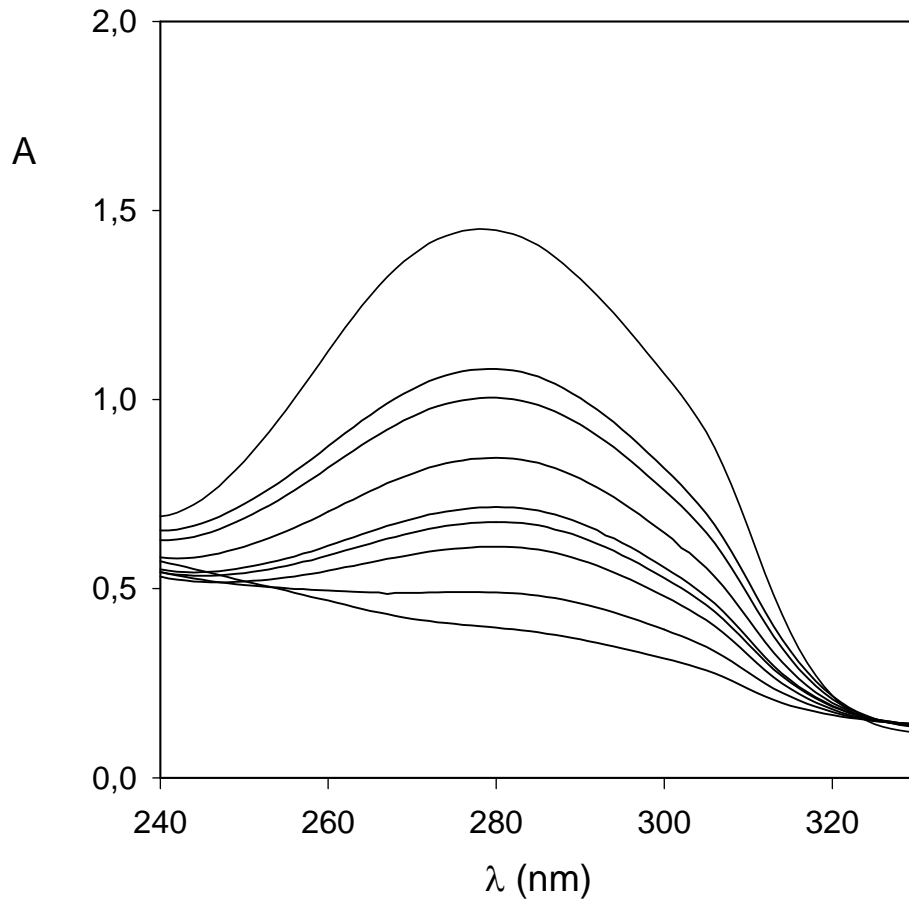


FIGURA A3.91

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de glicerina.

Representación de los valores de absorbancia obtenidos, A, frente a la longitud de onda correspondiente, λ (nm).

TABLA A3.11

Valores de densidad de entrecruzamiento (ρ) calculados para el derivado totalmente cinamoilado de glicerina.

$t_{\text{irrad.}}$ (s)	A_{280}	ρ
0	1,448	0
10	1,081	0,253453
16	1,005	0,305939
40	0,846	0,415746
80	0,716	0,505525
100	0,676	0,533149
140	0,611	0,578039
300	0,490	0,661602
600	0,397	0,725829

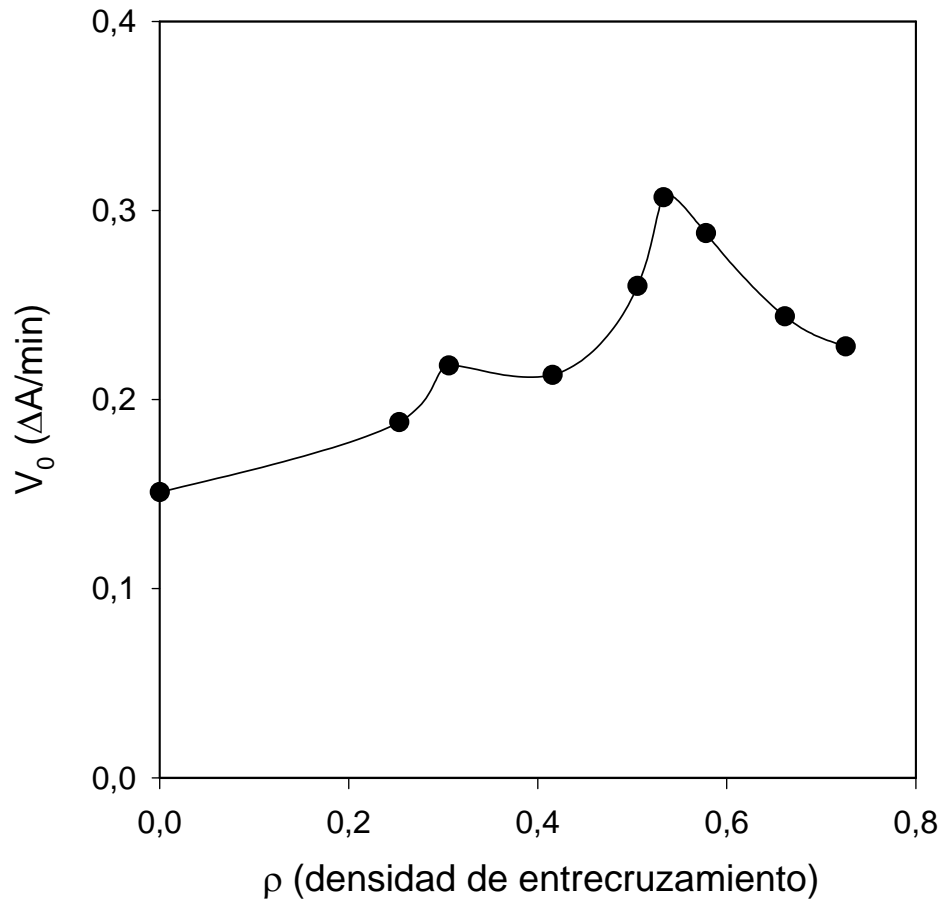


FIGURA A3.92

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de glicerina.

Representación de la actividad enzimática inicialmente mostrada, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ .

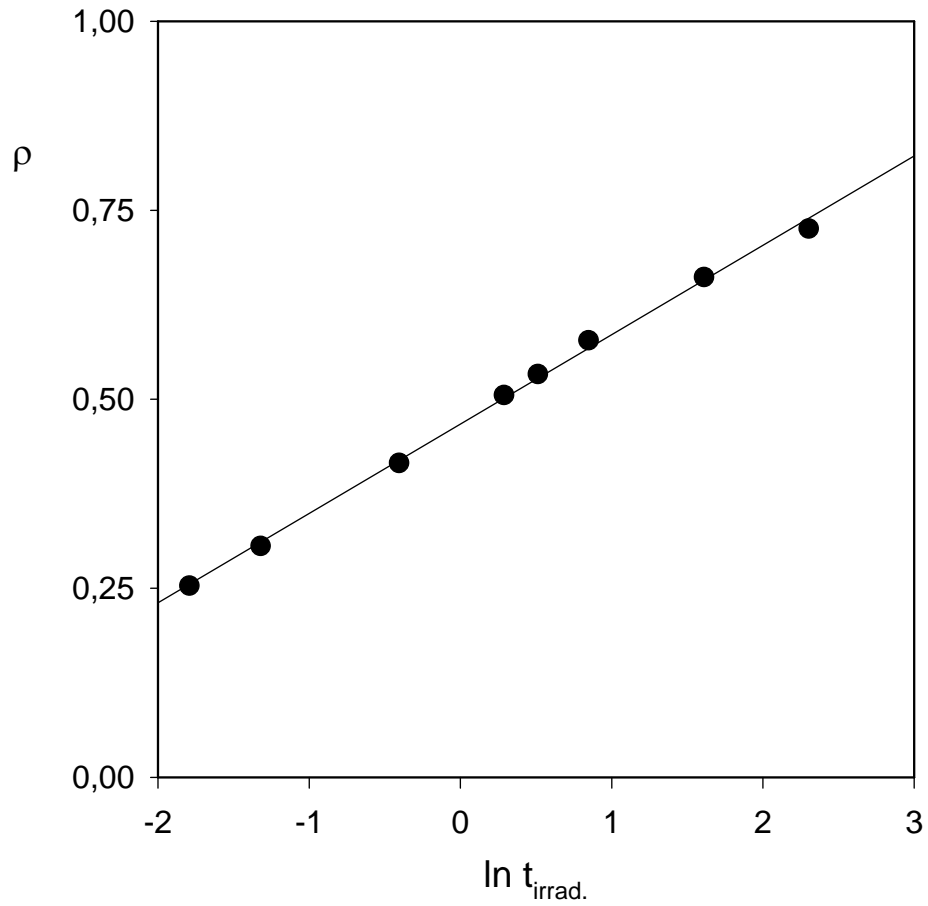


FIGURA A3.93

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de glicerina.

Representación de la densidad de entrecruzamiento, ρ , frente al logaritmo neperiano del tiempo de irradiación expresado en minutos, $\ln t_{\text{irrad.}}$.

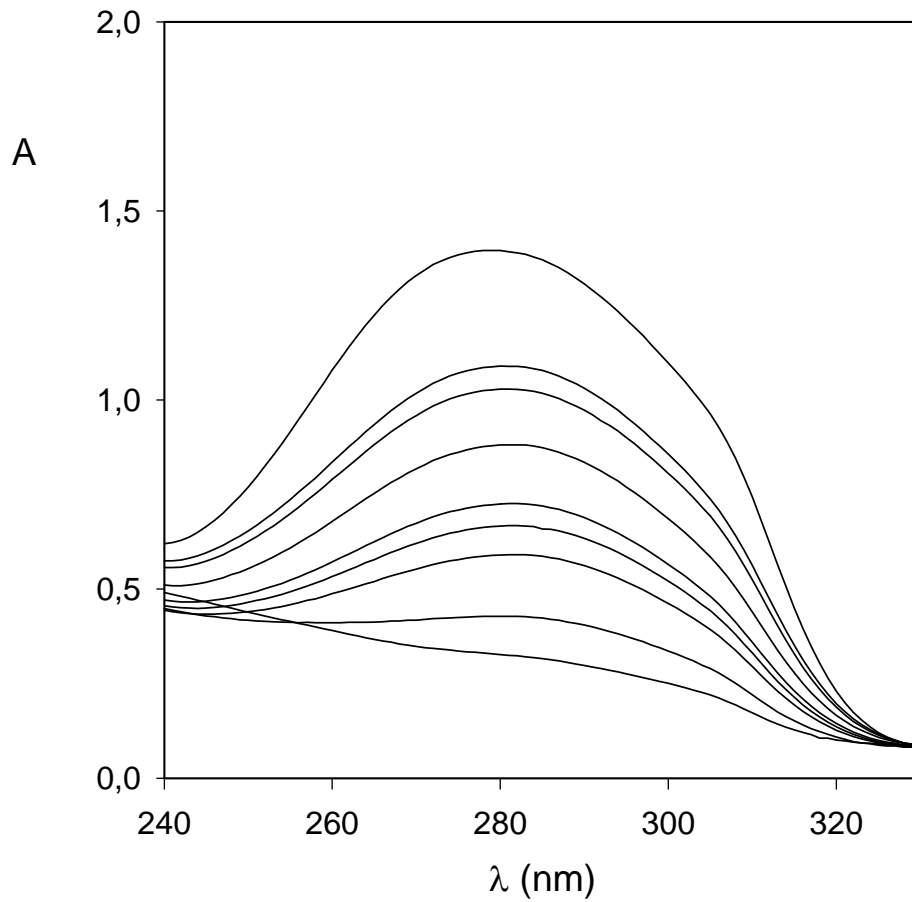


FIGURA A3.94

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

Representación de los valores de absorbancia obtenidos, A, frente a la longitud de onda correspondiente, λ (nm).

TABLA A3.12

Valores de densidad de entrecruzamiento (ρ) calculados para el derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

$t_{\text{irrad.}}$ (s)	A_{280}	ρ
0	1,395	0
10	1,090	0,218638
16	1,029	0,262366
40	0,881	0,368459
80	0,725	0,480287
100	0,667	0,521864
140	0,590	0,577061
300	0,428	0,693190
600	0,327	0,765591

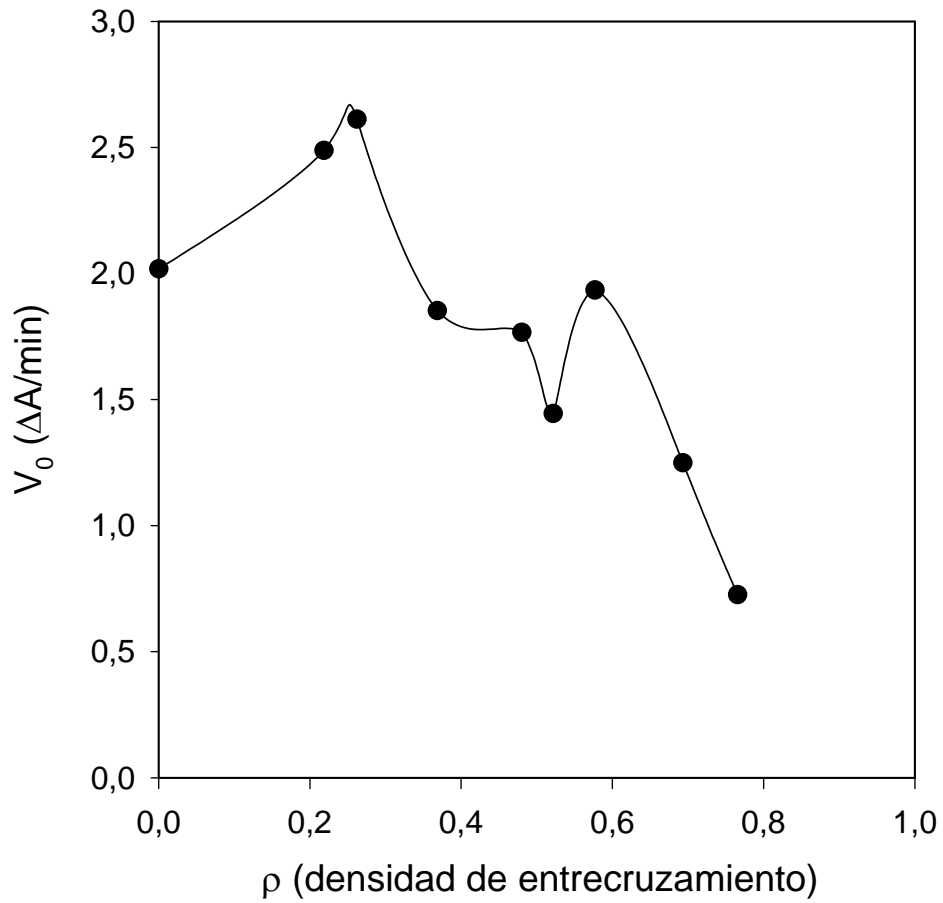


FIGURA A3.95

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

Representación de la actividad enzimática inicialmente mostrada, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ .

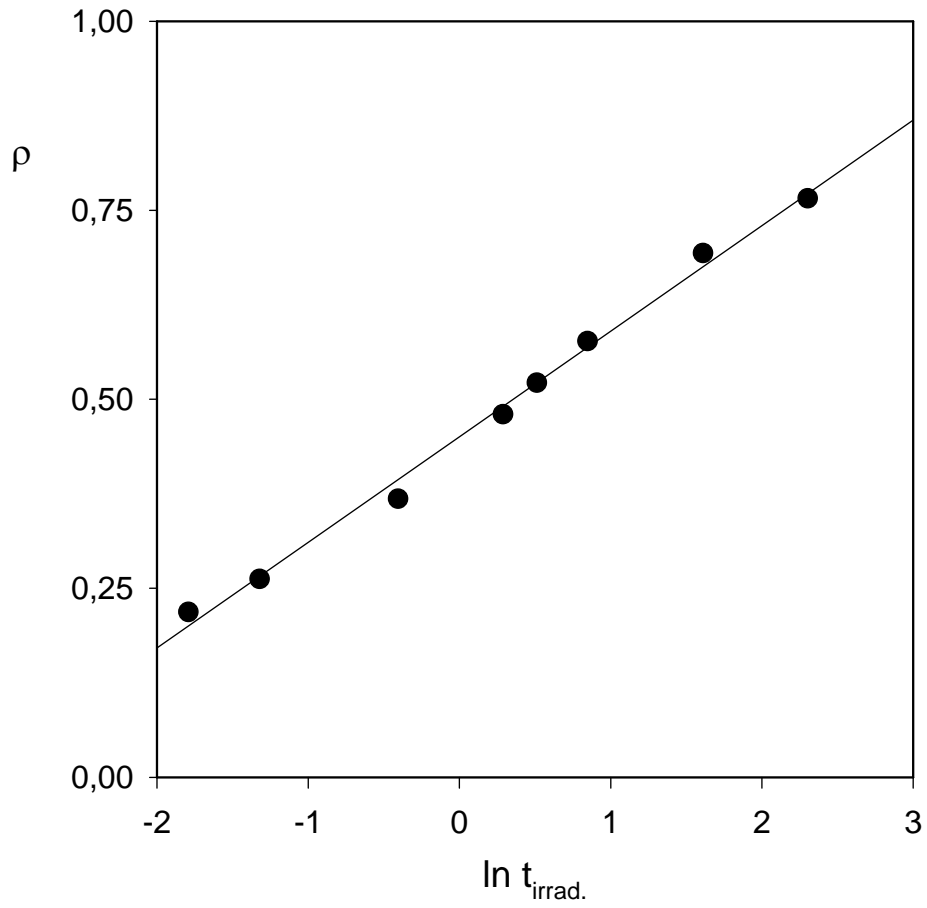


FIGURA A3.96

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de D-arabinosa.

Representación de la densidad de entrecruzamiento, ρ , frente al logaritmo neperiano del tiempo de irradiación expresado en minutos, $\ln t_{\text{irrad.}}$.

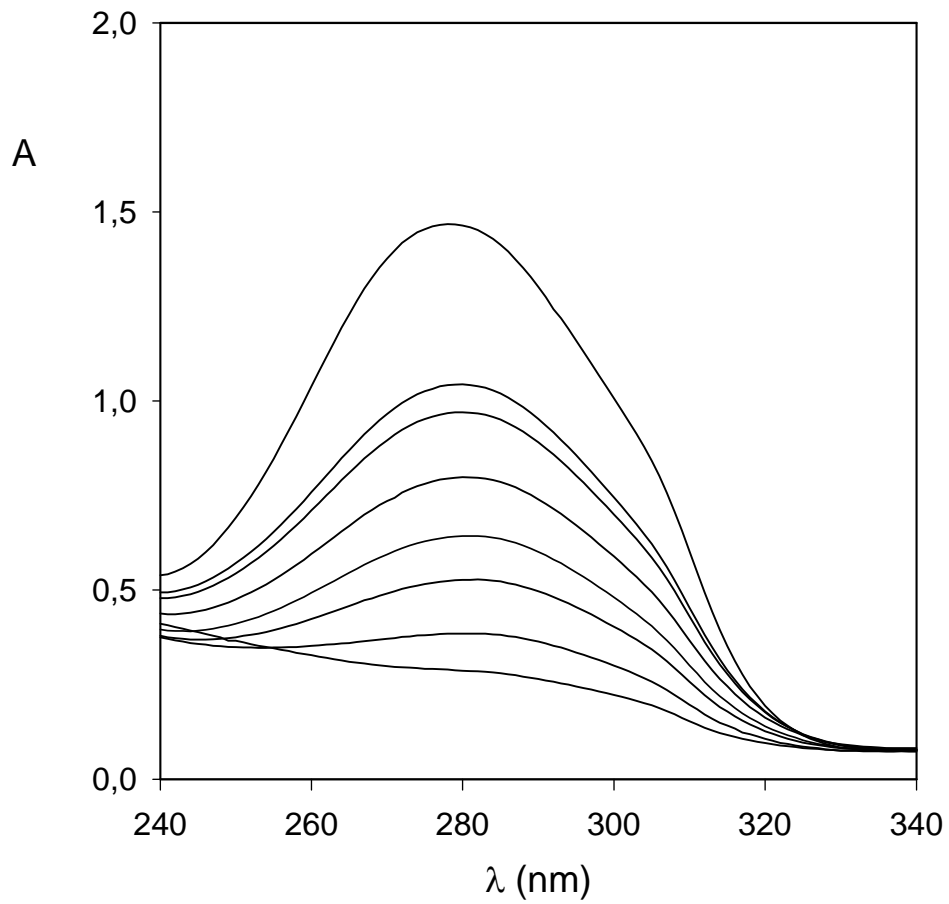


FIGURA A3.97

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de los valores de absorbancia obtenidos, A, frente a la longitud de onda correspondiente, λ (nm).

TABLA A3.13

Valores de densidad de entrecruzamiento (ρ) calculados para el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

$t_{\text{irrad.}}$ (s)	A_{280}	ρ
0	1,464	0
10	1,044	0,286885
16	0,970	0,337432
40	0,799	0,454235
80	0,643	0,560792
140	0,527	0,640027
300	0,385	0,737022
600	0,287	0,803962

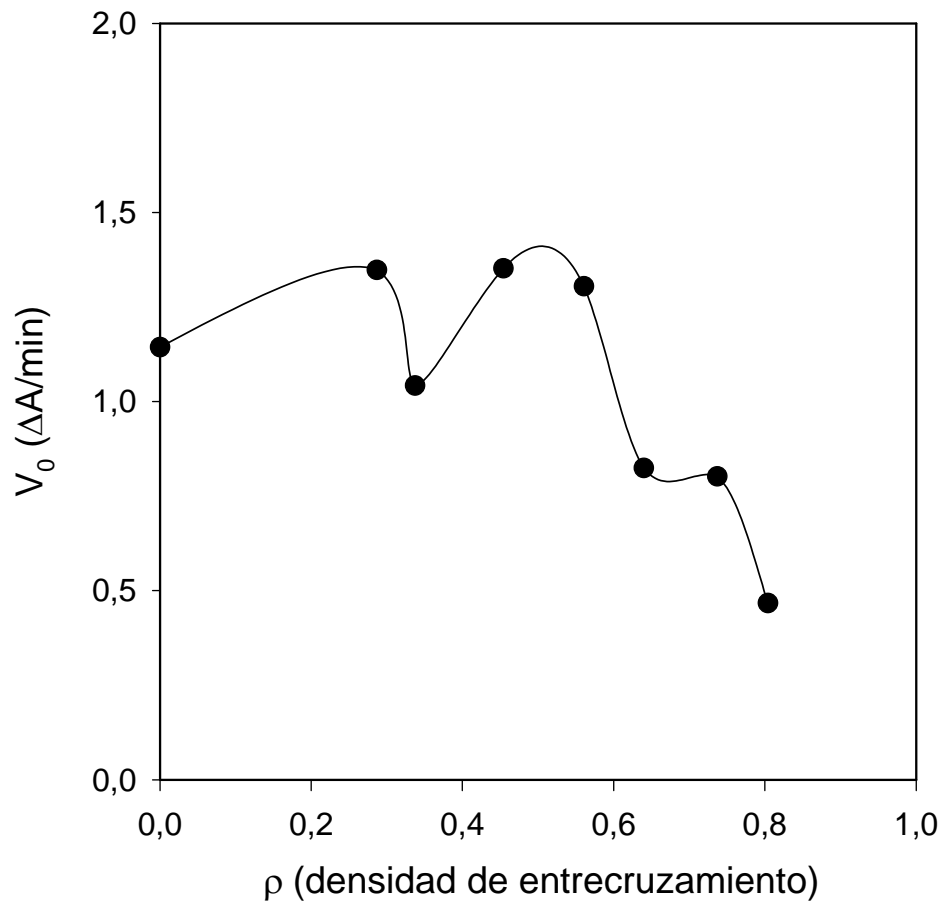


FIGURA A3.98

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de la actividad enzimática inicialmente mostrada, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ .

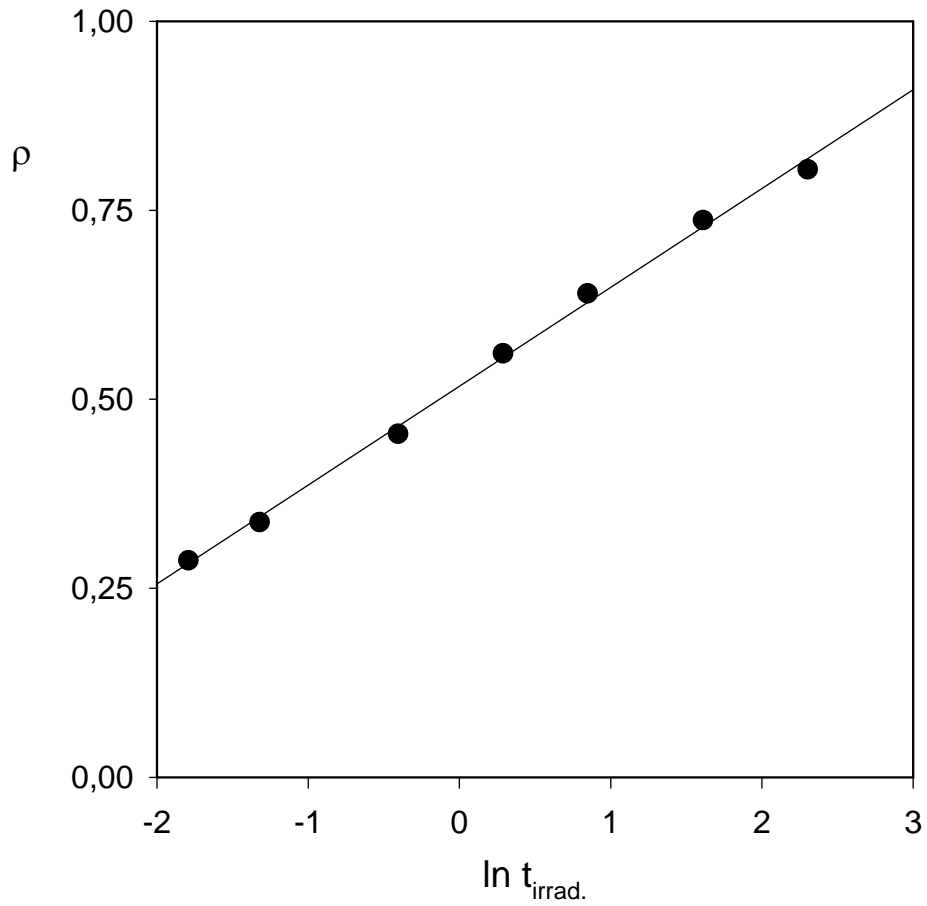


FIGURA A3.99

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de la densidad de entrecruzamiento, ρ , frente al logaritmo neperiano del tiempo de irradiación expresado en minutos, $\ln t_{\text{irrad.}}$.

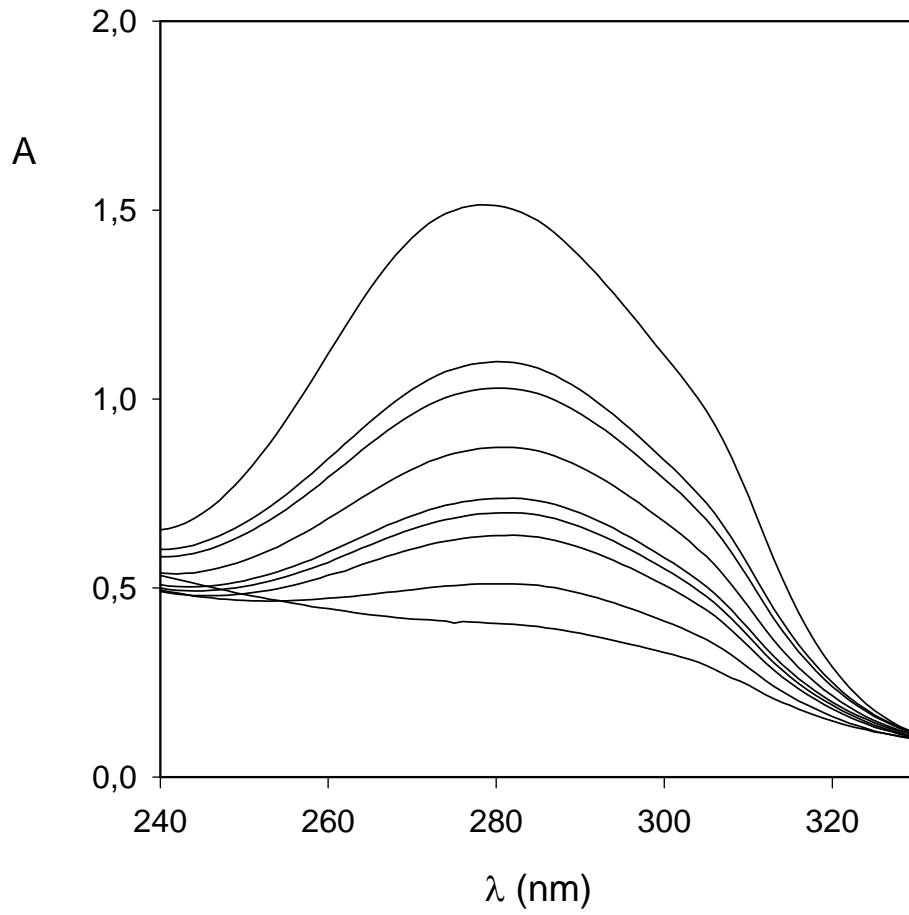


FIGURA A3.100

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Representación de los valores de absorbancia obtenidos, A, frente a la longitud de onda correspondiente, λ (nm).

TABLA A3.14

Valores de densidad de entrecruzamiento (ρ) calculados para el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

$t_{\text{irrad.}}$ (s)	A_{280}	ρ
0	1,512	0
10	1,099	0,273148
16	1,029	0,319444
40	0,872	0,423280
80	0,737	0,512566
100	0,698	0,538360
140	0,639	0,577381
300	0,511	0,662037
600	0,406	0,731482

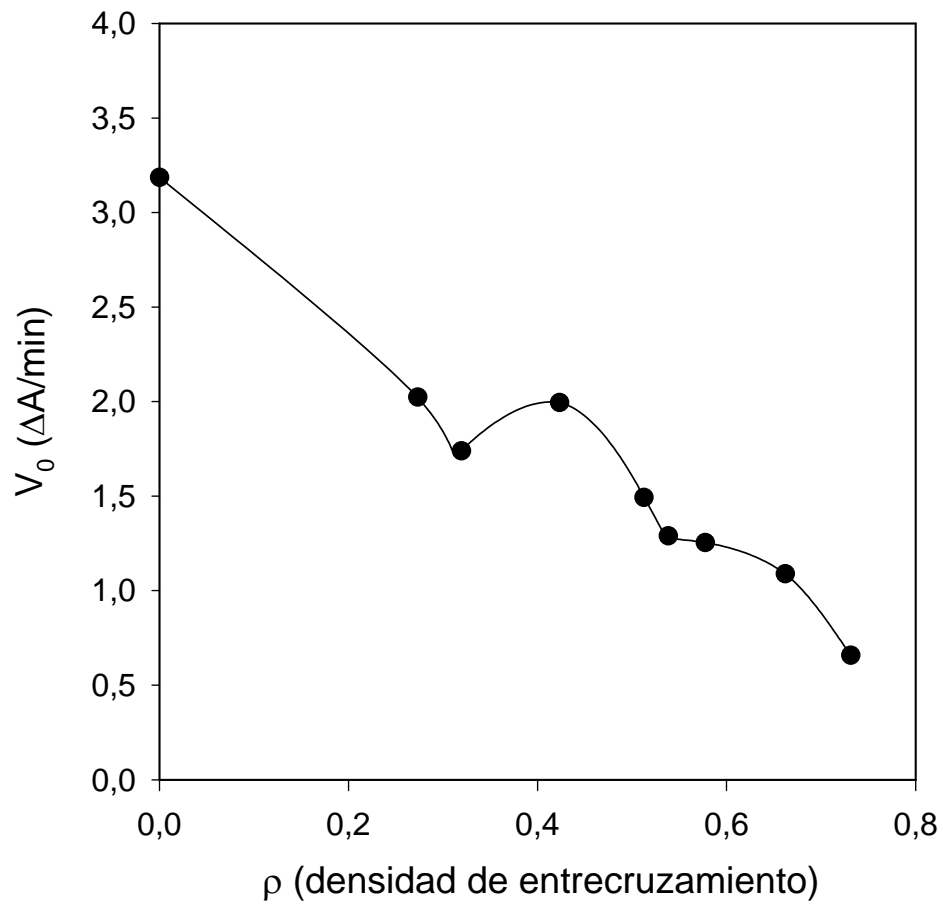


FIGURA A3.101

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Representación de la actividad enzimática inicialmente mostrada, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ .

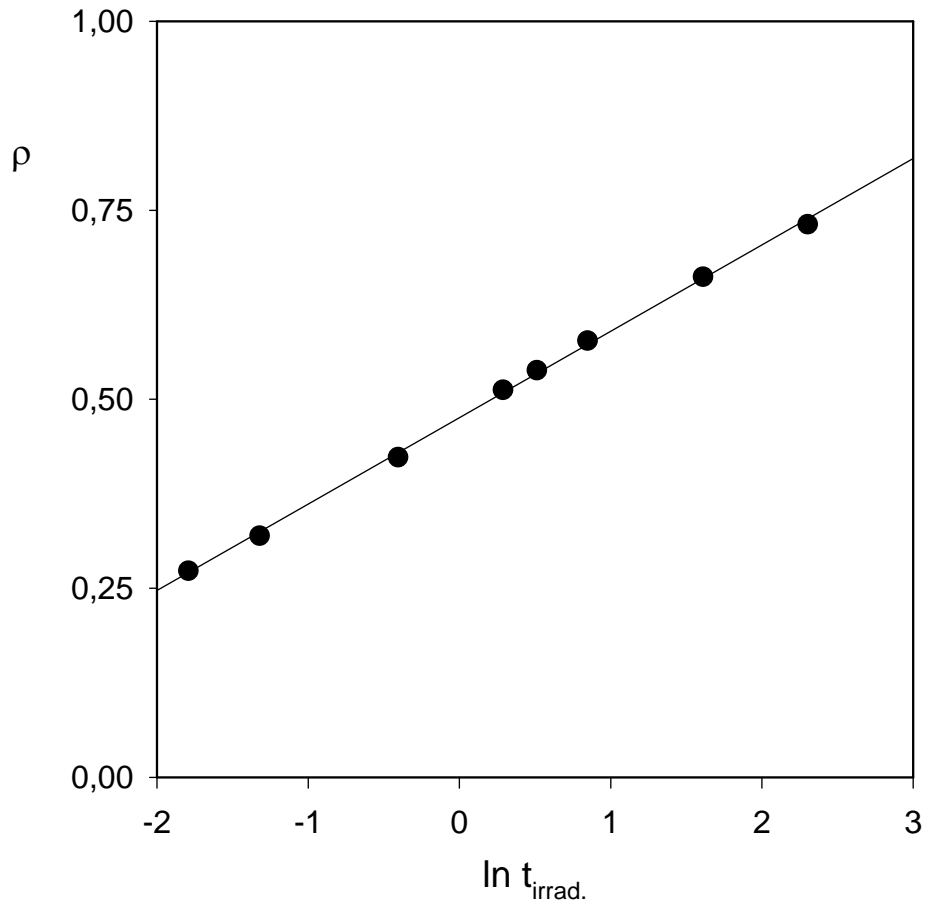


FIGURA A3.102

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de sacarosa.

Representación de la densidad de entrecruzamiento, ρ , frente al logaritmo neperiano del tiempo de irradiación expresado en minutos, $\ln t_{\text{irrad.}}$.

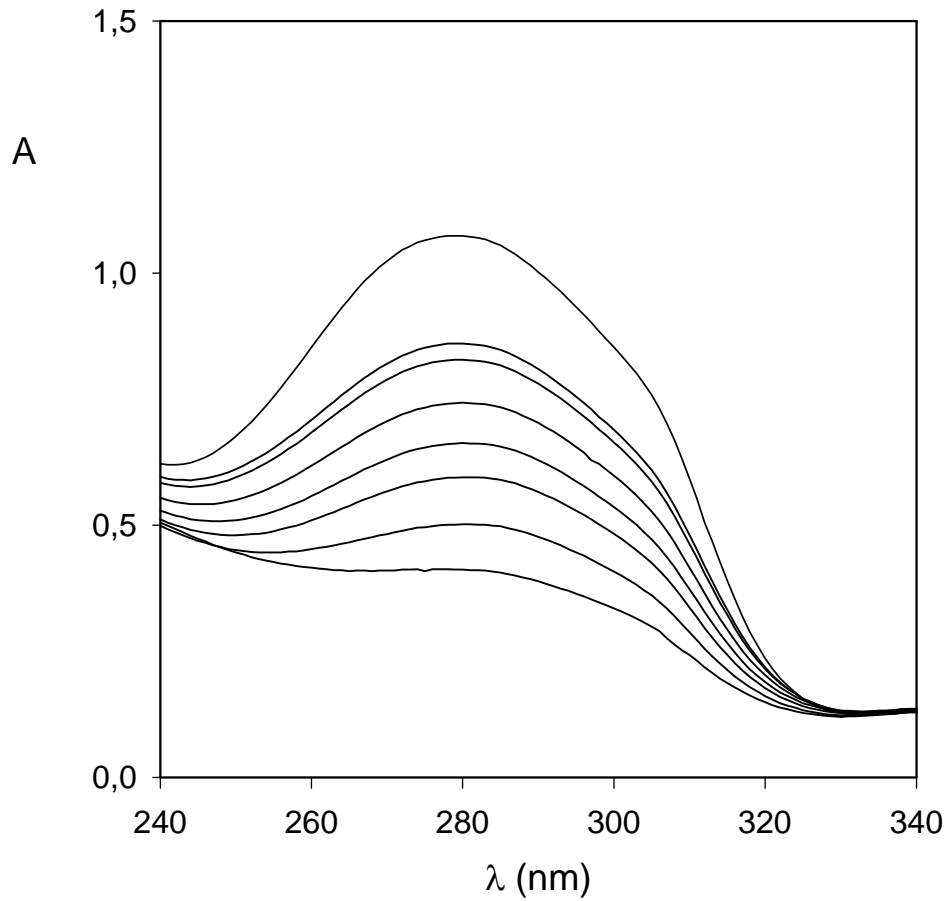


FIGURA A3.103

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación de los valores de absorbancia obtenidos, A, frente a la longitud de onda correspondiente, λ (nm).

TABLA A3.15

Valores de densidad de entrecruzamiento (ρ) calculados para el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

$t_{\text{irrad.}}$ (s)	A_{280}	ρ
0	1,074	0
10	0,860	0,199255
16	0,828	0,229050
40	0,743	0,308194
80	0,663	0,382682
140	0,595	0,445996
300	0,502	0,532589
600	0,412	0,616387

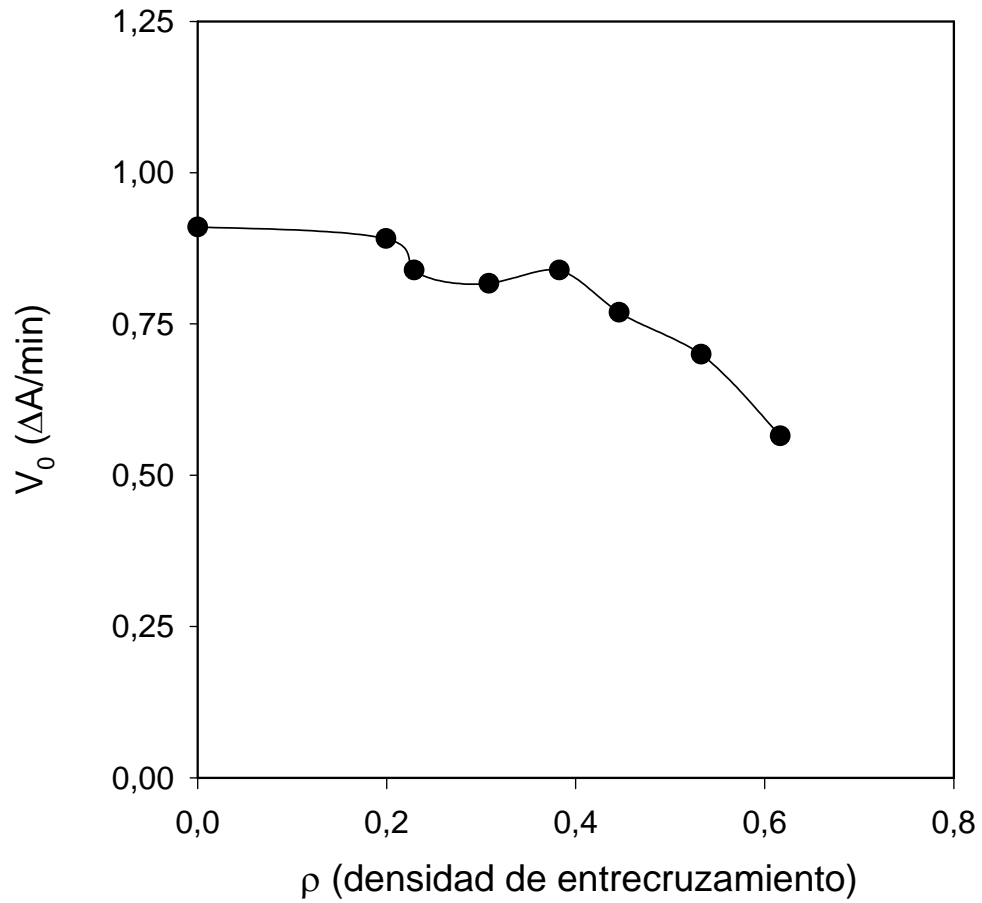


FIGURA A3.104

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad retenida por el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación de la actividad enzimática inicialmente mostrada, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ .

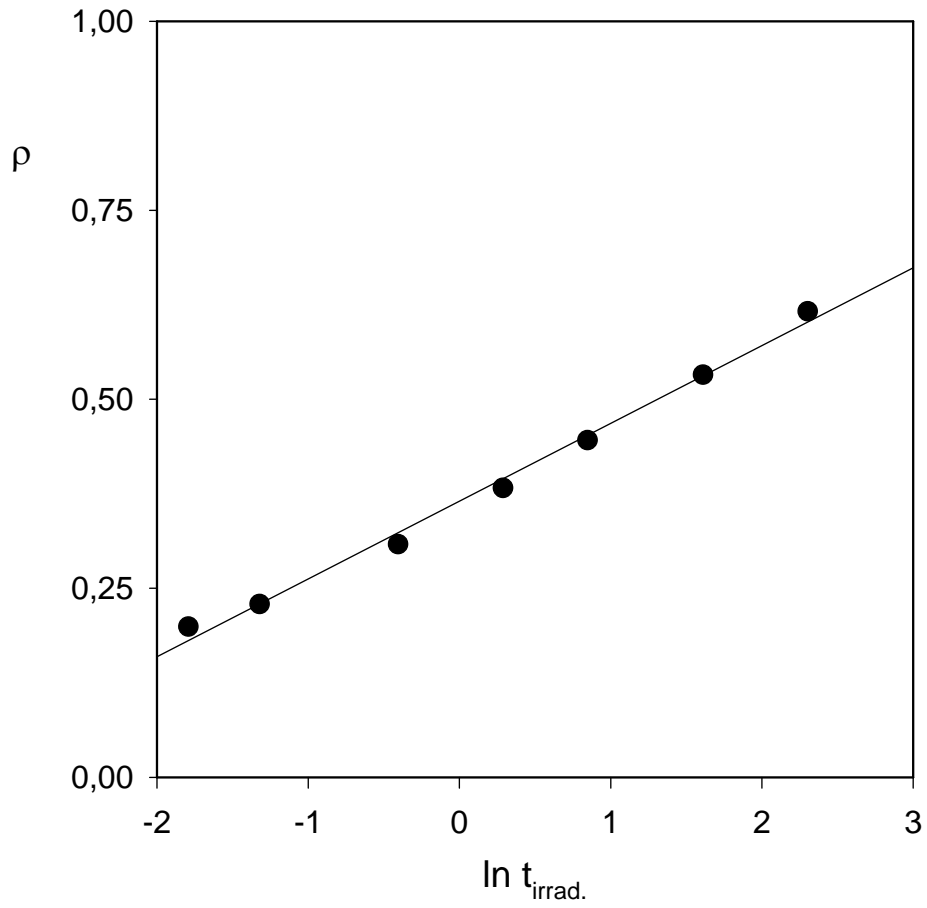


FIGURA A3.105

Efecto del tiempo de irradiación sobre la densidad de entrecruzamiento del derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación de la densidad de entrecruzamiento, ρ , frente al logaritmo neperiano del tiempo de irradiación expresado en minutos, $\ln t_{\text{irrad.}}$.

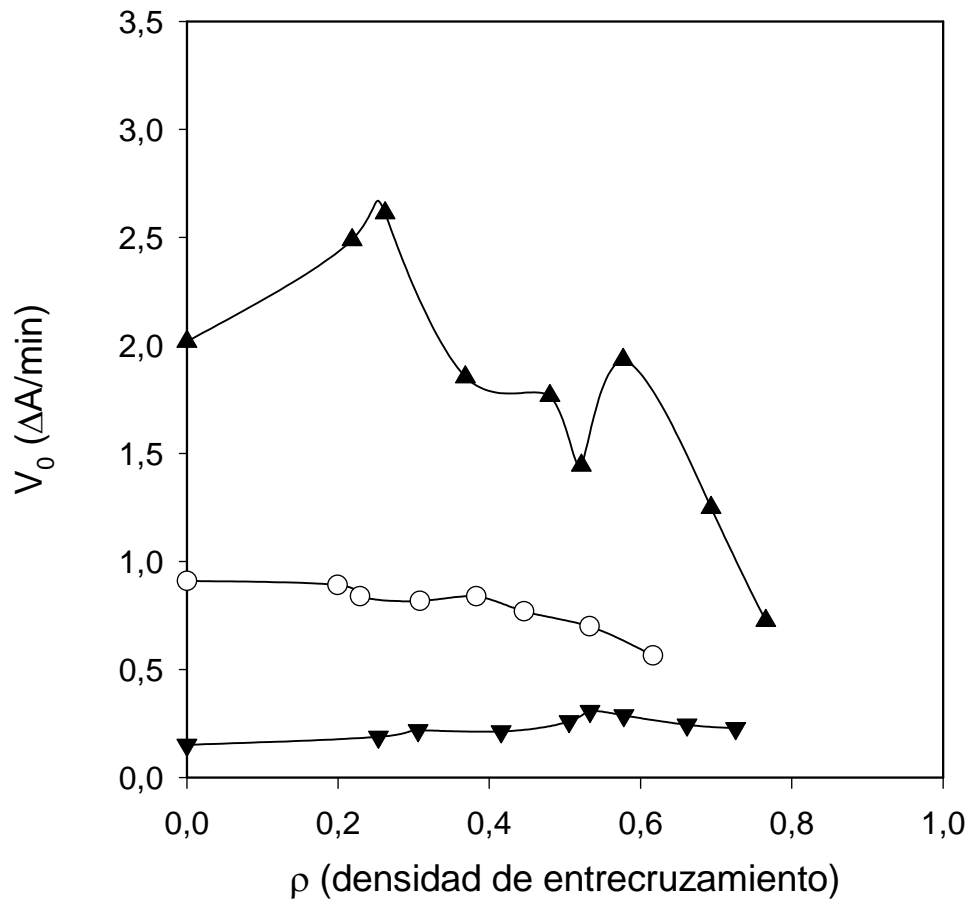


FIGURA A3.106

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad inicialmente retenida por los derivados totalmente cinamoilados de (τ) glicerina, (σ) D-arabinosa e (O) inulina.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ . Las condiciones del ensayo se indican en la Figura 3.13.

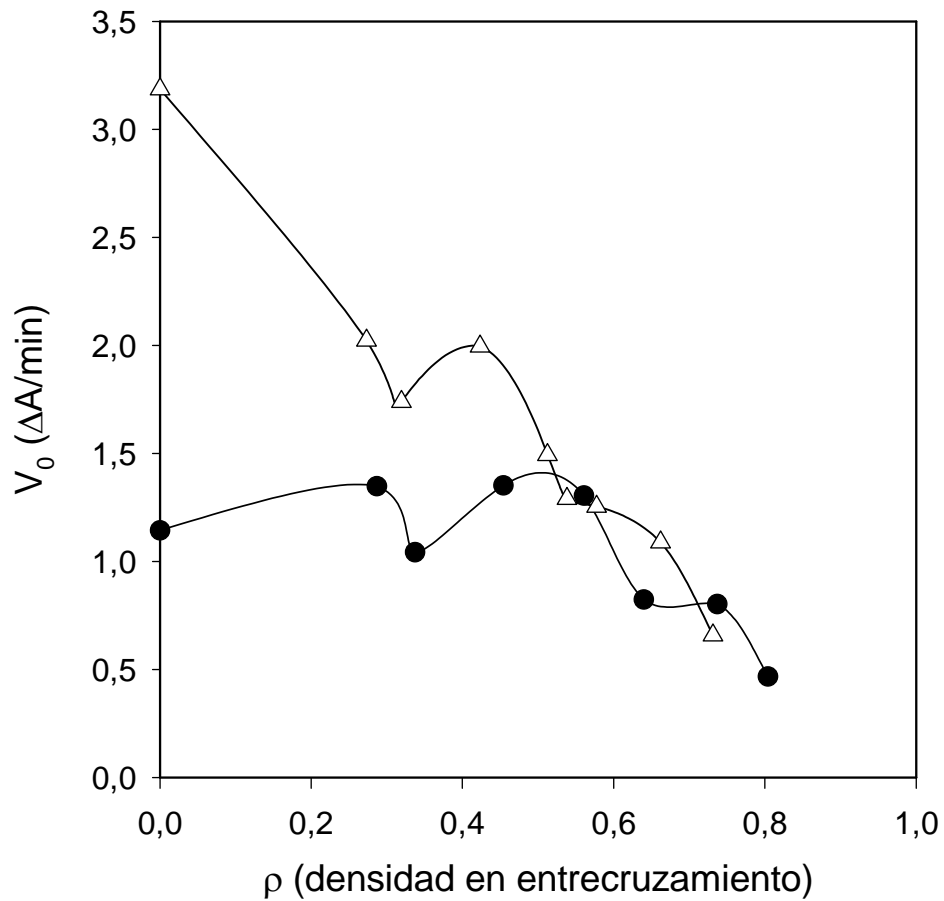


FIGURA A3.107

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad inicialmente retenida por los derivados totalmente cinamoilados de (λ) D-glucosona y (Δ) sacarosa.

Representación de la velocidad inicial de la reacción enzimática, V_0 ($\Delta A/\text{min}$), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ . Las condiciones del ensayo se indican en la Figura 3.13.

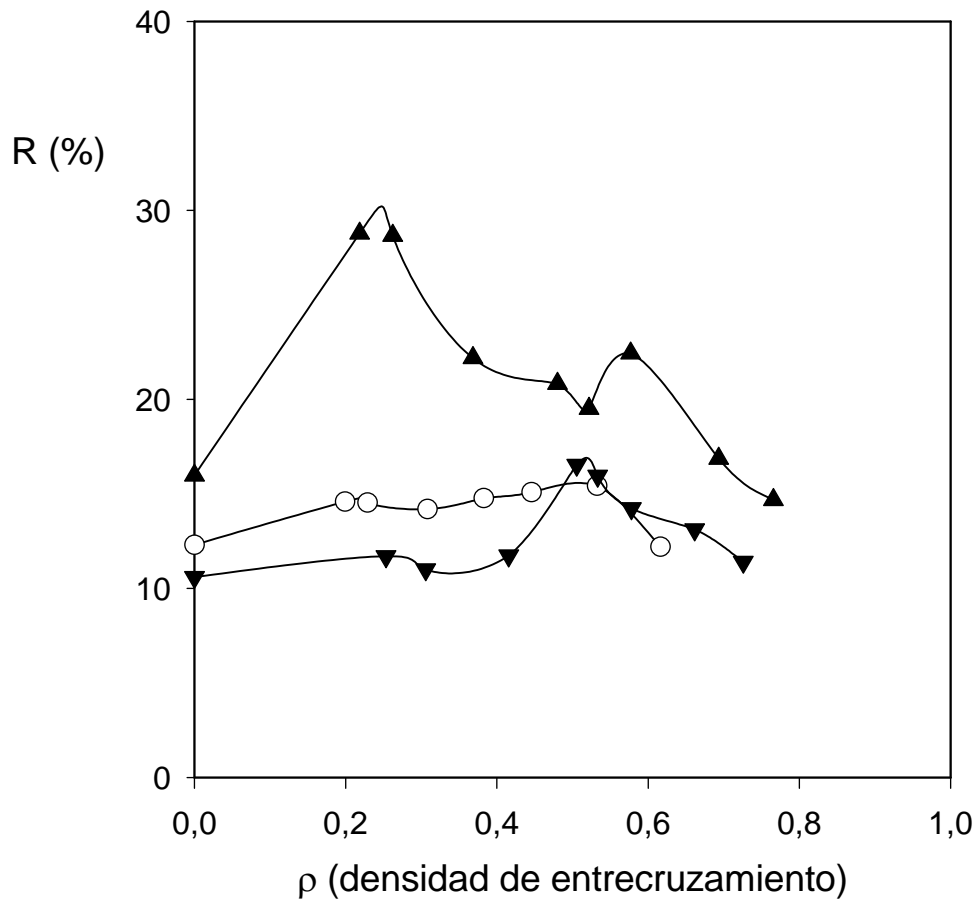


FIGURA A3.108

Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad retenida por los derivados totalmente cinamoilados de (τ) glicerina, (σ) D-arabinosa e (O) inulina, después de un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, R(%), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ. Las condiciones del ensayo se indican en la Figura 3.14.

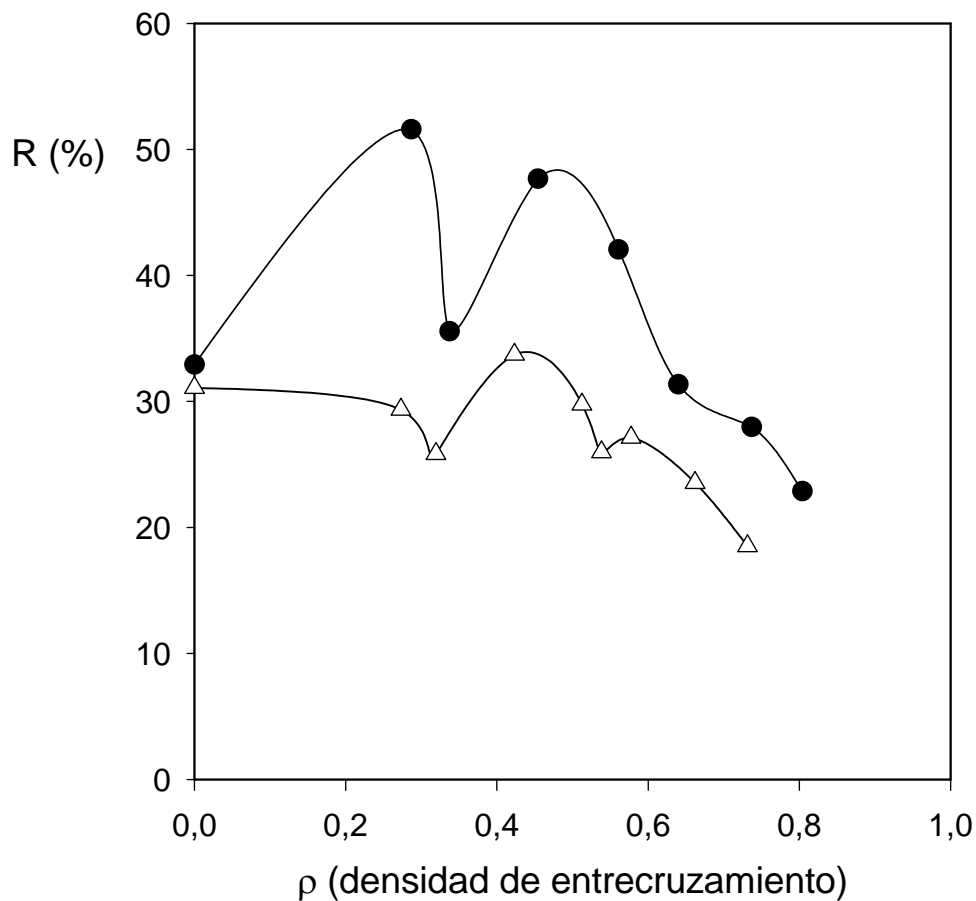


FIGURA A3.109

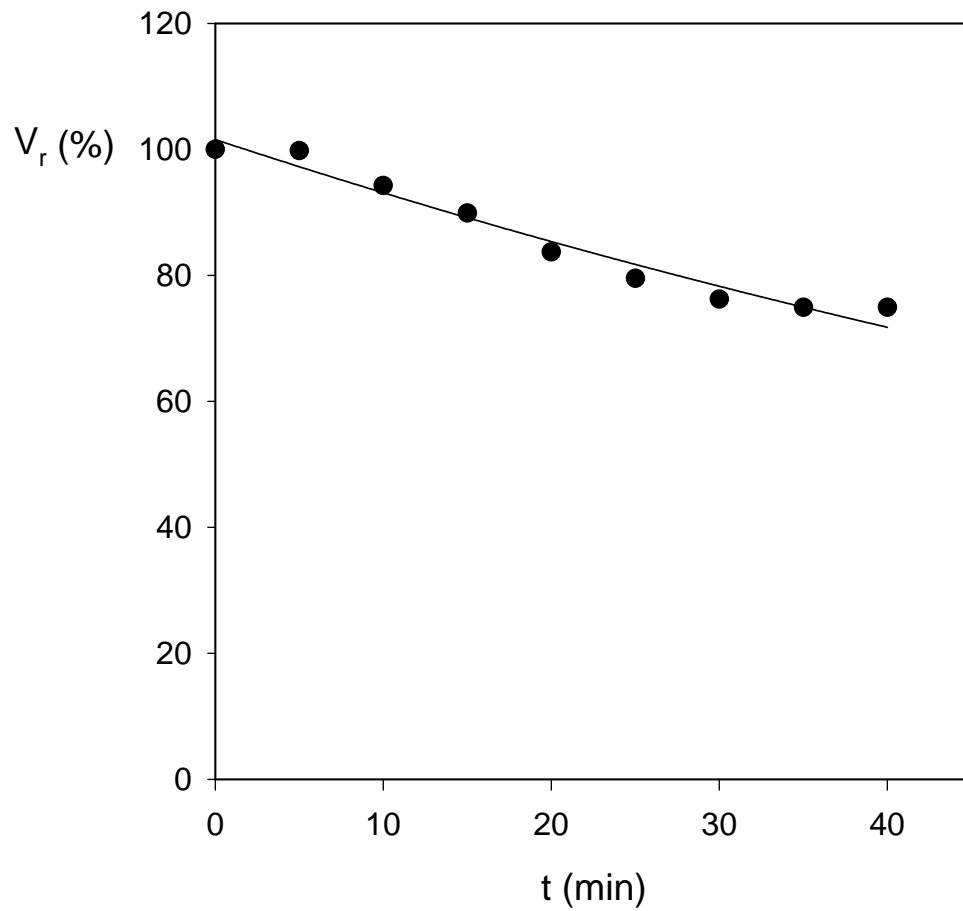
Efecto de la densidad de entrecruzamiento sobre la actividad retenida por los derivados totalmente cinamoilados de (λ) D-glucosona y (Δ) sacarosa, después de un mes de almacenado.

Representación del tanto por ciento de retención tras el almacenado, R(%), frente a la densidad de entrecruzamiento, ρ. Las condiciones del ensayo se indican en la Figura 3.14.

TABLA A4.1
Inactivación térmica a 40°C de HRPc soluble en tampón
fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).

t	V₀	V_r
(min)	($\Delta A/min$)	(%)
0	0,454	100
5	0,453	99,78
10	4,428	94,27
15	0,408	89,87
20	0,380	83,70
25	0,361	79,52
30	0,346	76,21
35	0,340	74,89
40	0,340	74,89

Valores obtenidos para una disolución 1 mM en ABTS y 1 mM en H₂O₂ en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La concentración de HRPc en el medio de ensayo fue de 21 ng/mL.

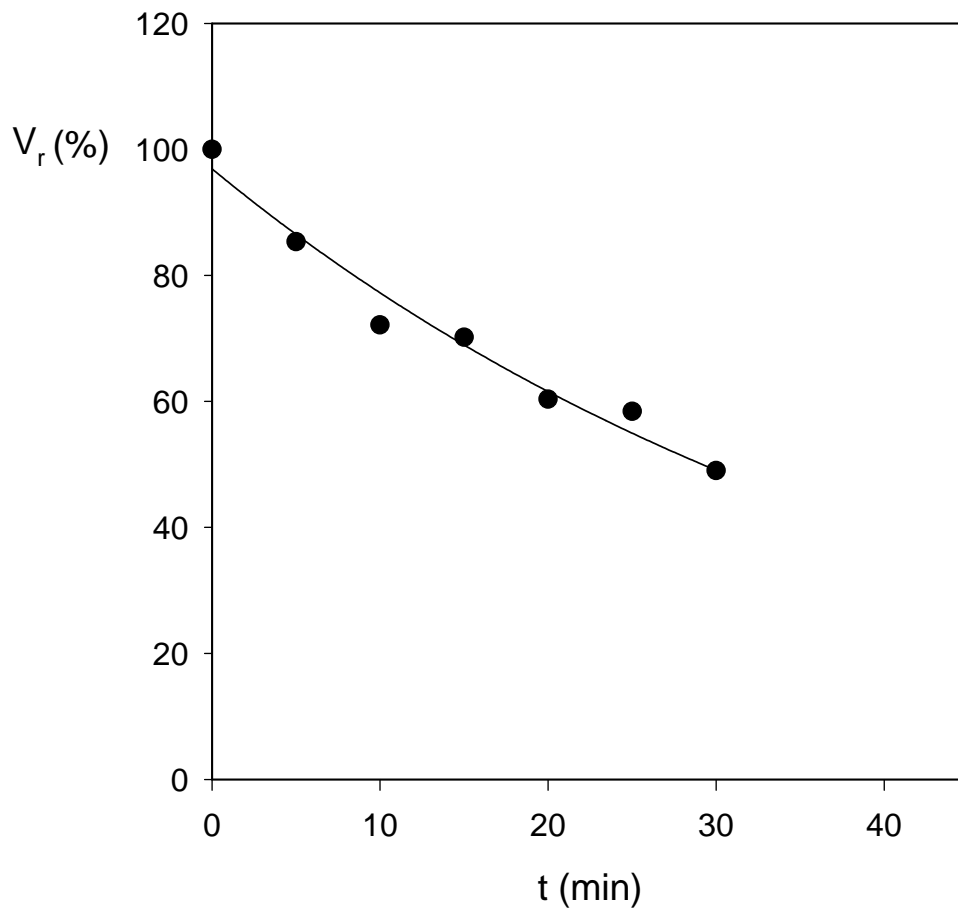
**FIGURA A4.1****Inactivación térmica a 40°C de HRPc soluble.**

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a una temperatura de 40°C. La concentración de HRPc fue de 0,58 $\mu\text{g/mL}$.

TABLA A4.2
Inactivación térmica a 50°C de HRPc soluble en tampón
fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).

t	V₀	V_r
(min)	($\Delta A/min$)	(%)
0	0,416	100
5	0,355	85,34
10	0,300	72,12
15	0,292	70,19
20	0,251	60,34
25	0,243	58,41
30	0,204	49,04
35	0,209	50,24
40	0,205	49,28

Valores obtenidos para una disolución 1 mM en ABTS y 1 mM en H₂O₂ en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La concentración de HRPc en el medio de ensayo fue de 21 ng/mL.

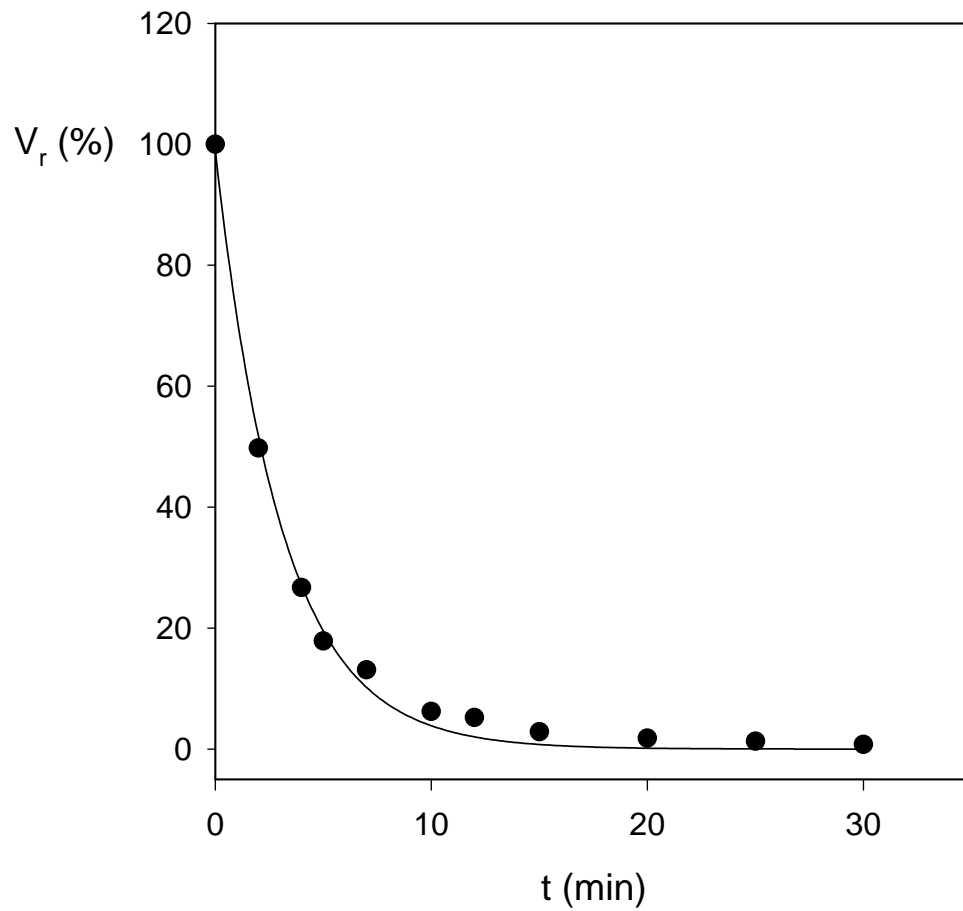
**FIGURA A4.2****Inactivación térmica a 50°C de HRPc soluble.**

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a una temperatura de 50°C. La concentración de HRPc fue de 0,58 $\mu\text{g/mL}$.

TABLA A4.3
Inactivación térmica a 60°C de HRPc soluble en tampón
fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).

t	V₀	V_r
(min)	($\Delta A/min$)	(%)
0	0,398	100
2	0,198	49,78
4	0,106	26,70
5	0,071	17,88
7	0,052	13,12
10	0,025	6,21
12	0,021	5,21
15	0,011	2,85
20	0,007	1,81
25	0,005	1,29
30	0,003	0,77

Valores obtenidos para una disolución 1 mM en ABTS y 1 mM en H₂O₂ en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La concentración de HRPc en el medio de ensayo fue de 21 ng/mL.

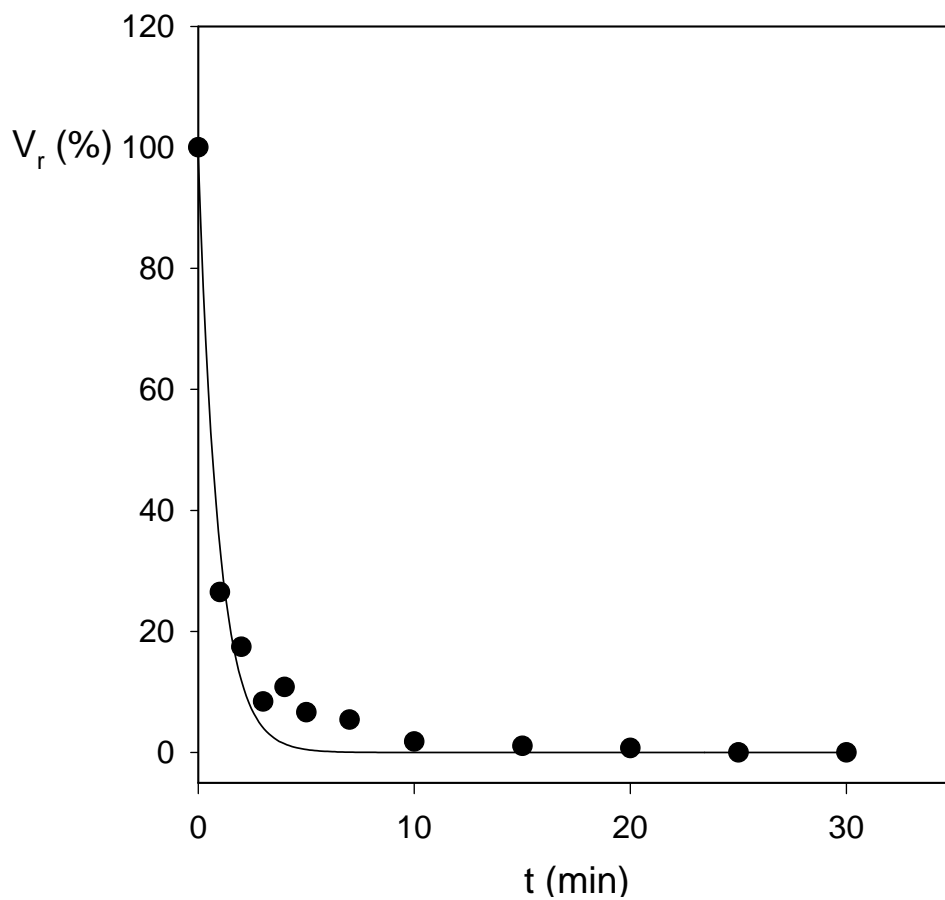
**FIGURA A4.3****Inactivación térmica a 60°C de HRPc soluble.**

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a una temperatura de 60°C. La concentración de HRPc fue de 0,58 $\mu\text{g/mL}$.

TABLA A4.4
Inactivación térmica a 70°C de HRPc soluble en tampón
fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).

t	V₀	V_r
<i>(min)</i>	<i>(ΔA/min)</i>	<i>(%)</i>
0	0,166	100
1	0,044	26,51
2	0,029	17,47
3	0,014	8,43
4	0,018	10,84
5	0,011	6,63
7	0,009	5,42
10	0,003	1,81
15	0,002	1,08
20	0,001	0,72
25	0,000	0,00
30	0,000	0,00

Valores obtenidos para una disolución 1 mM en ABTS y 1 mM en H₂O₂ en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La concentración de HRPc en el medio de ensayo fue de 21 ng/mL.

**FIGURA A4.4****Inactivación térmica a 70°C de HRPc soluble.**

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a una temperatura de 70°C. La concentración de HRPc fue de 0,58 $\mu\text{g/mL}$.

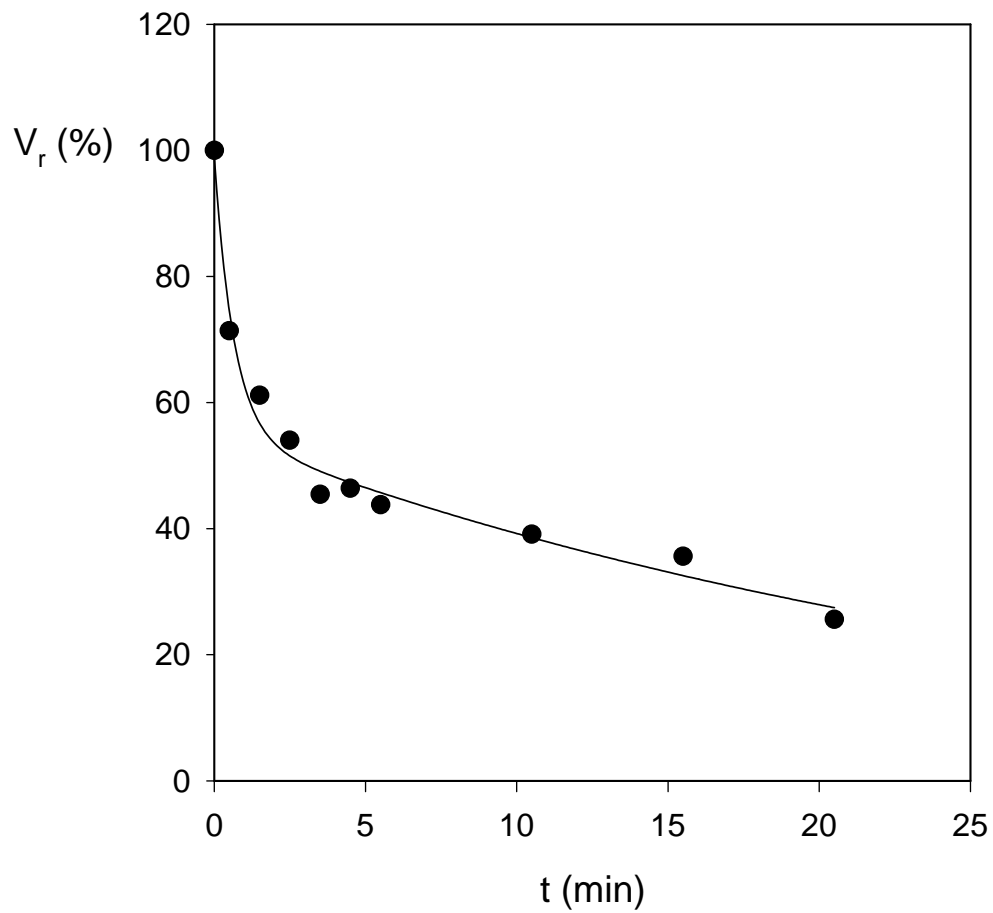
TABLA A4.5

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

t	V₀^a	V_f^b	V_r
(min)	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)
0	0,888	0,244	100
1	0,919	0,180	71,38
2	0,872	0,146	61,17
3	0,854	0,127	54,03
4	0,876	0,109	45,43
5	0,913	0,116	46,41
6	0,921	0,111	43,78
11	0,881	0,095	39,12
16	0,927	0,091	35,62
21	0,854	0,060	25,63

(a) Velocidad de la reacción enzimática antes de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

(b) Velocidad de la reacción enzimática después de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

**FIGURA A4.5**

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura de 60°C.

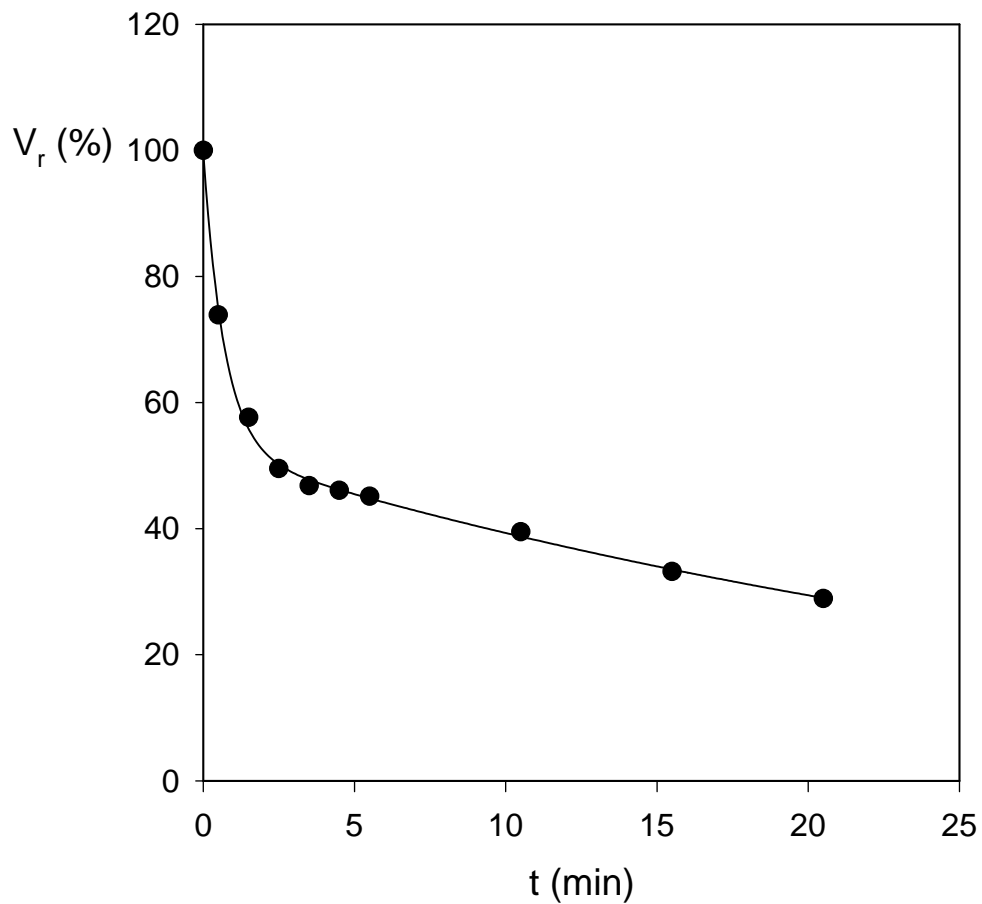
TABLA A4.6

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

t	V₀^a	V_f^b	V_r
(min)	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)
0	0,639	0,210	100
1	0,671	0,163	73,89
2	0,669	0,127	57,66
3	0,658	0,107	49,50
4	0,644	0,099	46,79
5	0,618	0,094	46,07
6	0,606	0,090	45,12
11	0,700	0,091	39,50
16	0,677	0,074	33,21
21	0,606	0,058	28,90

(a) Velocidad de la reacción enzimática antes de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

(b) Velocidad de la reacción enzimática después de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

**FIGURA A4.6**

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura de 60°C.

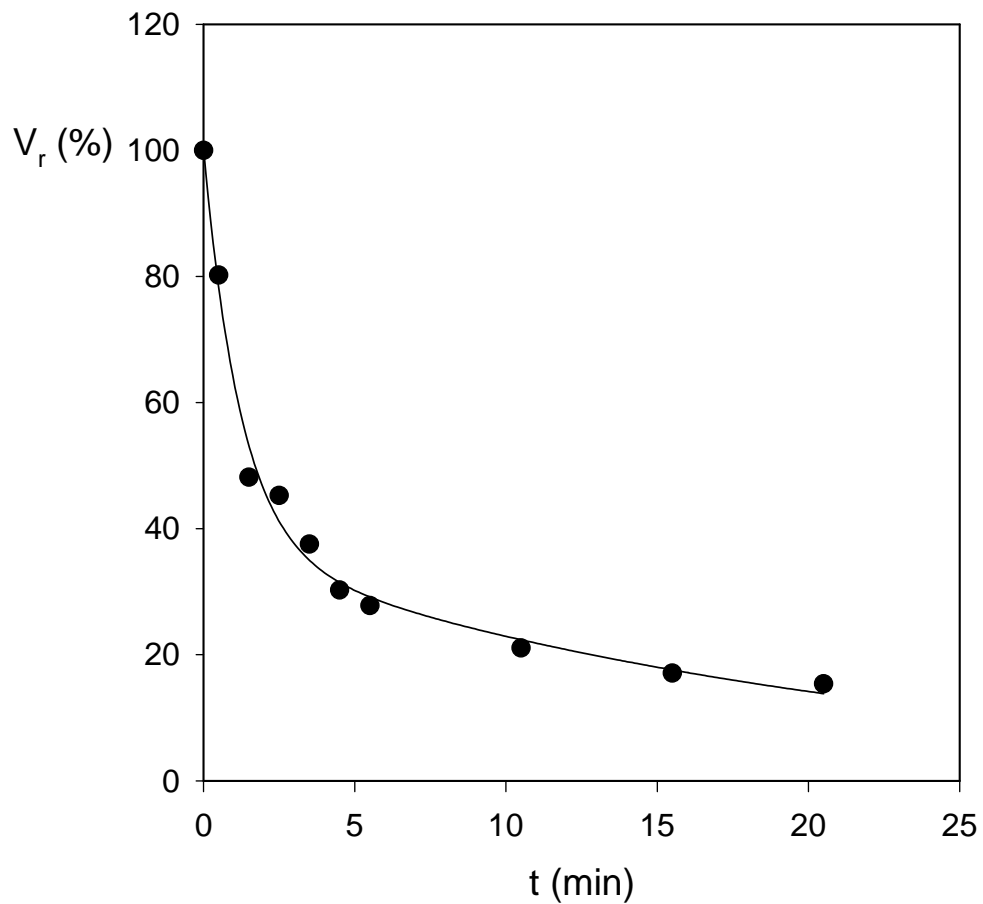
TABLA A4.7

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

t	V₀^a	V_f^b	V_r
(min)	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)
0	0,594	0,194	100
1	0,553	0,145	80,22
2	0,625	0,098	48,15
3	0,581	0,086	45,26
4	0,553	0,068	37,54
5	0,581	0,057	30,24
6	0,618	0,056	27,78
11	0,553	0,038	21,07
16	0,592	0,033	17,08
21	0,638	0,032	15,39

(a) Velocidad de la reacción enzimática antes de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

(b) Velocidad de la reacción enzimática después de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

**FIGURA A4.7**

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura de 60°C.

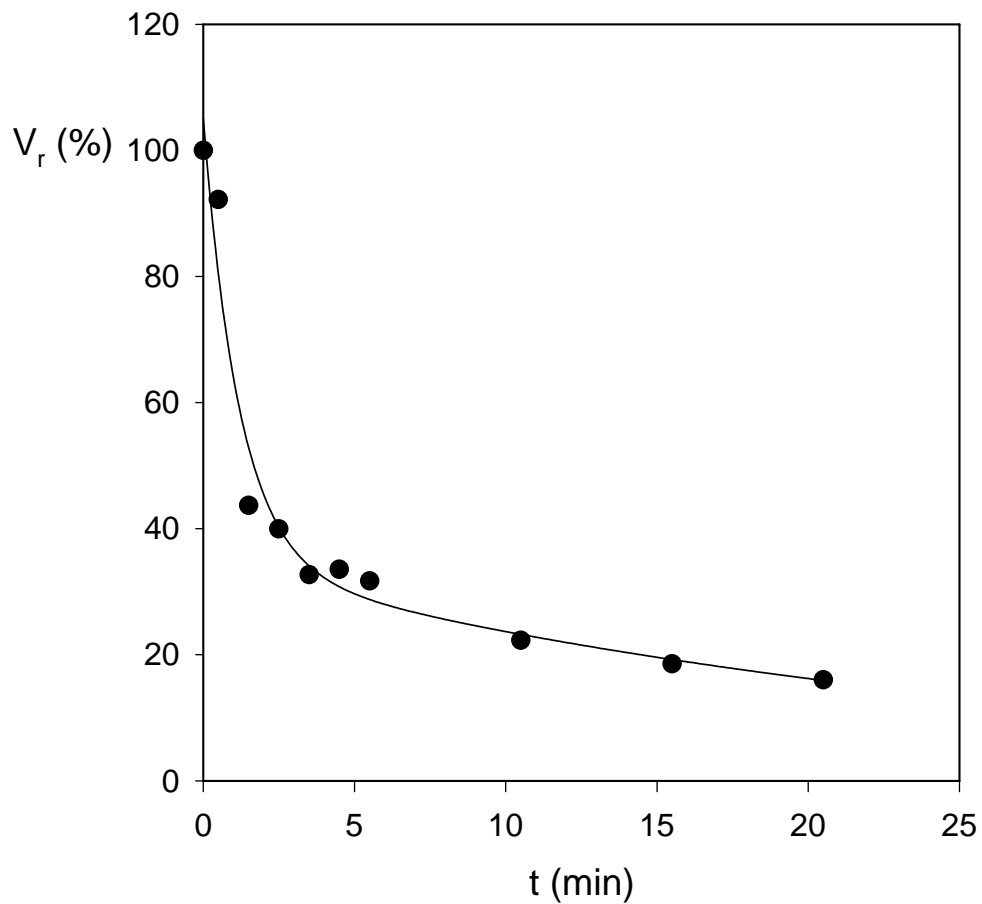
TABLA A4.8

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

t	V₀^a	V_f^b	V_r
(min)	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)
0	0,304	0,072	100
1	0,320	0,070	92,20
2	0,353	0,037	43,70
3	0,359	0,034	39,94
4	0,310	0,024	32,69
5	0,302	0,024	33,53
6	0,359	0,027	31,72
11	0,346	0,018	22,31
16	0,305	0,013	18,56
21	0,321	0,012	16,03

(a) Velocidad de la reacción enzimática antes de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

(b) Velocidad de la reacción enzimática después de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

**FIGURA A4.8**

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura de 60°C.

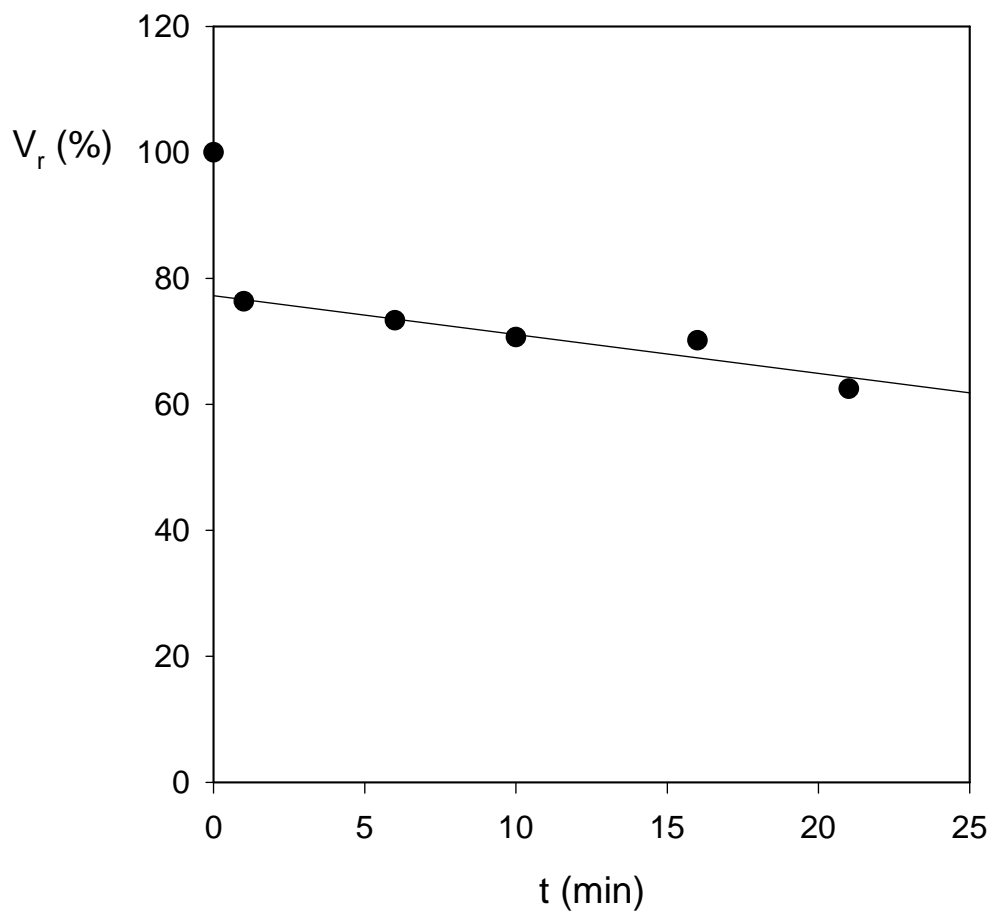
TABLA A4.9

Inactivación térmica a 40°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

t	V₀^a	V_f^b	V_r
(min)	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)
0	0,311	0,126	100
1	0,321	0,099	76,35
6	0,344	0,102	73,31
10	0,348	0,099	70,66
16	0,318	0,090	70,14
21	0,326	0,082	62,48

(a) Velocidad de la reacción enzimática antes de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

(b) Velocidad de la reacción enzimática después de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

**FIGURA A4.9**

Inactivación térmica a 40°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura de 40°C.

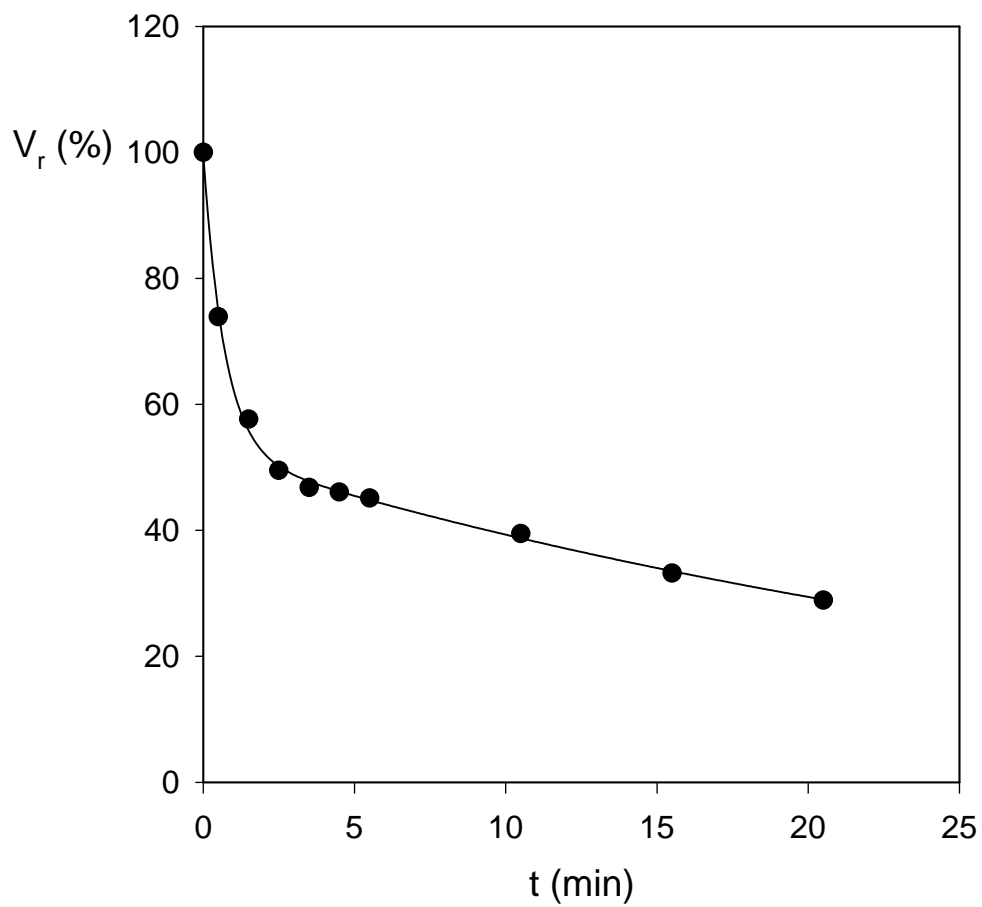
TABLA A4.10

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

t	V ₀ ^a	V _f ^b	V _r
(min)	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)
0	0,639	0,210	100
1	0,671	0,163	73,89
2	0,669	0,127	57,66
3	0,658	0,107	49,50
4	0,644	0,099	46,79
5	0,618	0,094	46,07
6	0,606	0,090	45,12
11	0,700	0,091	39,50
16	0,677	0,074	33,21
21	0,606	0,058	28,90

(a) Velocidad de la reacción enzimática antes de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

(b) Velocidad de la reacción enzimática después de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

**FIGURA A4.10**

Inactivación térmica a 60°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura de 60°C.

TABLA A4.11

Inactivación térmica a 70°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

t	V₀^a	V_f^b	V_r
(min)	(ΔA/min)	(ΔA/min)	(%)
0	0,324	0,079	100
1	0,362	0,073	81,71
1,5	0,338	0,055	66,72
2	0,328	0,039	48,71
3	0,364	0,038	42,47
4	0,348	0,032	38,06
5	0,358	0,028	32,34
6	0,317	0,024	30,18
13	0,331	0,016	20,05
21	0,349	0,005	6,45

(a) Velocidad de la reacción enzimática antes de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

(b) Velocidad de la reacción enzimática después de calentar la muestra a la temperatura de ensayo.

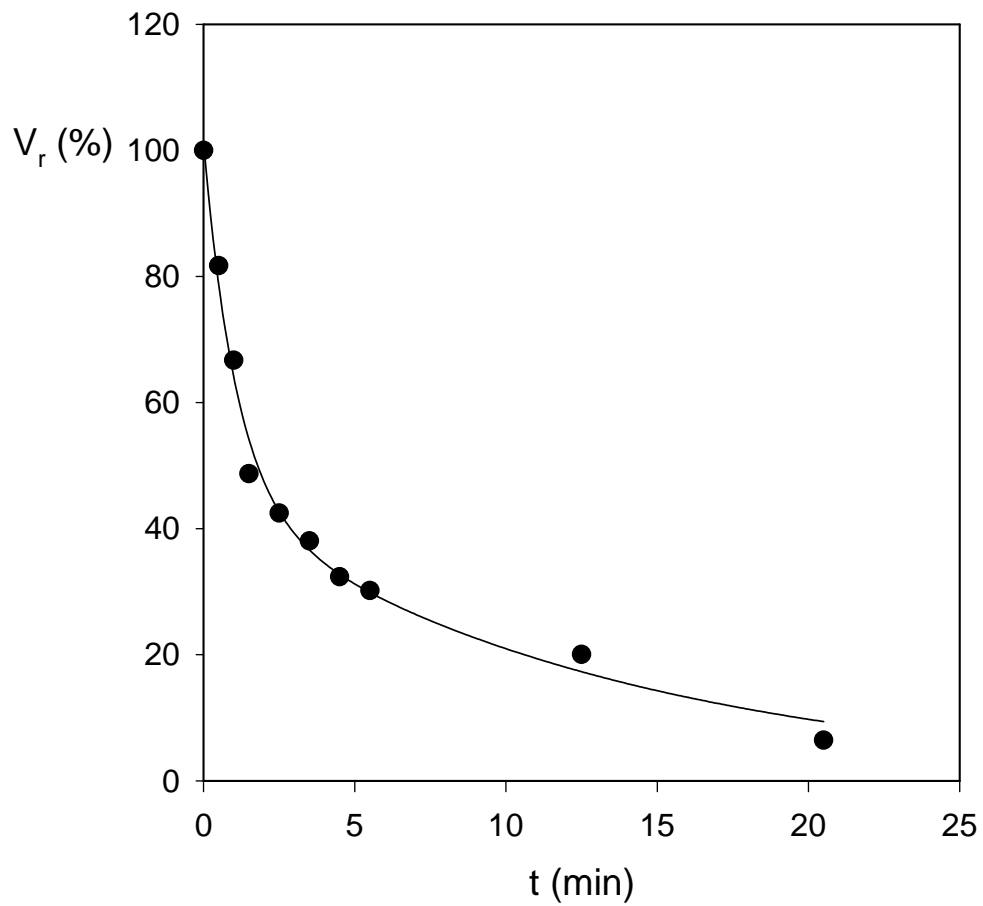


FIGURA A4.11

Inactivación térmica a 70°C de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de los datos de actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de ensayo, t (min). El ensayo se realizó en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) termostatado a la temperatura de 70°C.

TABLA A4.12

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc soluble a pH 4,5 por efecto del H₂O₂.

t	Ensayo A	Ensayo B
(min)		
1,00	0,08	0,08
2,00	0,13	0,13
3,00	0,19	0,19
4,00	0,24	0,24
5,00	0,29	0,29
6,00	0,34	0,33
7,00	0,38	0,38
8,00	0,43	0,42
9,00	0,46	0,46
10,00	0,50	0,49
11,00	0,54	0,53
12,00	0,58	0,56
13,00	0,61	0,60
14,00	0,64	0,62
15,00	0,67	0,65
16,00	0,70	0,68
17,00	0,73	0,71
18,00	0,76	0,73
19,00	0,78	0,76
20,00	0,80	0,78
21,00	0,83	0,80
22,00	0,85	0,82
23,00	0,87	0,84
24,00	0,89	0,86
25,00	0,91	0,88
26,00	0,93	0,89
27,00	0,95	0,91
28,00	0,97	0,92
29,00	0,98	0,94
30,00	1,00	0,95

Los valores aquí representados para los ensayos A y B corresponden a unidades de absorbancia medida a 414 nm.

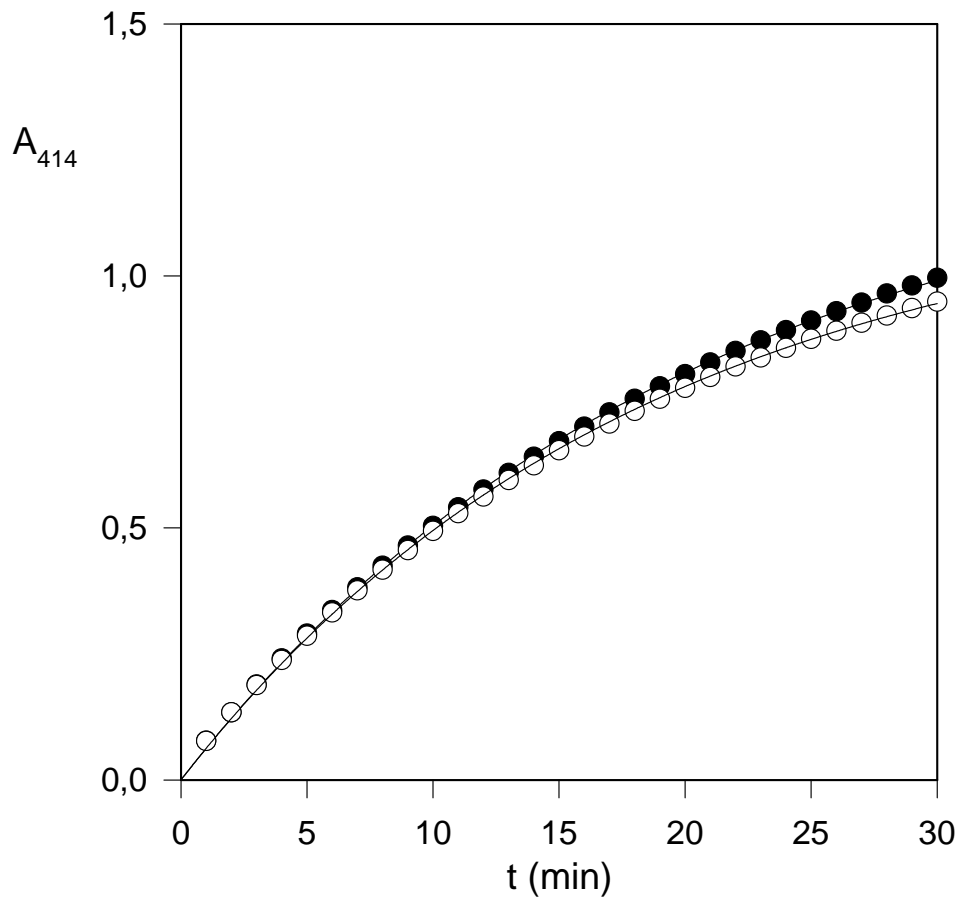


FIGURA A4.12
Inactivación de HRPc soluble a pH 4,5 por efecto del H₂O₂:
(λ) ensayo A y (O) ensayo B.

Ajuste por regresión no lineal de los datos de absorción medidos a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de reacción incluyó H₂O₂ 10 mM y ABTS 0,75 mM en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La enzima HRPc tuvo una concentración de 0,99 ng/mL. El ensayo se realizó por duplicado.

TABLA A4.13

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados abajo citados, a pH 4,5 por efecto del H₂O₂.

t	D-arabinosa	D-sorbitol	D-glucosa	ác. D-gulónico
(min)				
1,00	0,19	0,15	0,10	0,10
2,00	0,37	0,28	0,18	0,19
3,00	0,52	0,40	0,25	0,26
4,00	0,68	0,52	0,32	0,33
5,00	0,81	0,63	0,39	0,39
6,00	0,93	0,72	0,44	0,45
7,00	1,04	0,81	0,49	0,50
8,00	1,14	0,89	0,55	0,54
9,00	1,23	0,97	0,59	0,58
10,00	1,32	1,04	0,63	0,62
11,00	1,40	1,10	0,67	0,65
12,00	1,48	1,16	0,70	0,67
13,00	1,55	1,22	0,73	0,70
14,00	1,61	1,27	0,76	0,72
15,00	1,67	1,31	0,80	0,74
16,00	1,72	1,35	0,81	0,75
17,00	1,77	1,39	0,84	0,77
18,00	1,82	1,43	0,86	0,78
19,00	1,86	1,46	0,87	0,79
20,00	1,90	1,50	0,89	0,80
21,00	1,94	1,53	0,87	0,81
22,00	1,97	1,55	0,88	0,82
23,00	2,00	1,57	0,89	0,82
24,00	2,03	1,60	0,89	0,83
25,00	2,06	1,62	0,90	0,83
26,00	2,08	1,63	0,91	0,83
27,00	2,10	1,65	0,92	0,84
28,00	2,12	1,67	0,93	0,84
29,00	2,14	1,68	0,94	0,84
30,00	2,16	1,69	0,94	0,84

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de absorbancia medida a 414 nm.

TABLA A4.14

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados abajo citados, a pH 4,5 por efecto del H₂O₂.

t	D-manitol	dextrano	D-fructosa	D-glucosona
(min)				
1,00	0,03	0,03	0,18	0,28
2,00	0,06	0,05	0,30	0,46
3,00	0,08	0,07	0,43	0,66
4,00	0,11	0,09	0,55	0,85
5,00	0,14	0,10	0,66	1,02
6,00	0,16	0,12	0,75	1,16
7,00	0,18	0,13	0,84	1,29
8,00	0,20	0,15	0,91	1,40
9,00	0,21	0,16	0,98	1,51
10,00	0,22	0,17	1,04	1,60
11,00	0,24	0,18	1,09	1,68
12,00	0,25	0,18	1,13	1,71
13,00	0,24	0,19	1,18	1,78
14,00	0,25	0,19	1,21	1,83
15,00	0,26	0,20	1,25	1,88
16,00	0,27	0,21	1,28	1,92
17,00	0,28	0,21	1,30	1,96
18,00	0,29	0,21	1,32	1,99
19,00	0,30	0,22	1,34	2,02
20,00	0,31	0,22	1,36	2,05
21,00	0,31	0,22	1,33	2,07
22,00	0,32	0,23	1,34	2,09
23,00	0,33	0,23	1,35	2,10
24,00	0,33	0,23	1,36	2,11
25,00	0,34	0,23	1,37	2,13
26,00	0,34	0,23	1,37	2,13
27,00	0,36	0,23	1,38	2,15
28,00	0,36	0,24	1,38	2,15
29,00	0,36	0,24	1,39	2,15
30,00	0,37	0,24	1,39	2,16

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de absorbancia medida a 414 nm.

TABLA A4.15

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados abajo citados, a pH 4,5 por efecto del H₂O₂.

t	ác.D- glucurónico	maltosa	inulina	dextrina	sacarosa
(min)					
1,00	0,04	0,11	0,06	0,05	0,06
2,00	0,07	0,19	0,08	0,10	0,11
3,00	0,10	0,26	0,12	0,13	0,16
4,00	0,12	0,34	0,16	0,15	0,21
5,00	0,14	0,41	0,19	0,18	0,25
6,00	0,16	0,47	0,22	0,20	0,29
7,00	0,18	0,52	0,25	0,23	0,33
8,00	0,20	0,57	0,27	0,25	0,36
9,00	0,21	0,62	0,29	0,27	0,39
10,00	0,22	0,66	0,31	0,29	0,42
11,00	0,24	0,69	0,33	0,30	0,44
12,00	0,25	0,73	0,34	0,31	0,47
13,00	0,26	0,75	0,36	0,33	0,49
14,00	0,26	0,78	0,37	0,34	0,51
15,00	0,26	0,80	0,38	0,35	0,52
16,00	0,27	0,83	0,39	0,35	0,54
17,00	0,28	0,85	0,40	0,36	0,56
18,00	0,28	0,87	0,41	0,37	0,57
19,00	0,29	0,88	0,42	0,38	0,58
20,00	0,29	0,89	0,42	0,38	0,59
21,00	0,29	0,90	0,43	0,39	0,60
22,00	0,29	0,91	0,43	0,39	0,61
23,00	0,30	0,93	0,44	0,40	0,62
24,00	0,30	0,93	0,44	0,40	0,63
25,00	0,30	0,95	0,45	0,40	0,63
26,00	0,30	0,95	0,45	0,41	0,63
27,00	0,30	0,93	0,45	0,41	0,63
28,00	0,30	0,93	0,45	0,41	0,64
29,00	0,30	0,93	0,46	0,41	0,64
30,00	0,30	0,94	0,46	0,41	0,65

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de absorbancia medida a 414 nm.

TABLA A4.16

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc inmovilizada sobre los derivados cinamoilados abajo citados, a pH 4,5 por efecto del H₂O₂.

t	etil-D-glucopiranosido	2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa	1,2-O-isopropilidén- α -D-glucofuranosa	3,5,6-tricinaoil-D-glucofuranosa
(min)				
1,00	0,02	0,04	0,01	0,01
2,00	0,03	0,06	0,01	0,01
3,00	0,04	0,09	0,02	0,02
4,00	0,05	0,11	0,02	0,02
5,00	0,06	0,14	0,03	0,03
6,00	0,06	0,15	0,03	0,03
7,00	0,06	0,17	0,04	0,03
8,00	0,07	0,19	0,04	0,03
9,00	0,08	0,21	0,05	0,04
10,00	0,08	0,22	0,05	0,04
11,00	0,09	0,23	0,05	0,04
12,00	0,09	0,24	0,05	0,05
13,00	0,10	0,25	0,06	0,05
14,00	0,10	0,25	0,06	0,05
15,00	0,11	0,26	0,04	0,05
16,00	0,11	0,27	0,05	0,05
17,00	0,12	0,28	0,05	0,05
18,00	0,12	0,28	0,05	0,06
19,00	0,12	0,29	0,05	0,06
20,00	0,13	0,29	0,05	0,06
21,00	0,12	0,30	0,06	0,06
22,00	0,13	0,30	0,06	0,07
23,00	0,13	0,31	0,06	0,06
24,00	0,13	0,31	0,06	0,06
25,00	0,13	0,32	0,06	0,06
26,00	0,13	0,32	0,07	0,07
27,00	0,14	0,32	0,07	0,07
28,00	0,14	0,33	0,07	0,07
29,00	0,14	0,33	0,07	0,07
30,00	0,14	0,33	0,07	0,07

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de absorbancia medida a 414 nm.

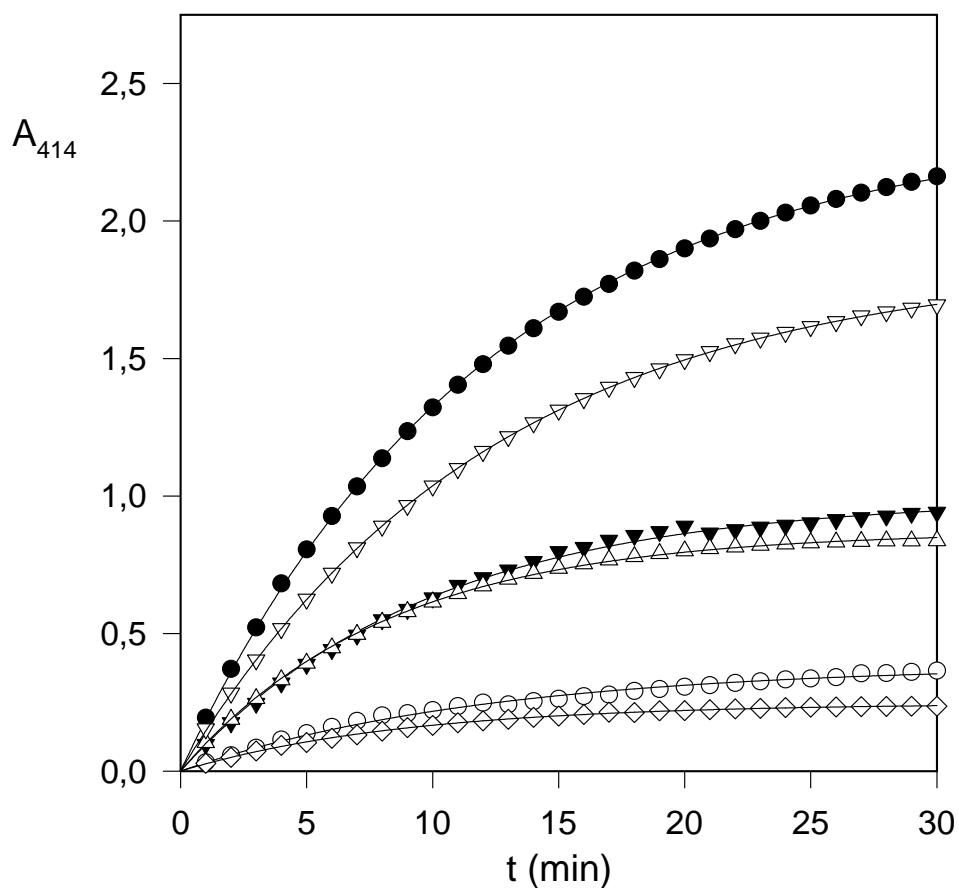


FIGURA A4.13

Inactivación por efecto del H₂O₂ de HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de: (λ) D-arabinosa, (∇) D-sorbitol, (τ) D-glucosa, (Δ) ácido D-gulónico, (O) D-manitol y (◇) dextrano.

Ajuste por regresión no lineal de los datos de absorbancia medida a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó H₂O₂ 10 mM y ABTS 0,75 mM en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5).

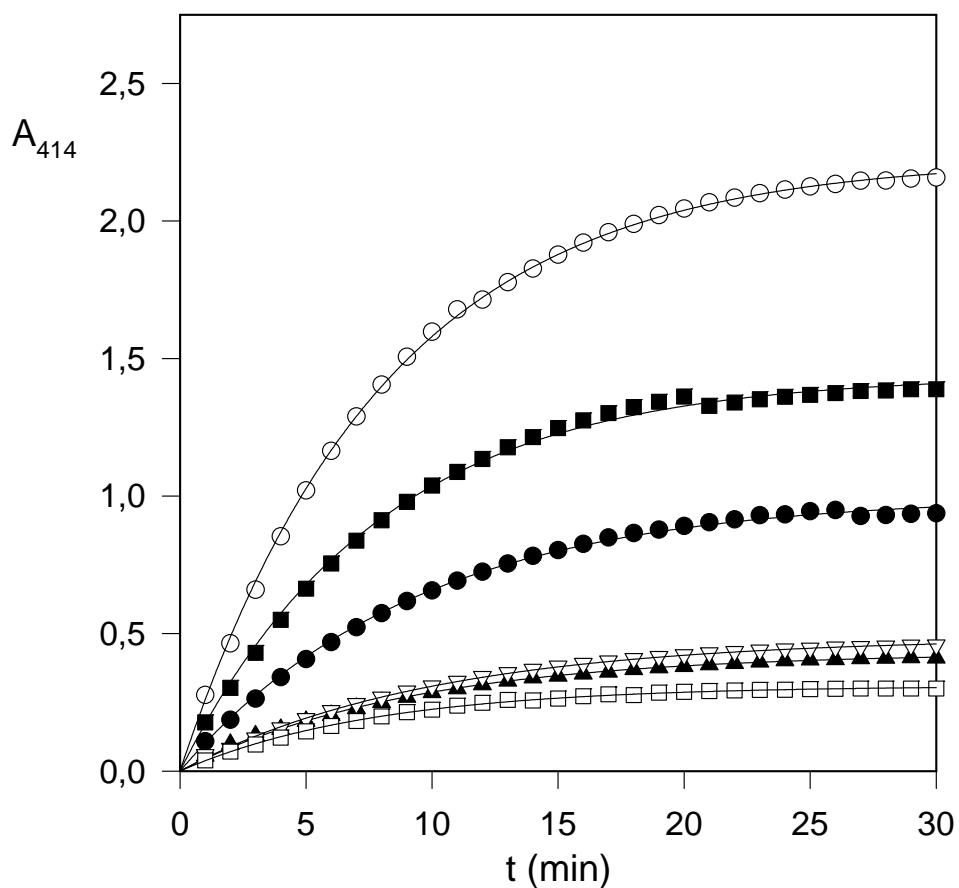


FIGURA A4.14

Inactivación por efecto del H_2O_2 de HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de: (v) D-fructosa, (O) D-glucosona, (□) ácido D-glucurónico, (λ) maltosa, (σ) dextrina e (▽) inulina.

Ajuste por regresión no lineal de los datos de absorbancia medida a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó H_2O_2 10 mM y ABTS 0,75 mM en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5).

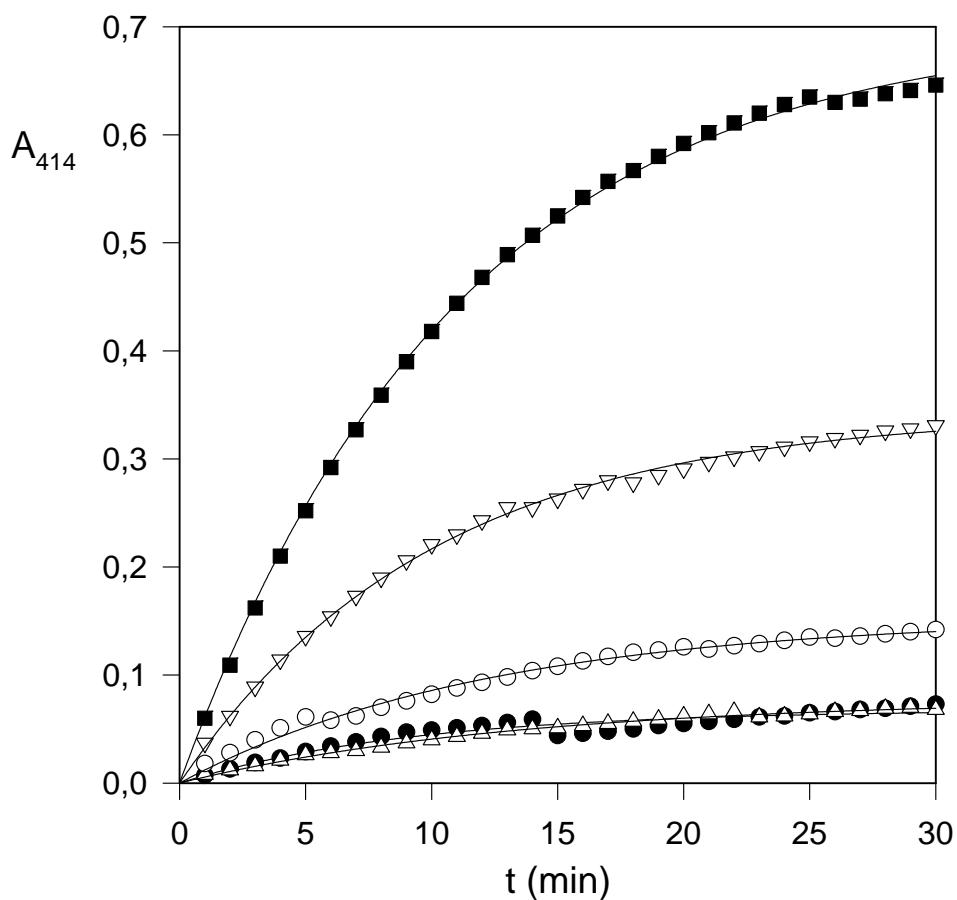


FIGURA A4.15

Inactivación por efecto del H_2O_2 de HRPc inmovilizada sobre los derivados cinamoilados de: (O) etil-D-glucopiranosido, (∇) 2,3,4,6-tetracinaoil-D-glucopiranososa, (λ) 1,2-O-isopropilidén-α-D-glucofuranosa, (Δ) 3,5,6-tricinaoil-D-glucofuranosa y (v) sacarosa.

Ajuste por regresión no lineal de los datos de absorbancia medida a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó H_2O_2 10 mM y ABTS 0,75 mM en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5).

TABLA A4.17

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc soluble a pH 7,0 por efecto del H₂O₂.

t	Ensayo A	Ensayo B
(min)		
1,00	0,03	0,04
2,00	0,07	0,07
3,00	0,11	0,11
4,00	0,14	0,14
5,00	0,17	0,17
6,00	0,20	0,20
7,00	0,22	0,22
8,00	0,24	0,24
9,00	0,26	0,25
10,00	0,27	0,26
11,00	0,28	0,27
12,00	0,29	0,28
13,00	0,30	0,29
14,00	0,30	0,29
15,00	0,31	0,29
16,00	0,31	0,30
17,00	0,31	0,30
18,00	0,31	0,30
19,00	0,31	0,29
20,00	0,31	0,29

Los valores representados para los ensayos A y B corresponden a unidades de absorbancia medida a 414 nm.

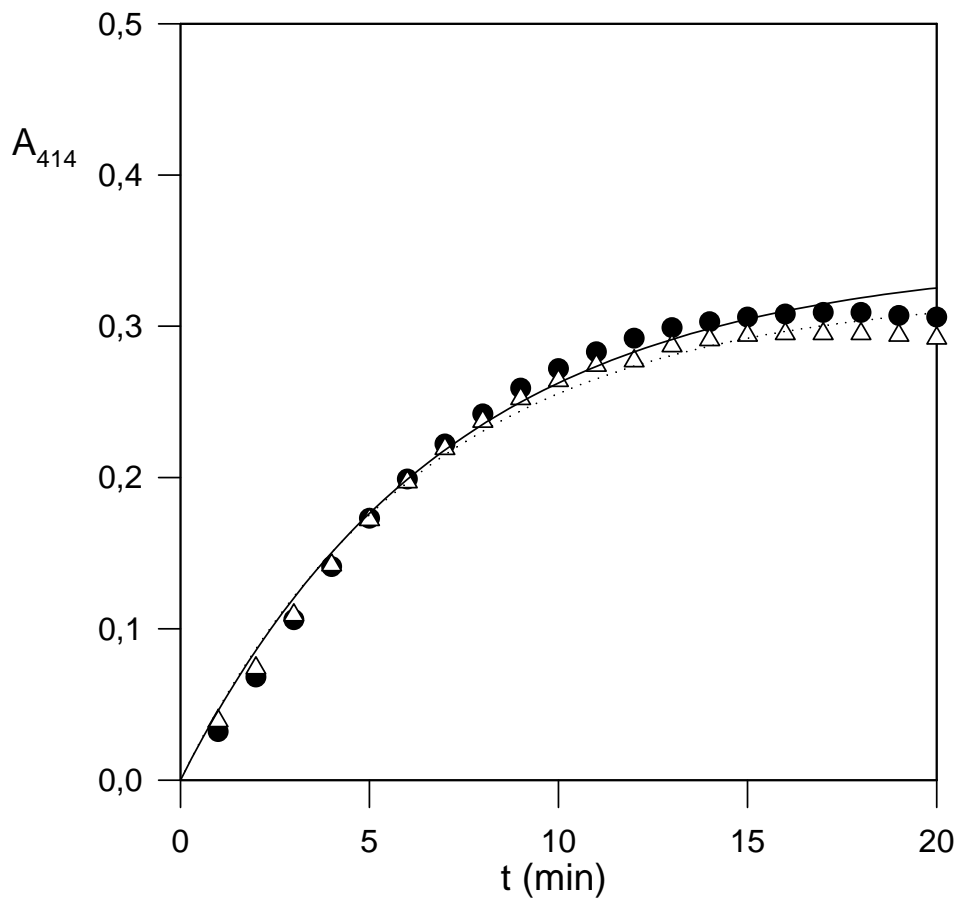


FIGURA A4.16

Inactivación de HRPc soluble a pH 7,0 por efecto del H₂O₂:

(●) ensayo A y (△) ensayo B.

Ajuste por regresión no lineal de los datos de absorción medida a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó H₂O₂ 10 mM y ABTS 0,75 mM en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0). La enzima HRPc tuvo una concentración de 9,9 ng/mL. El ensayo se realizó por duplicado.

TABLA A4.18

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados abajo citados, a pH 7,0 por efecto del H₂O₂.

t	D-glucosa	D-glucosona	inulina	dextrina
(min)				
1,00	0,01	4,00e-3	0,01	0,01
2,00	0,02	0,01	0,01	0,01
3,00	0,02	0,01	0,01	0,02
4,00	0,03	0,01	0,01	0,02
5,00	0,03	0,02	0,02	0,02
6,00	0,04	0,02	0,02	0,02
7,00	0,05	0,02	0,02	0,03
8,00	0,05	0,03	0,02	0,03
9,00	0,06	0,03	0,03	0,03
10,00	0,06	0,03	0,03	0,03
11,00	0,07	0,04	0,03	0,04
12,00	0,07	0,04	0,03	0,04
13,00	0,07	0,04	0,03	0,04
14,00	0,08	0,04	0,04	0,04
15,00	0,08	0,05	0,04	0,04
16,00	0,08	0,05	0,04	0,05
17,00	0,09	0,05	0,04	0,05
18,00	0,09	0,05	0,04	0,05
19,00	0,09	0,05	0,04	0,05
20,00	0,09	0,05	0,04	0,05
21,00	0,10	0,05	0,05	0,05
22,00	0,10	0,06	0,05	0,05
23,00	0,10	0,06	0,05	0,05
24,00	0,10	0,06	0,05	0,05
25,00	0,10	0,06	0,05	0,05
26,00	0,10	0,06	0,05	0,05
27,00	0,10	0,06	0,05	0,05
28,00	0,10	0,06	0,05	0,05
29,00	0,10	0,06	0,05	0,05
30,00	0,10	0,06	0,05	0,05

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de absorbancia medida a 414 nm.

TABLA A4.19

Valores representados para el cálculo de la constante de inactivación para la enzima HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados abajo citados, a pH 7,0 por efecto del H₂O₂.

t	D-sorbitol	D-fructosa	etil-D-glucopiranosido
(min)			
1,00	0,02	0,01	4,00e-3
2,00	0,03	0,03	0,01
3,00	0,05	0,04	0,01
4,00	0,06	0,05	0,01
5,00	0,07	0,05	0,02
6,00	0,08	0,06	0,02
7,00	0,09	0,07	0,02
8,00	0,10	0,08	0,02
9,00	0,11	0,09	0,03
10,00	0,12	0,09	0,03
11,00	0,13	0,10	0,03
12,00	0,13	0,10	0,03
13,00	0,14	0,11	0,04
14,00	0,14	0,11	0,04
15,00	0,14	0,12	0,04
16,00	0,15	0,12	0,04
17,00	0,15	0,12	0,04
18,00	0,15	0,12	0,05
19,00	0,15	0,13	0,05
20,00	0,16	0,13	0,05
21,00	0,16	0,13	0,05
22,00	0,16	0,13	0,05
23,00	-----	0,13	0,05
24,00	-----	0,13	0,05
25,00	-----	0,13	0,05

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de absorbancia medida a 414 nm.

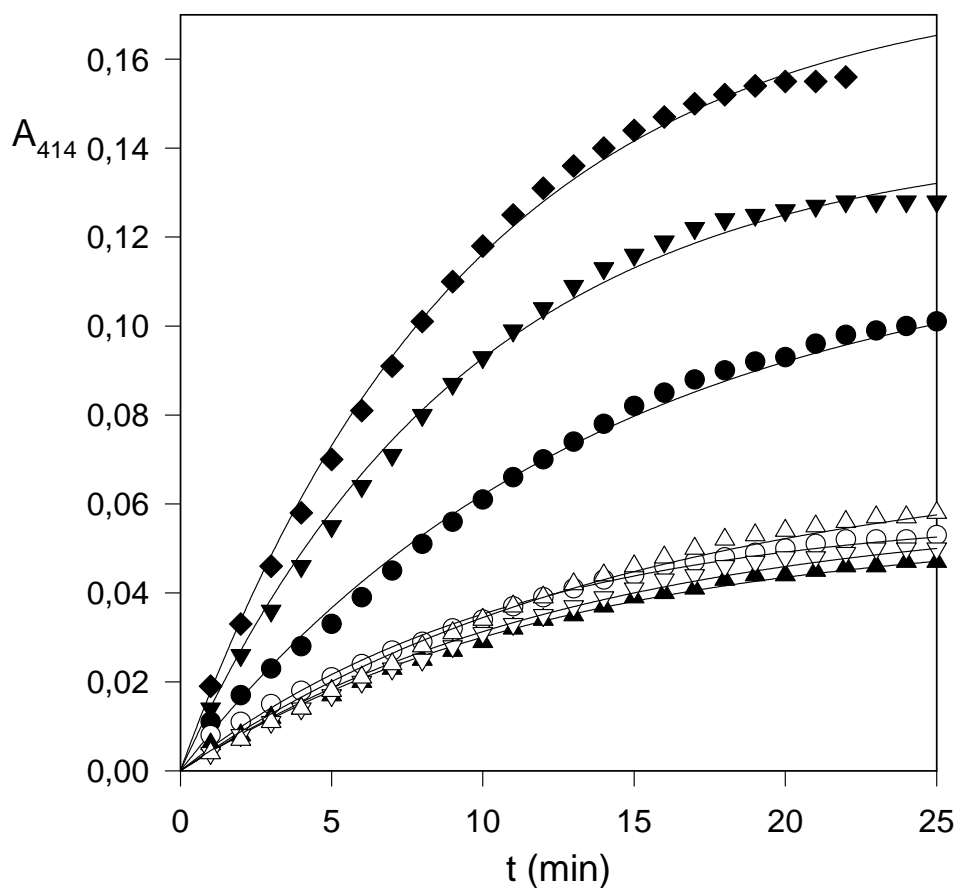


FIGURA A4.17

Inactivación por efecto del H_2O_2 de HRPc inmovilizada sobre los derivados totalmente cinamoilados de: (u) D-sorbitol, (λ) D-glucosa, (τ) D-fructosa, (Δ) D-glucosona, (▽) etil-D-glucopiranosido, (σ) inulina y (O) dextrina.

Ajuste por regresión no lineal de los datos de absorbancia medida a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (min). El medio de ensayo incluyó H_2O_2 10 mM y ABTS 0,75 mM en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).

TABLA A4.20

Efecto de la composición del medio de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Condiciones de almacenado	t_{almacenado}	V₀	V_f	V_r
		($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
Agua destilada	1h30min	0,603	0,288	100
Agua destilada	7 días	0,635	0,220	72,55
Seca con P₂O₅ 2 horas + Agua destilada	7 días	0,634	0,201	66,25
Seca con P₂O₅ 2 horas	7 días	0,654	0,184	58,92
Tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5)	7 días	0,597	0,028	9,82
Tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0)	7 días	0,642	0,027	8,82
Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1)	7 días	0,613	0,151	51,65

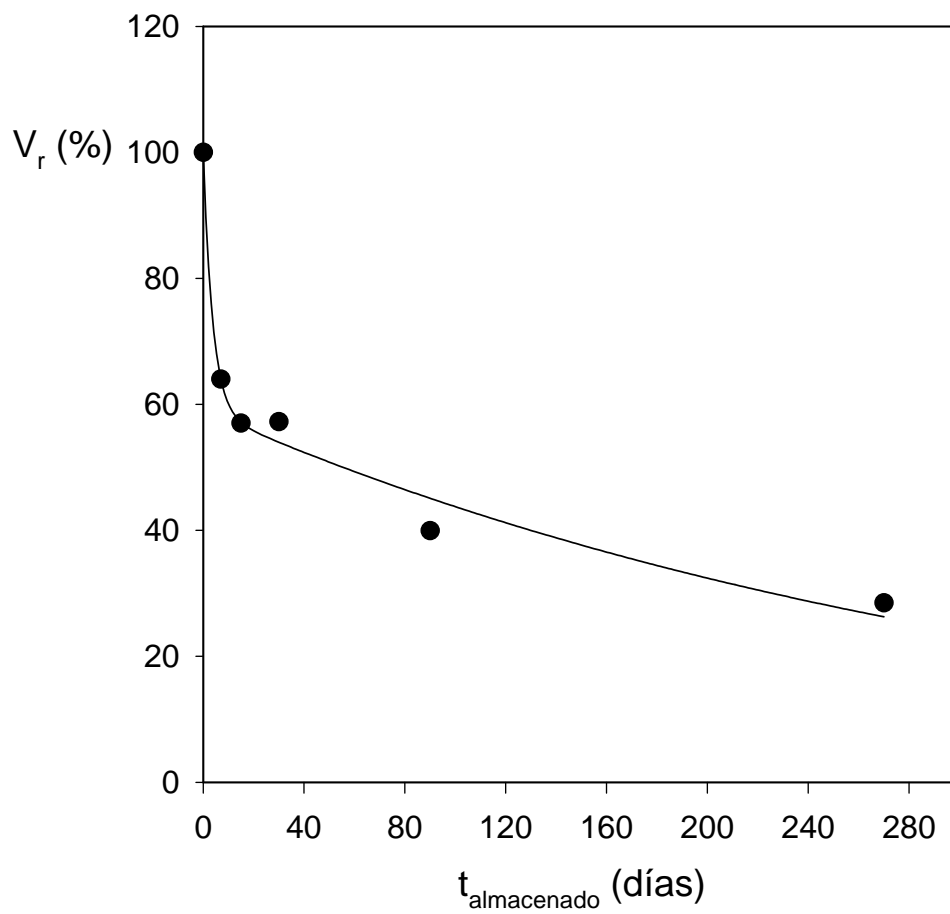
En todos los casos el almacenado se realizó con 5 mL del medio de almacenado correspondiente. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -18°C , durante el tiempo arriba citado.

TABLA A4.21

**Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc
inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.**

$t_{\text{almacenado}}$	V_0 ($\Delta A/min$)	V_f ($\Delta A/min$)	V_r (%)
1 hora	0,932	0,415	100
7 días	0,904	0,258	64,00
15 días	0,881	0,224	57,00
30 días	0,917	0,234	57,24
90 días	0,926	0,165	39,93
90 días	(0,899)	0,306	76,44
270 días	0,915	0,116	28,48

En todos los casos el almacenado se realizó con 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -18°C , durante el tiempo arriba citado.

**FIGURA A4.18**

**Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la actividad enzimática de HRPc
inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.**

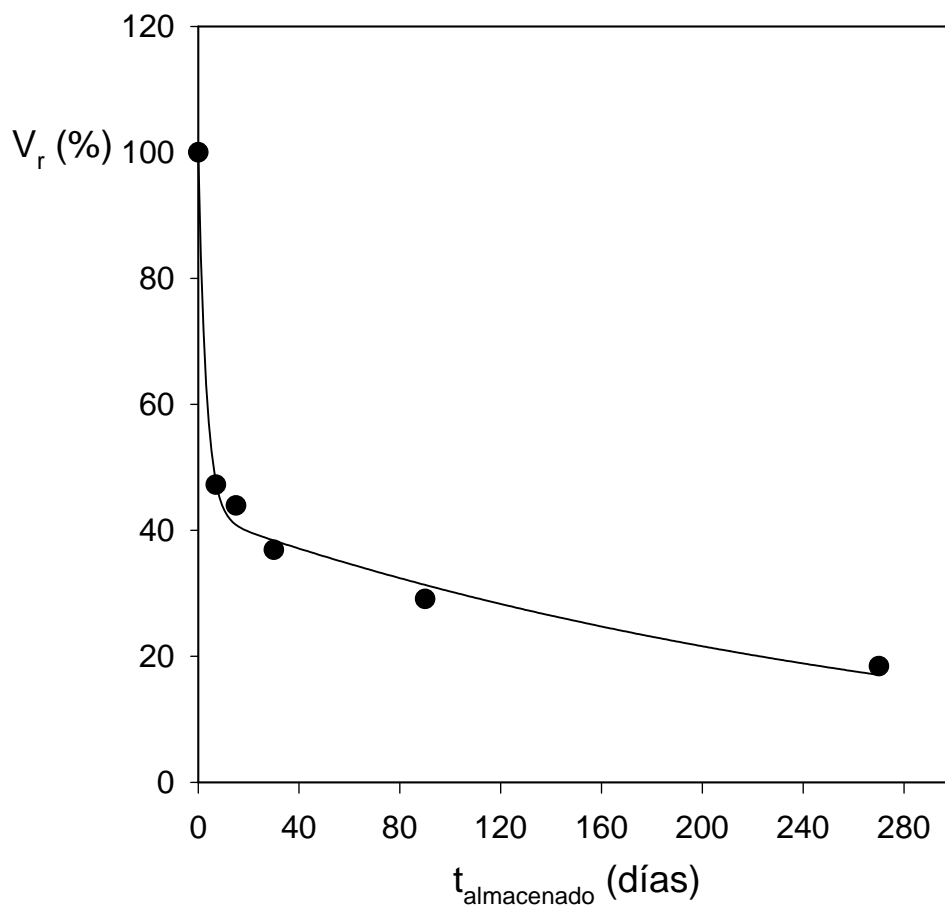
Representación de la actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de almacenamiento, $t_{\text{almacenado}}$ (días). El medio de almacenamiento estuvo compuesto por 5 mL de H₂O destilada. El almacenamiento se realizó a -18°C .

TABLA A4.22

Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

$t_{\text{almacenado}}$	V_0	V_f	V_r
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
1 hora	0,650	0,373	100
7 días	0,641	0,173	47,22
15 días	0,675	0,170	43,95
30 días	0,683	0,145	36,89
90 días	0,680	0,113	29,09
90 días	(0,670)	0,163	42,45
270 días	0,676	0,071	18,43

En todos los casos el almacenado se realizó con 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -18°C , durante el tiempo arriba citado.

**FIGURA A4.19**

**Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc
inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.**

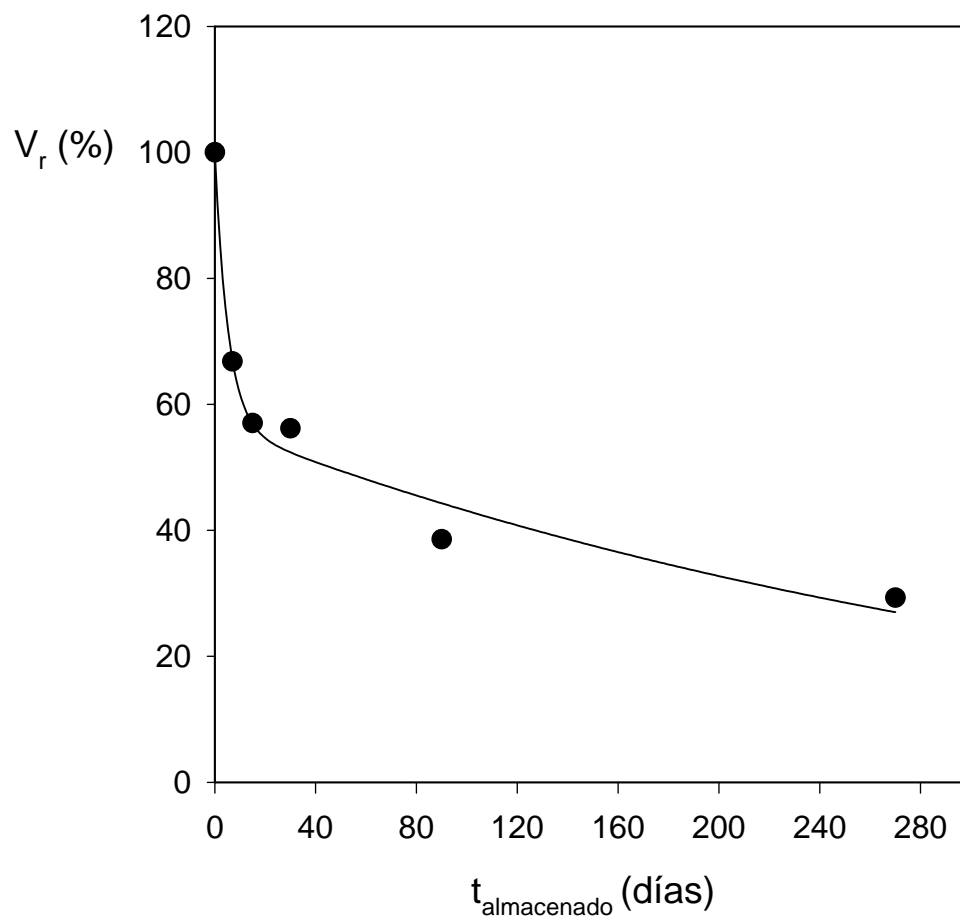
Representación de la actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de almacenado, $t_{\text{almacenado}}$ (días). El medio de almacenado estuvo compuesto por 5 mL de H₂O destilada. El almacenado se realizó a -18°C .

TABLA A4.23

Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

$t_{\text{almacenado}}$	V_0	V_f	V_r
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
1 hora	0,633	0,284	100
7 días	0,615	0,185	66,79
15 días	0,598	0,153	57,00
30 días	0,578	0,146	56,20
90 días	0,623	0,108	38,58
90 días	(0,647)	0,216	74,16
270 días	0,619	0,082	29,32

En todos los casos el almacenado se realizó con 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -18°C , durante el tiempo arriba citado.

**FIGURA A4.20**

**Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la actividad enzimática de HRPc
inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.**

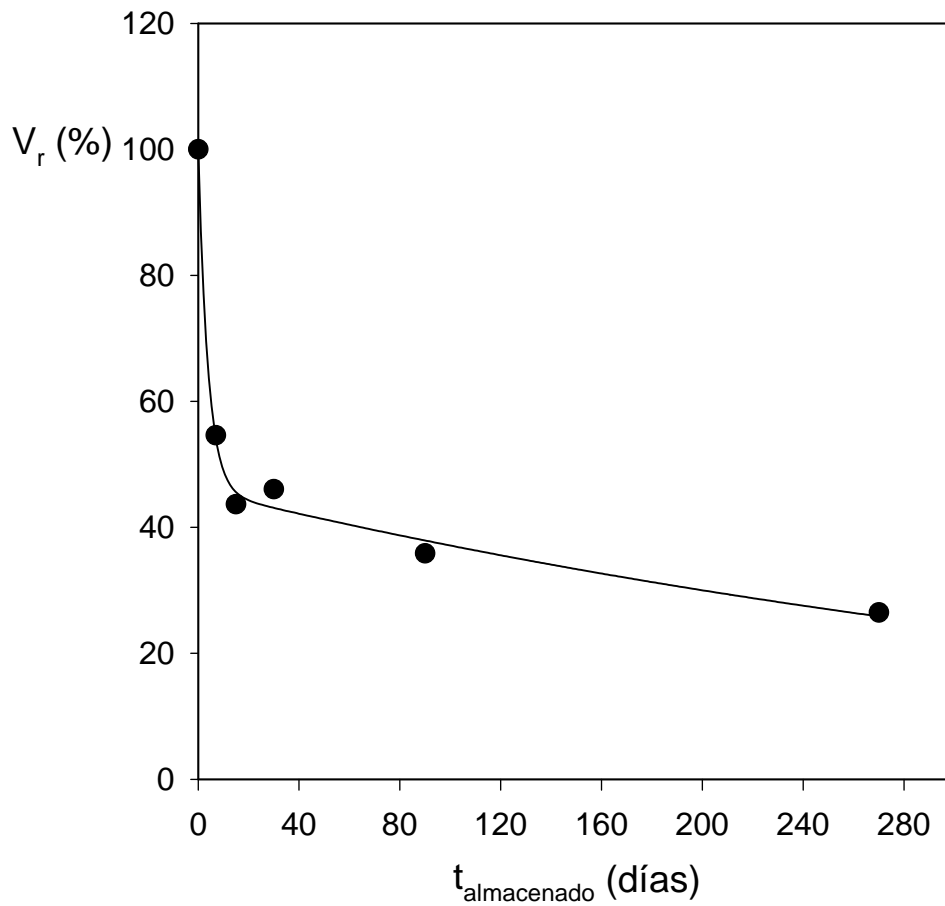
Representación de la actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de almacenamiento, $t_{\text{almacenado}}$ (días). El medio de almacenamiento estuvo compuesto por 5 mL de H₂O destilada. El almacenamiento se realizó a -18°C .

TABLA A4.24

Efecto del tiempo de almacenado sobre la actividad enzimática de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

$t_{\text{almacenado}}$	V_0	V_f	V_r
	($\Delta A/min$)	($\Delta A/min$)	(%)
1 hora	0,344	0,103	100
7 días	0,341	0,056	54,59
15 días	0,366	0,048	43,65
30 días	0,352	0,049	46,04
90 días	0,348	0,038	35,86
90 días	(0,350)	0,053	50,38
270 días	0,330	0,026	26,48

En todos los casos el almacenado se realizó con 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -18°C , durante el tiempo arriba citado.

**FIGURA A4.21**

**Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la actividad enzimática de HRPc
inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.**

Representación de la actividad enzimática residual, V_r (%), frente al tiempo de almacenamiento, $t_{\text{almacenado}}$ (días). El medio de almacenamiento estuvo compuesto por 5 mL de H₂O destilada. El almacenamiento se realizó a -18°C .

TABLA A4.25

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app}
para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de HRPc soluble.

[ABTS]	V_0
(μM)	($\mu M/min$)
25	2,57
50	5,27
100	8,07
200	10,23
300	10,97
400	12,28
500	12,35

El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La concentración de H_2O_2 en el medio de ensayo fue de 150 μM , la de ABTS osciló entre 25-500 μM y la de HRPc fue de 20 ng/mL. Los resultados mostrados, para cada concentración de ABTS, se aportan como el valor medio de tres medidas realizadas.

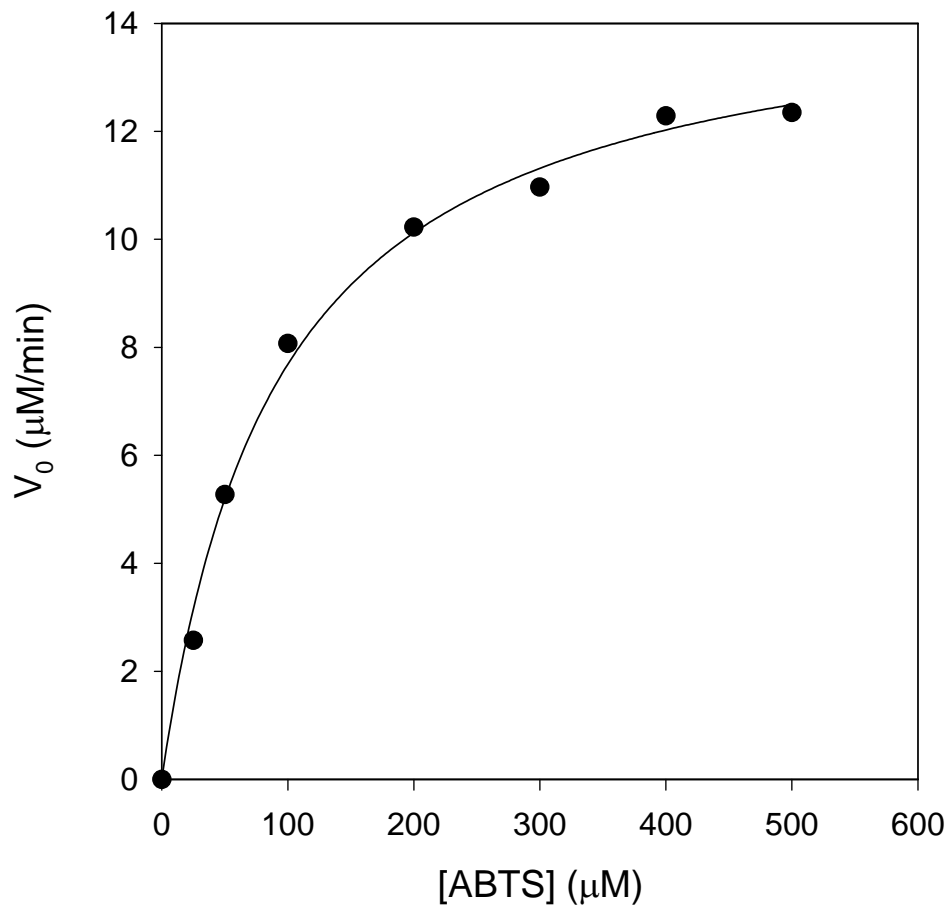


FIGURA A4.22

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de HRPc soluble.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de ABTS, $[\text{ABTS}]$ (μM). El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 150 μM , la de ABTS osciló entre 25-500 μM , mientras que la de la enzima HRPc fue de 20 ng/mL.

TABLA A4.26

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app}
para H_2O_2 y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de HRPc soluble.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$	V_0
(μM)	($\mu\text{M}/\text{min}$)
25	3,47
50	6,40
75	8,52
100	9,23
150	9,29
200	10,29
250	10,71

El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). La concentración de ABTS en el medio de ensayo fue de 500 μM , la de H_2O_2 osciló entre 25-250 μM y la de HRPc fue de 20 ng/mL. Los resultados mostrados, para cada concentración de H_2O_2 , se aportan como el valor medio de tres medidas realizadas.

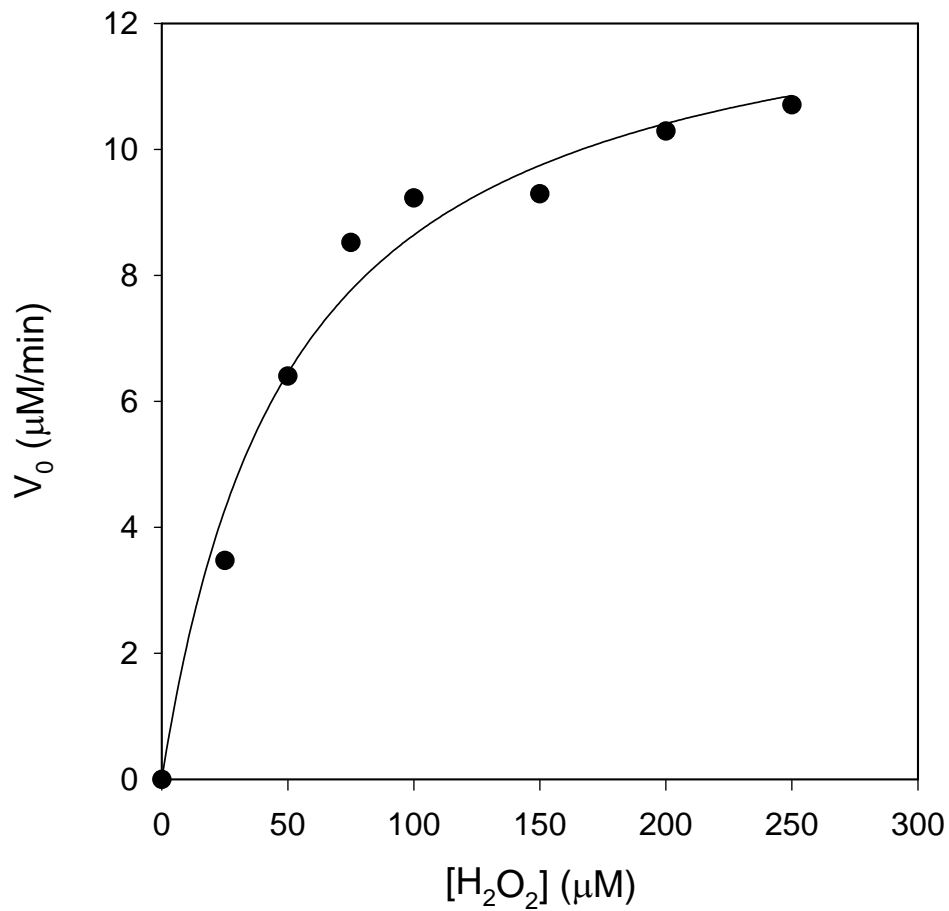


FIGURA A4.23

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de HRPc soluble.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de H_2O_2 , $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM). El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de ABTS fue de 500 μM , la de H_2O_2 osciló entre 25-250 μM , mientras que la de la enzima HRPc fue de 20 ng/mL.

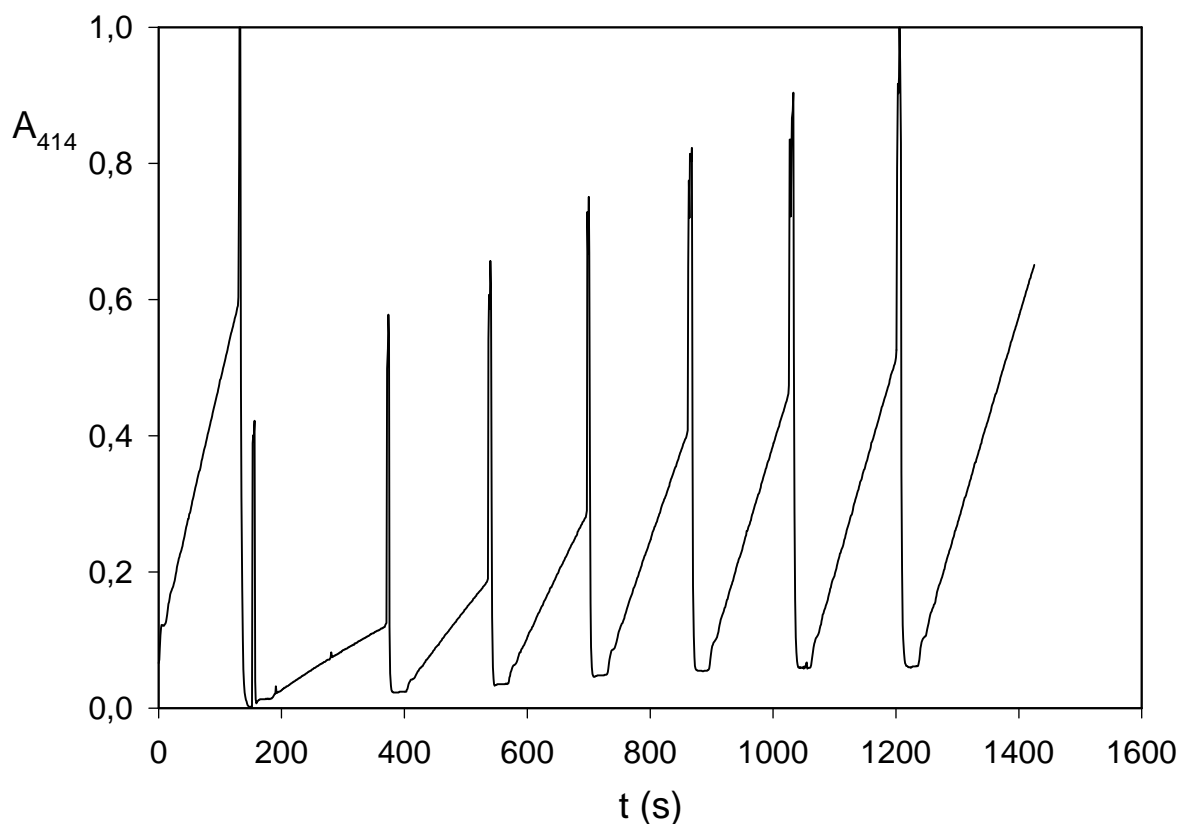


FIGURA A4.24

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-fructosa.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 400 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

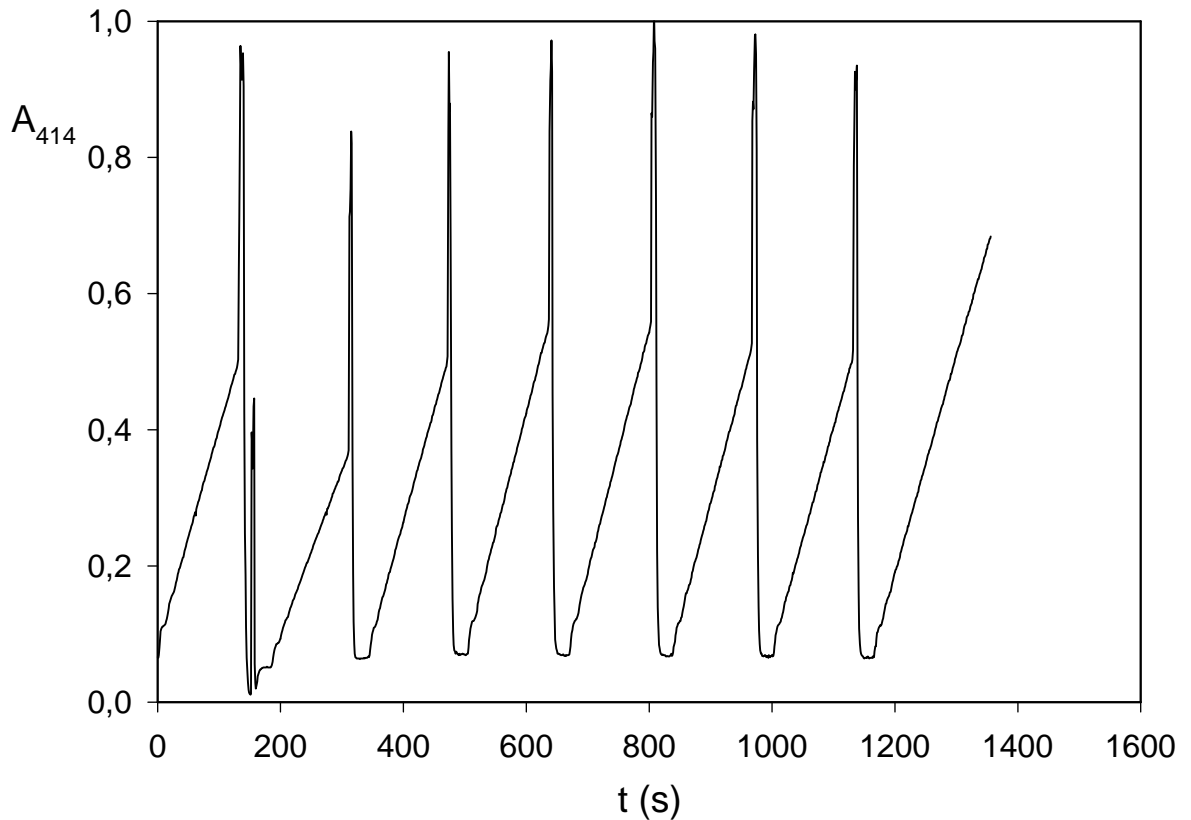


FIGURA A4.25

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y V_m^{app} de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-fructosa.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de ABTS fue de 500 μM , mientras que la concentración de H_2O_2 osciló entre 50-400 μM .

TABLA A4.27

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-fructosa.

[ABTS]	V_0
(μM)	($\mu M/min$)
25	1,03
50	2,03
100	3,28
200	4,57
300	5,27
400	5,56
500	5,63

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.24.

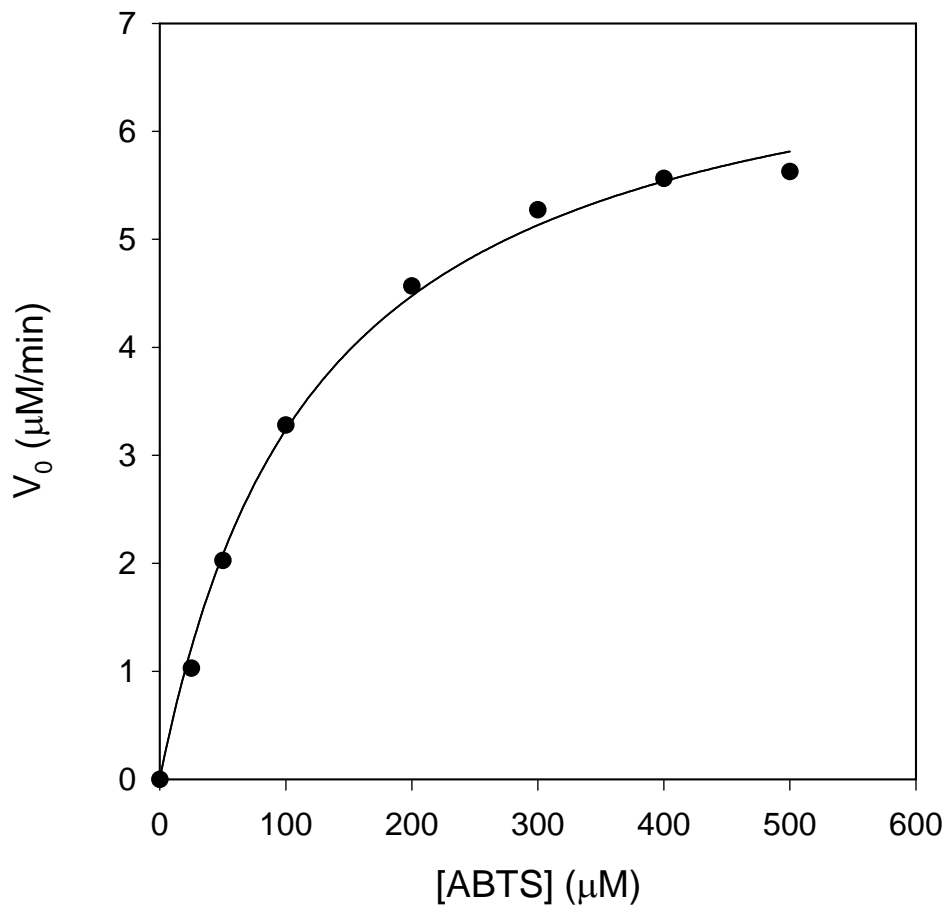


FIGURA A4.26

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-fructosa.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 (μM/min), frente a la concentración de ABTS, [ABTS] (μM).

TABLA A4.28

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-fructosa.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$	V_0
(μM)	($\mu\text{M}/\text{min}$)
50	5,18
100	7,07
150	7,62
200	7,69
250	7,75
300	7,81
400	7,91

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.25.

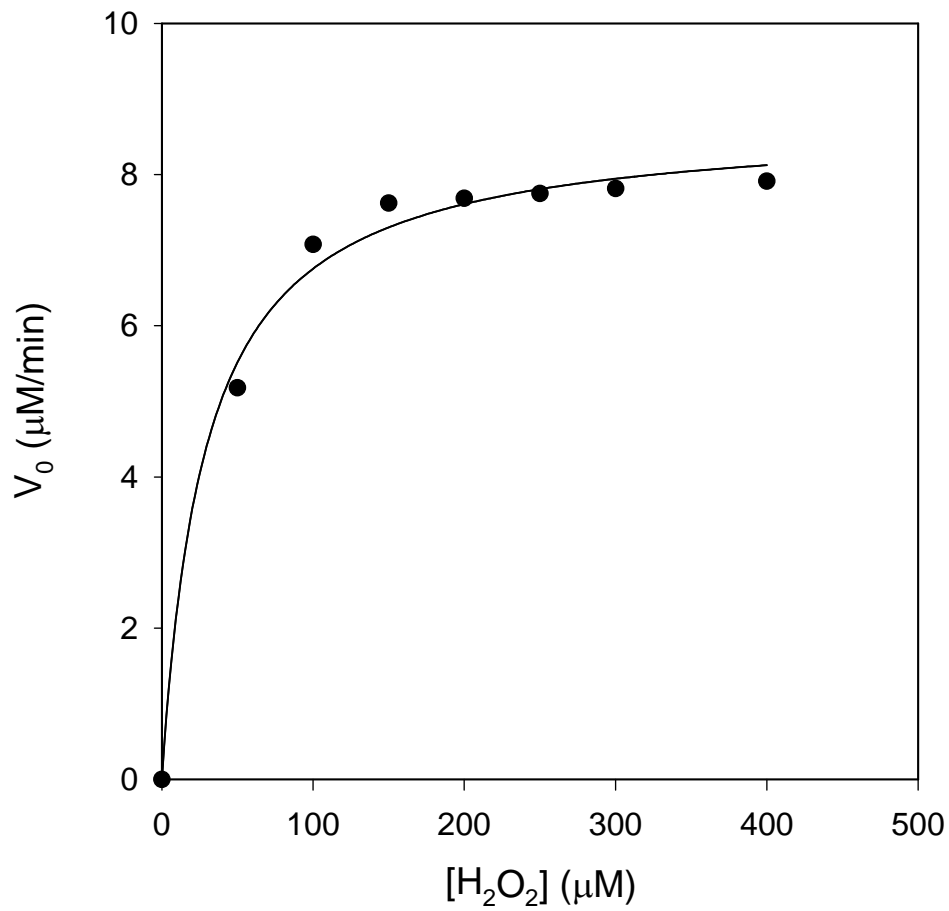


FIGURA A4.27

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-fructosa.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de H_2O_2 , $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM).

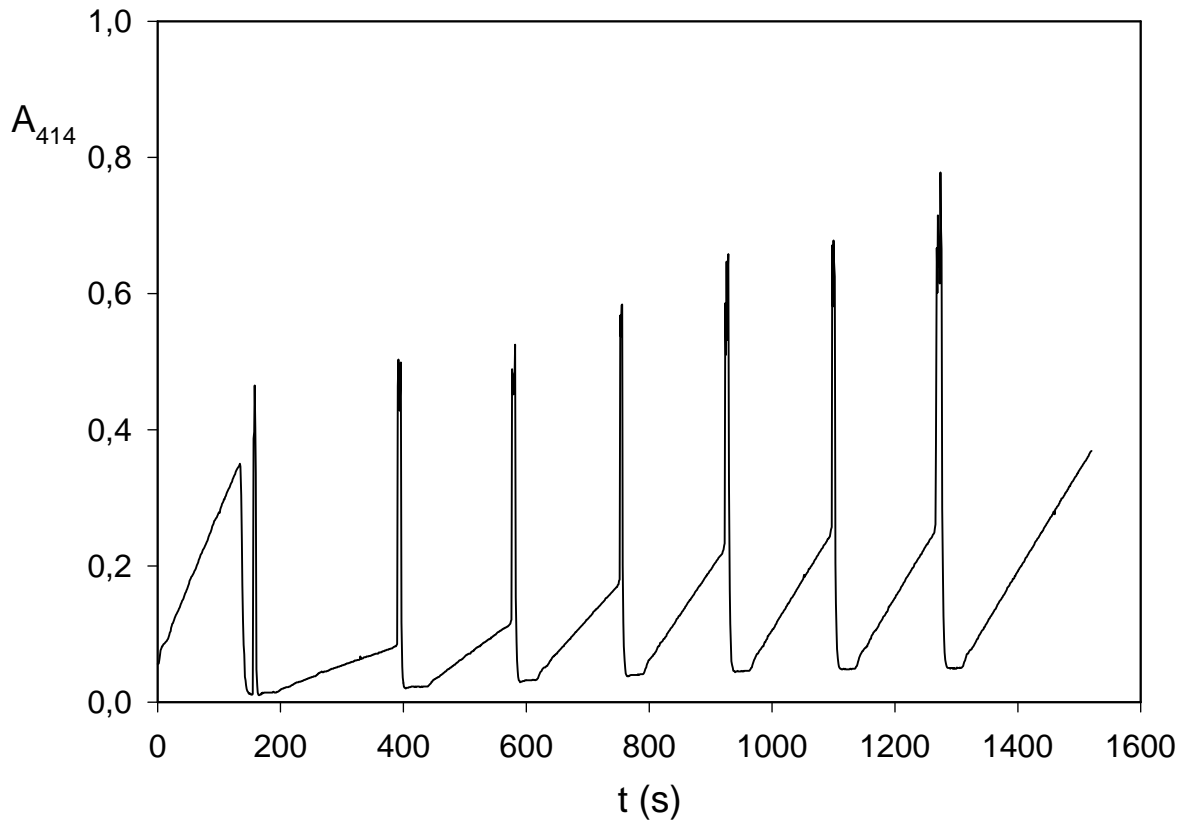


FIGURA A4.28

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 400 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

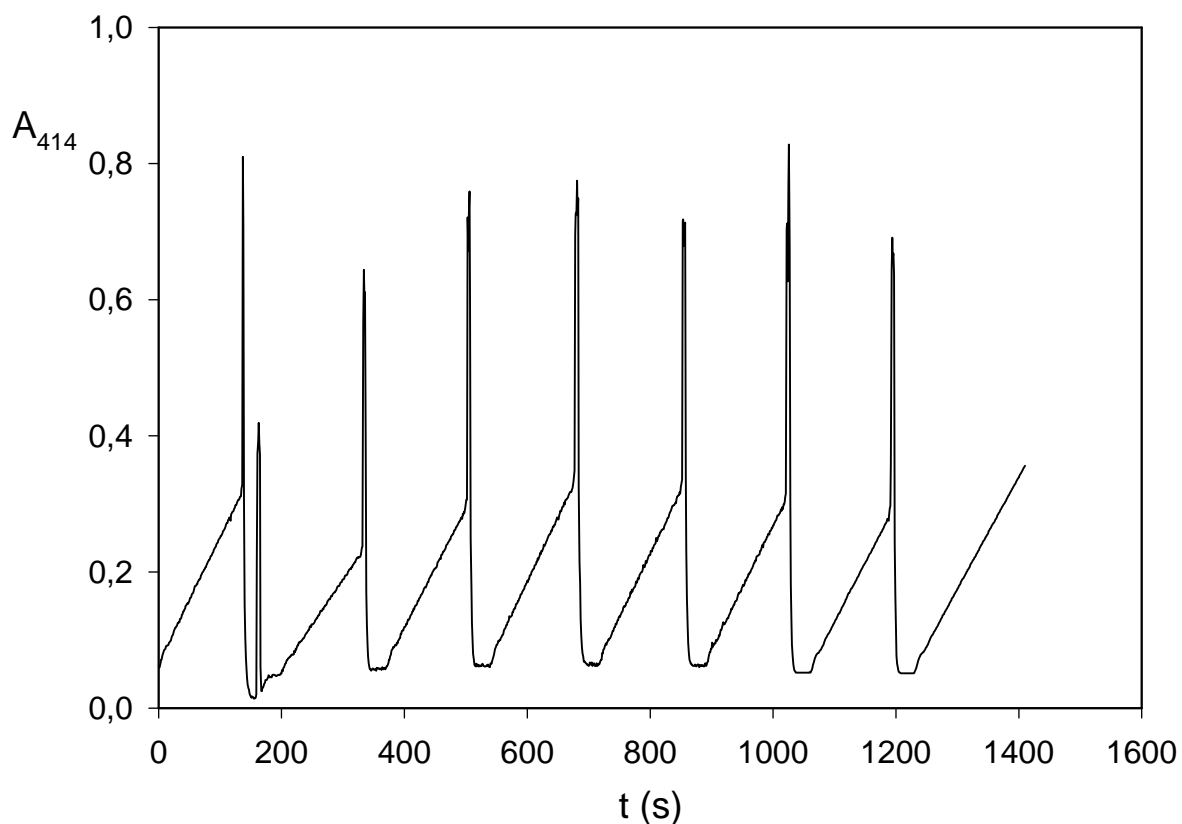


FIGURA A4.29

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y V_m^{app} de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 μ g/mL. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de ABTS fue de 500 μ M, mientras que la concentración de H_2O_2 osciló entre 50-400 μ M.

TABLA A4.29

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para ABTS y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

[ABTS]	V_0
(μM)	($\mu\text{M}/\text{min}$)
25	0,64
50	1,22
100	1,77
200	2,41
300	2,64
400	2,73
500	2,77

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.28.

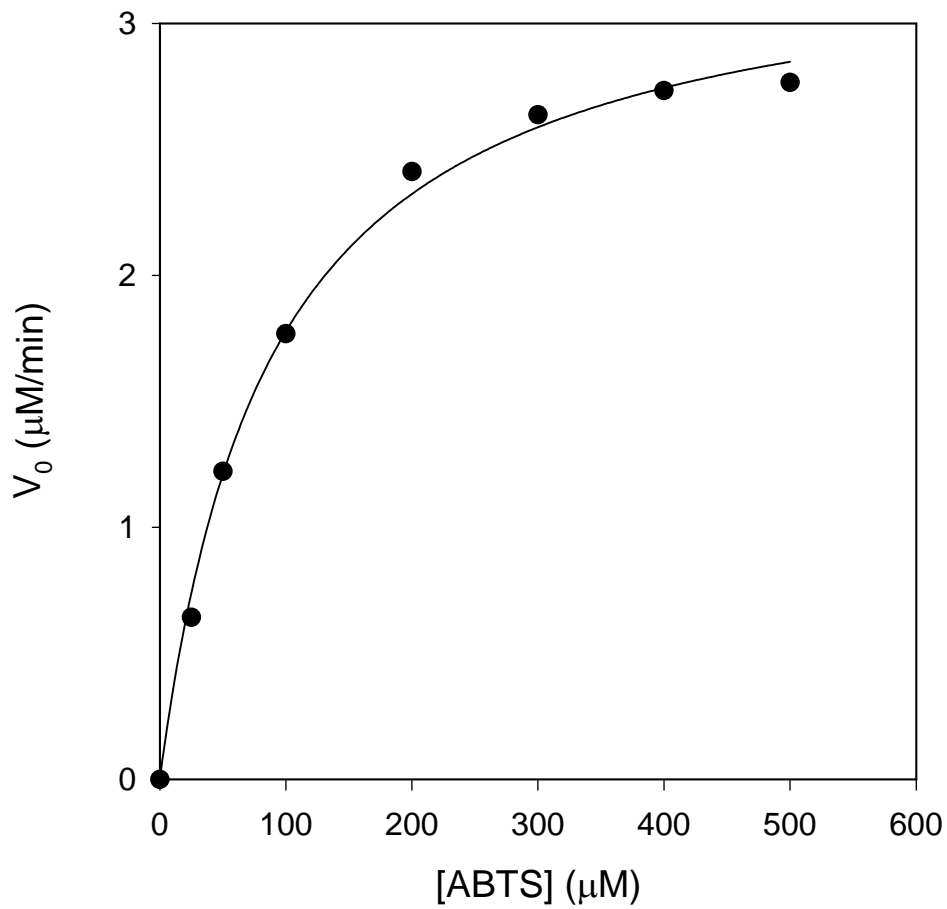


FIGURA A4.30

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 (μM/min), frente a la concentración de ABTS, [ABTS] (μM).

TABLA A4.30

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

$[\text{H}_2\text{O}_2]$	V_0
(μM)	($\mu\text{M}/\text{min}$)
50	2,83
100	3,70
150	4,02
200	3,96
250	4,02
300	4,08
400	4,15

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.29.

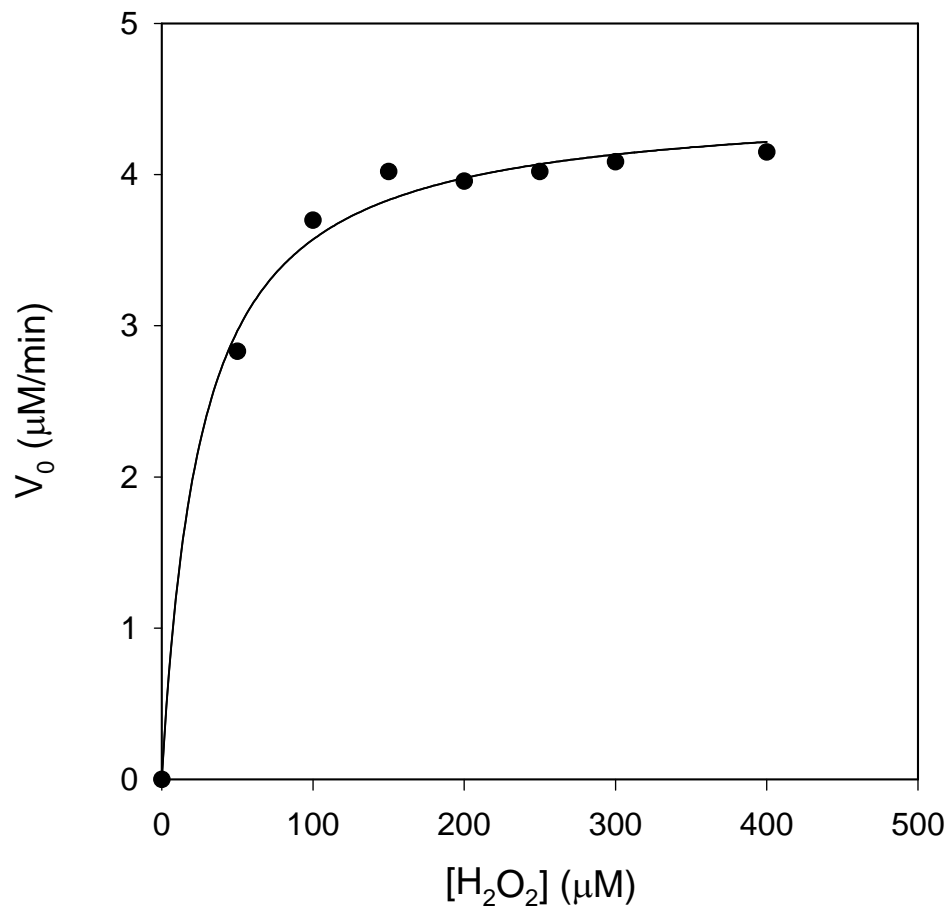


FIGURA A4.31

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosa.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de H_2O_2 , $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM).

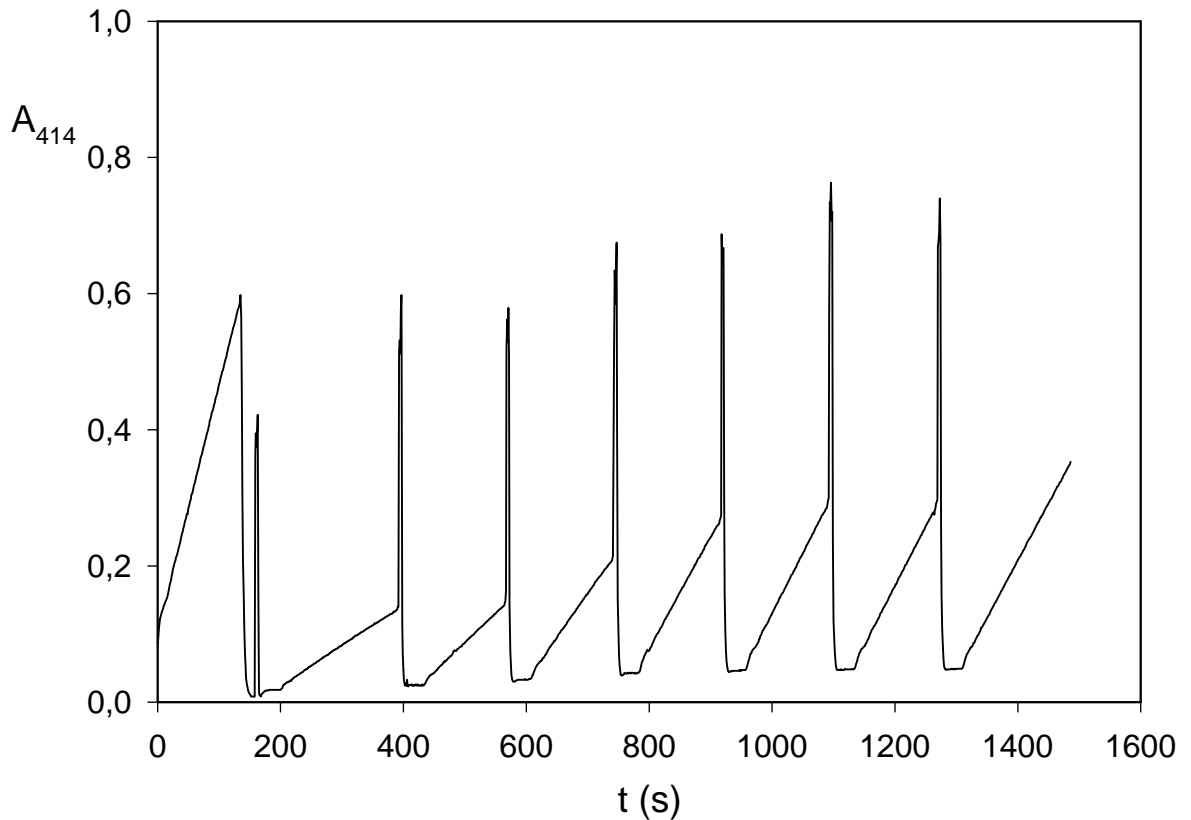


FIGURA A4.32

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 400 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

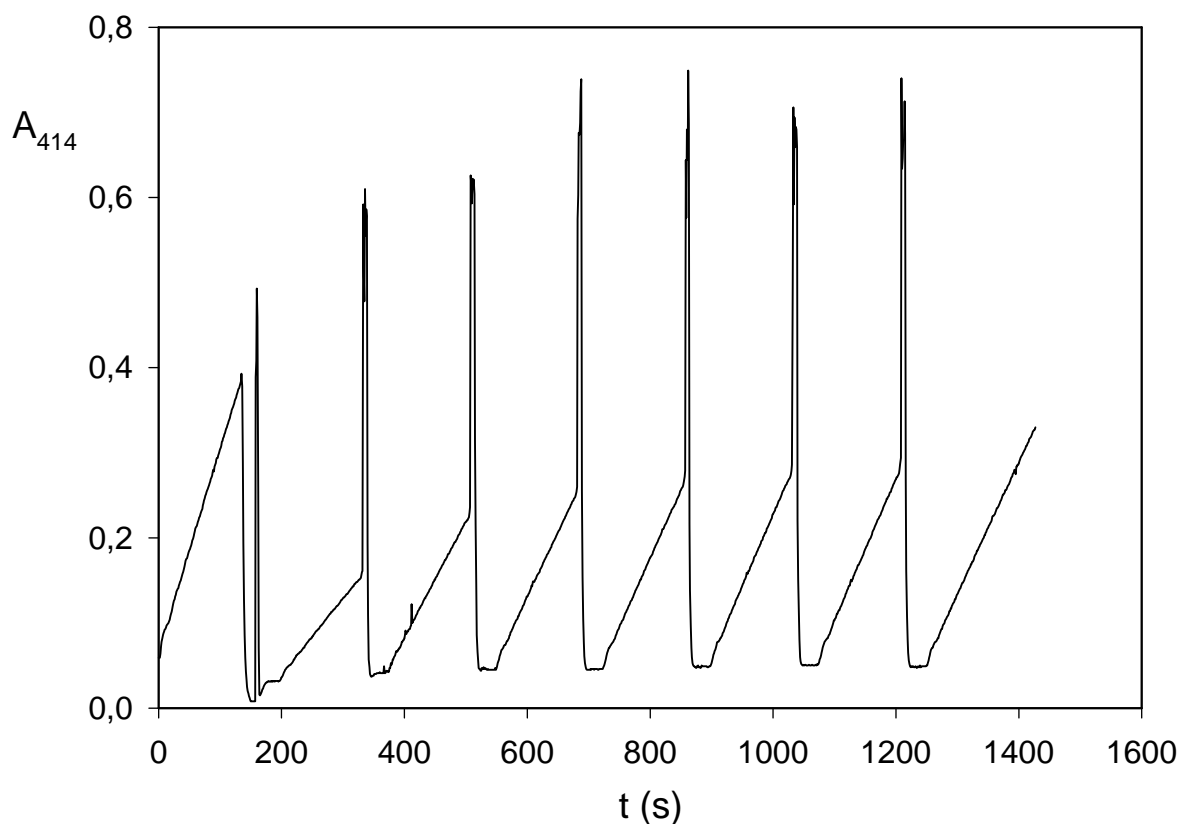


FIGURA A4.33

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y V_m^{app} de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de ABTS fue de 500 μM , mientras que la concentración de H_2O_2 osciló entre 25-250 μM .

TABLA A4.31

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

[ABTS]	V_0
(μM)	($\mu M/min$)
25	1,00
50	1,35
100	2,06
200	2,64
300	2,83
400	2,86
500	2,93

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.32.

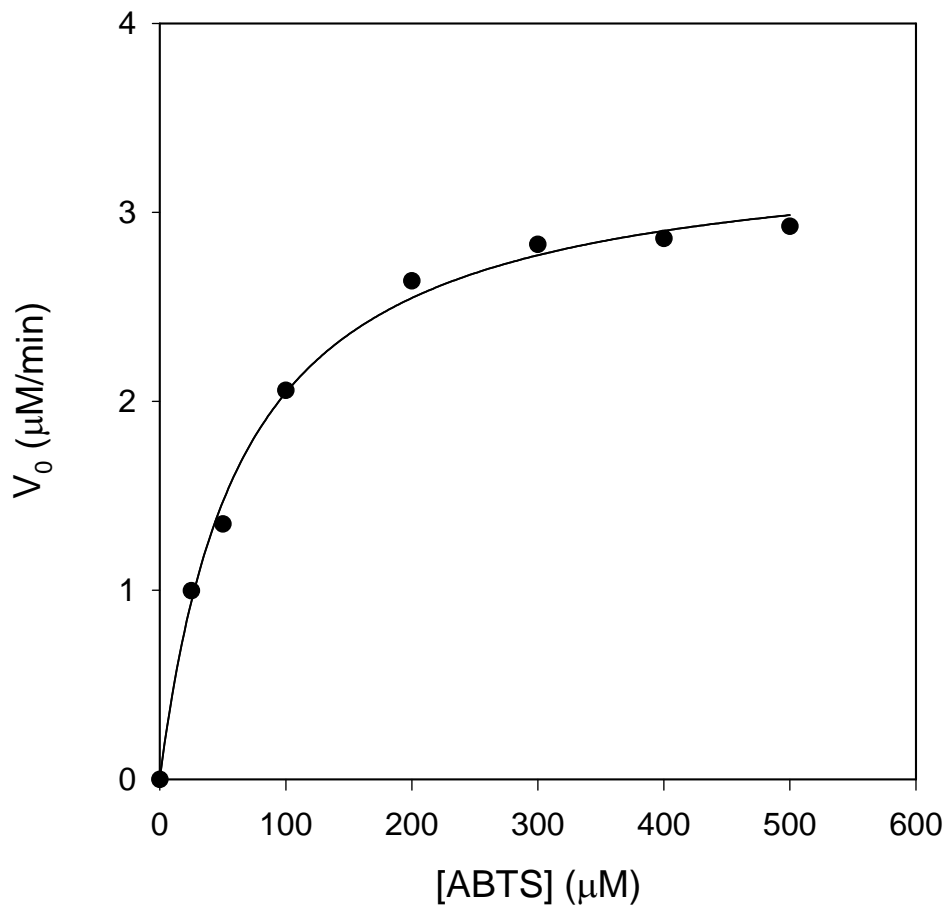


FIGURA A4.34

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de ABTS, $[\text{ABTS}]$ (μM).

TABLA A4.32

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{máx}^{app}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

[H₂O₂]	V₀
(μM)	($\mu M/min$)
25	2,25
50	3,31
75	3,76
100	3,92
150	4,12
200	4,21
250	4,28

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.33.

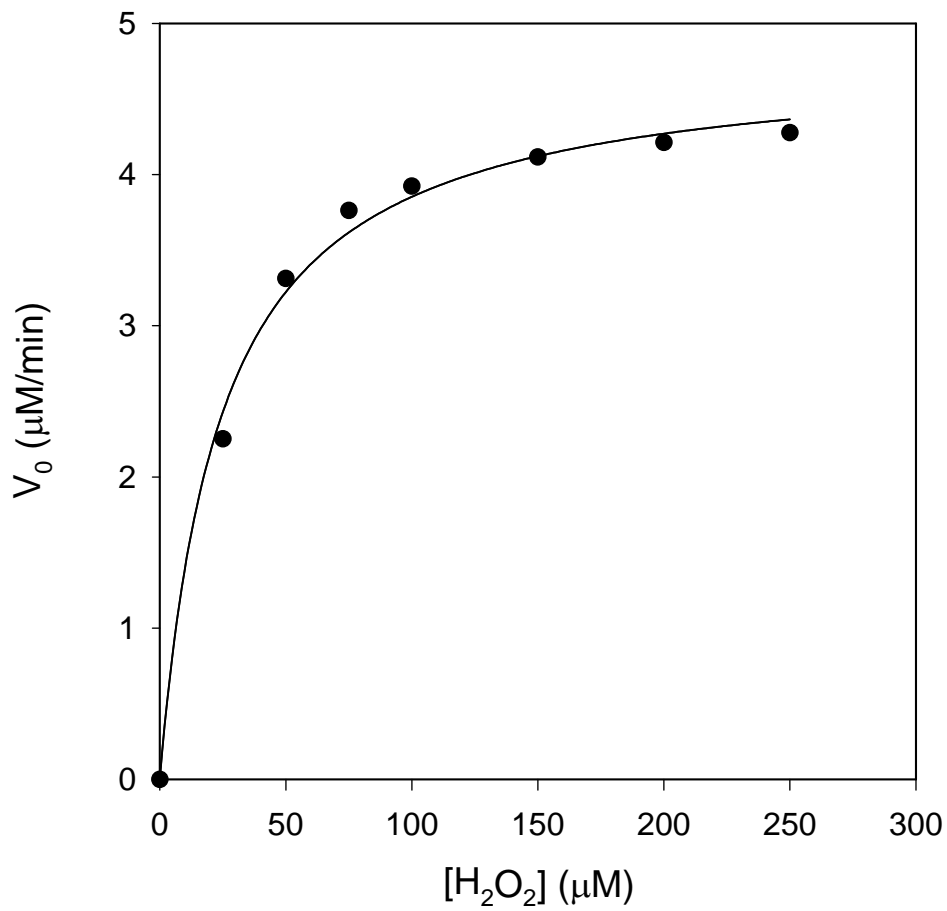


FIGURA A4.35

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{máx}^{app}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de inulina.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu M/min$), frente a la concentración de H_2O_2 , $[H_2O_2]$ (μM).

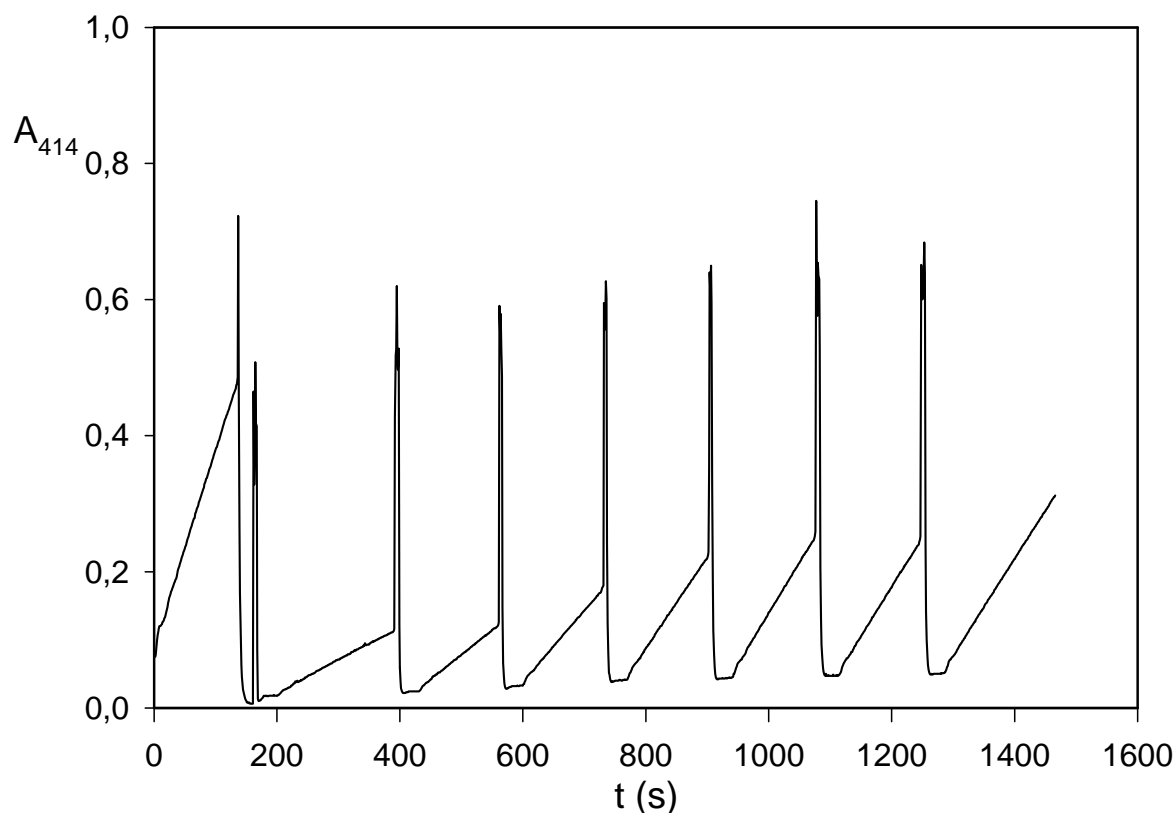


FIGURA A4.36

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 400 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

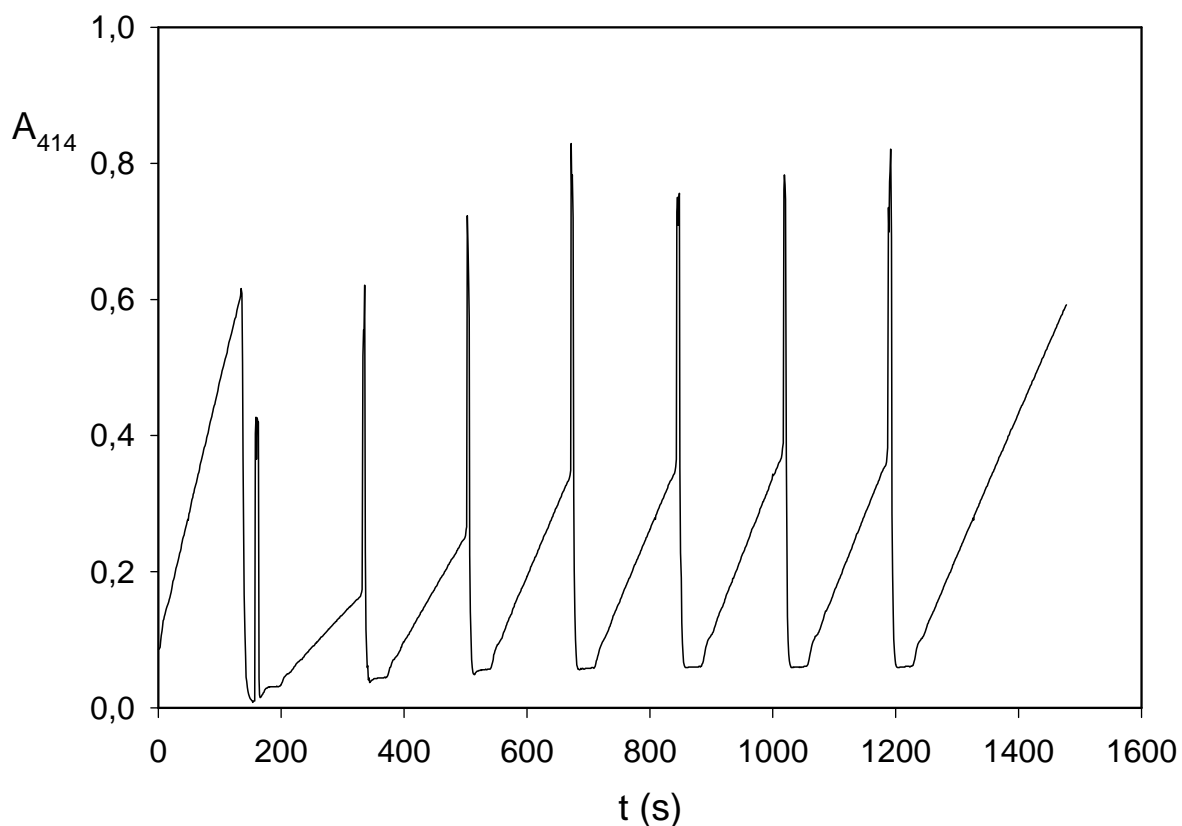


FIGURA A4.37

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y V_m^{app} de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 30 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de ABTS fue de 500 μM , mientras que la concentración de H_2O_2 osciló entre 25-250 μM .

TABLA A4.33

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para ABTS y $V_{máx}^{app}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

[ABTS]	V_0
(μM)	($\mu M/min$)
25	1,13
50	1,67
100	2,38
200	3,06
300	3,38
400	3,44
500	3,51

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.36.

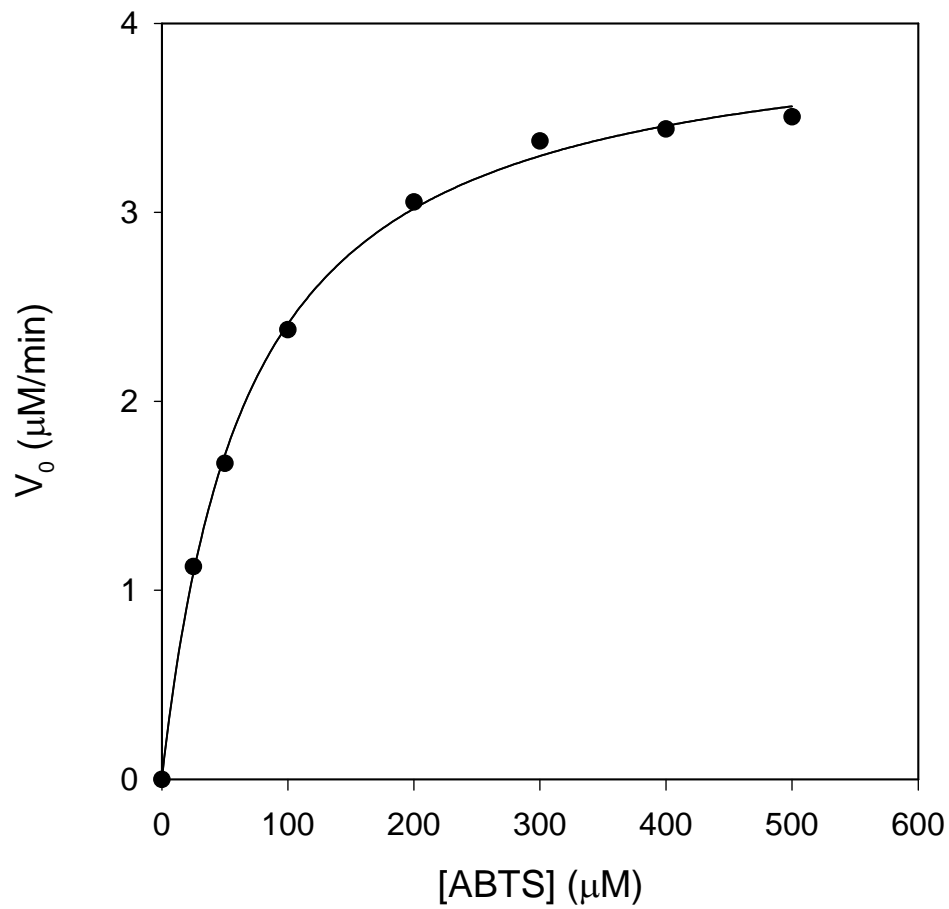


FIGURA A4.38

Cálculo de K_m^{app} para ABTS y $V_{\text{máx}}^{\text{app}}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de ABTS, [ABTS] (μM).

TABLA A4.34

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{máx}^{app}$ de HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

$[H_2O_2]$ (μM)	V_0 ($\mu M/min$)
25	1,64
50	2,64
75	3,54
100	3,60
150	3,86
200	3,92
250	3,99

Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en el espectro de la Figura A4.37.

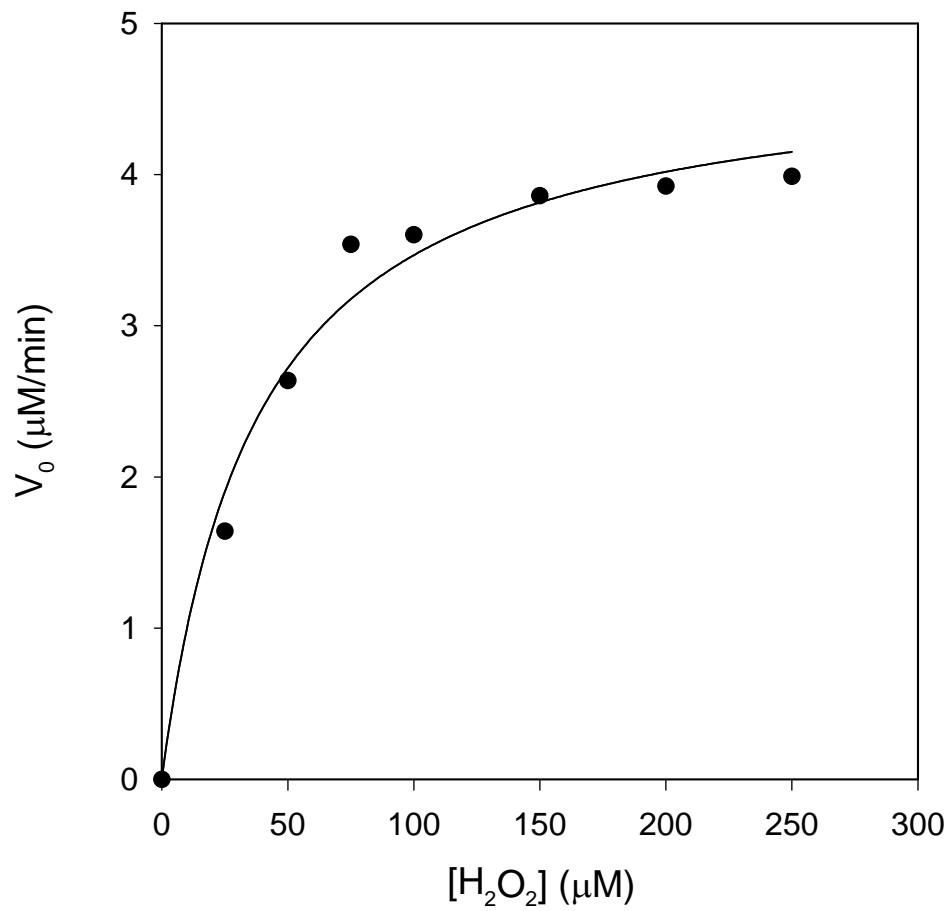
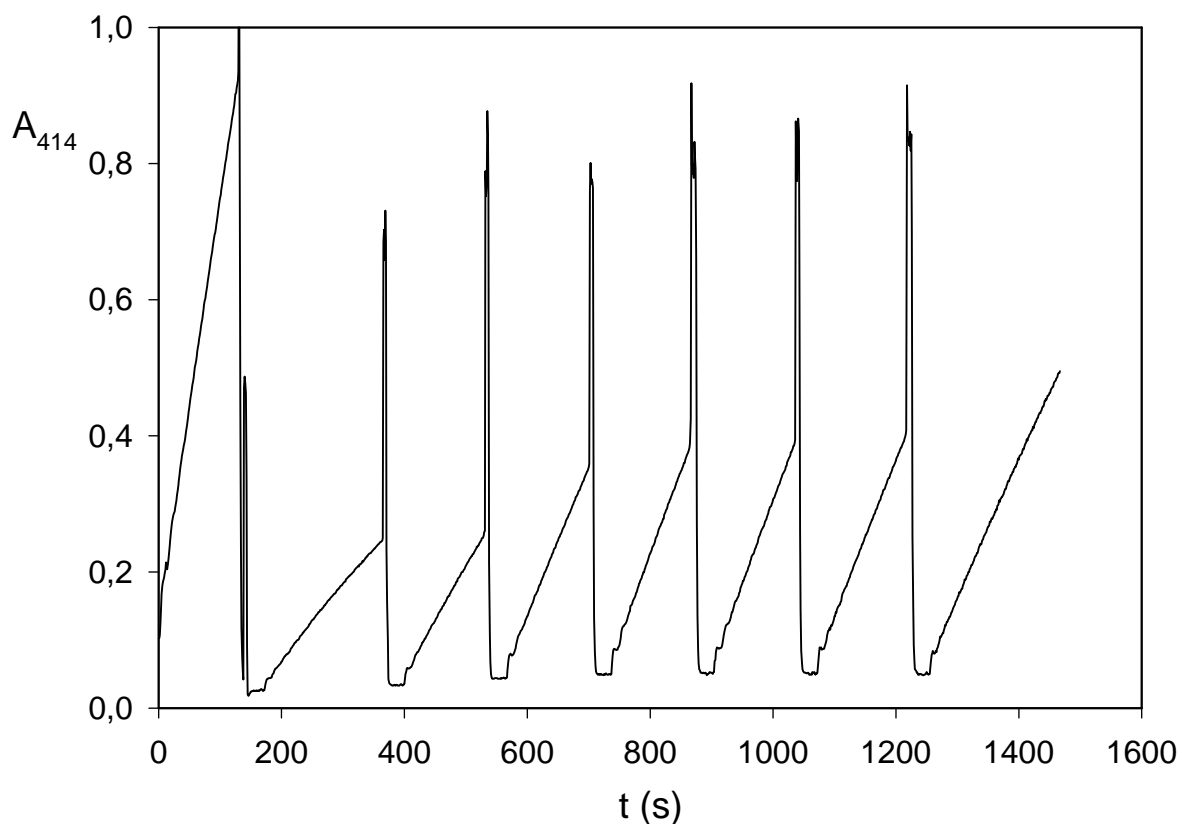


FIGURA A4.39

Cálculo de K_m^{app} para H_2O_2 y $V_{máx}^{app}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de dextrina.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de H_2O_2 , $[H_2O_2]$ (μM).

**FIGURA A4.40**

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación del valor de absorción medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 50 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

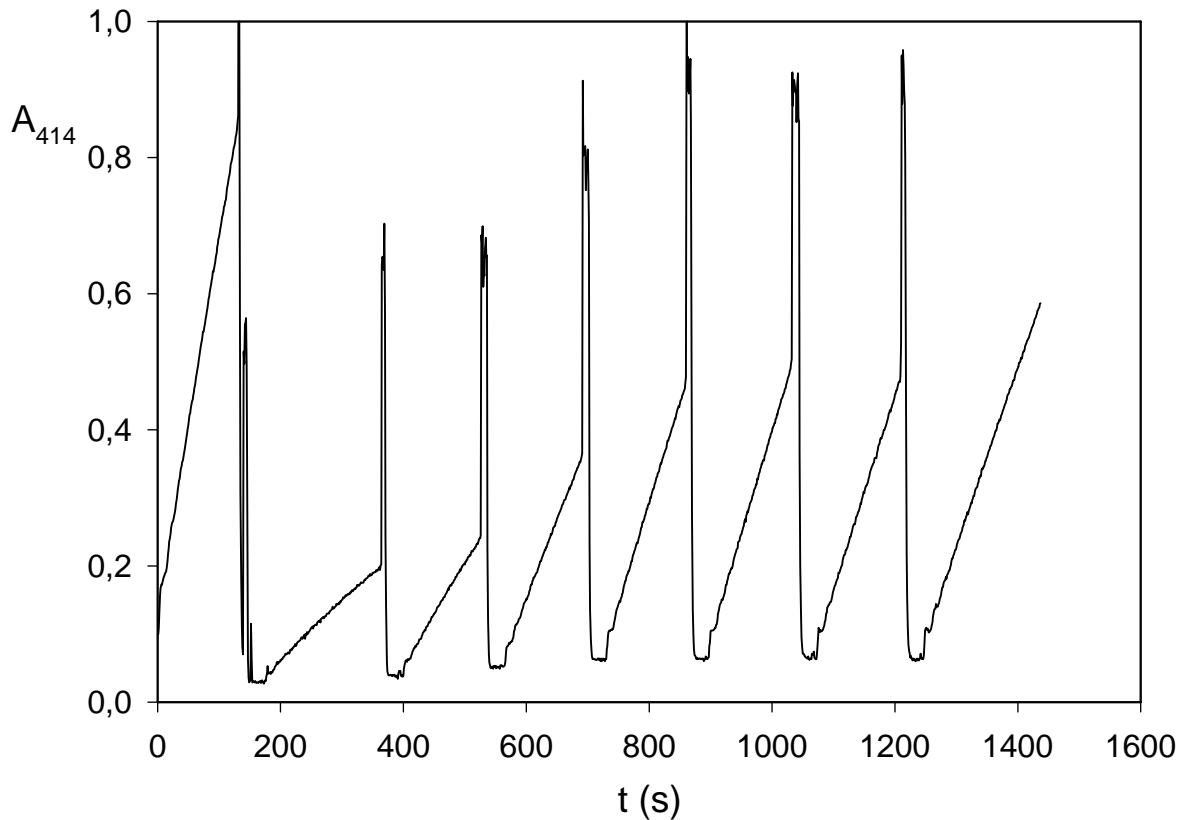
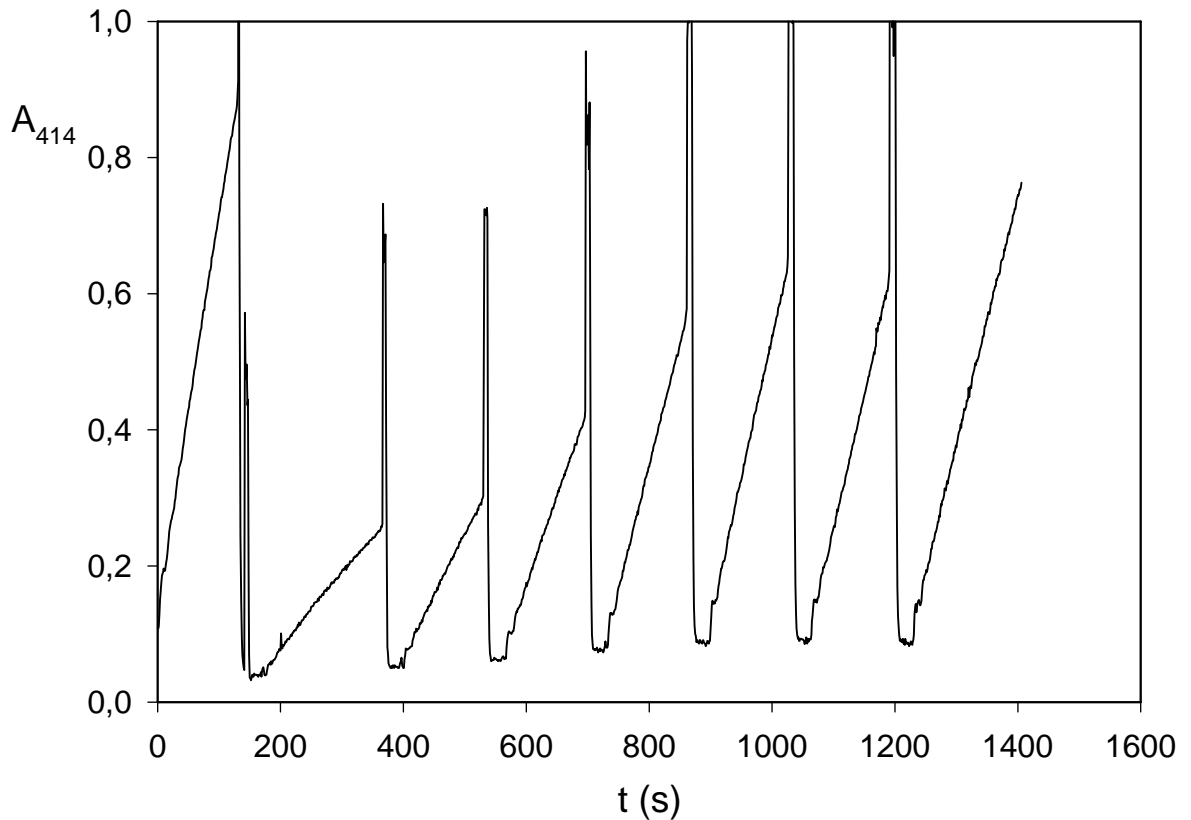


FIGURA A4.41

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 100 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

**FIGURA A4.42**

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 150 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

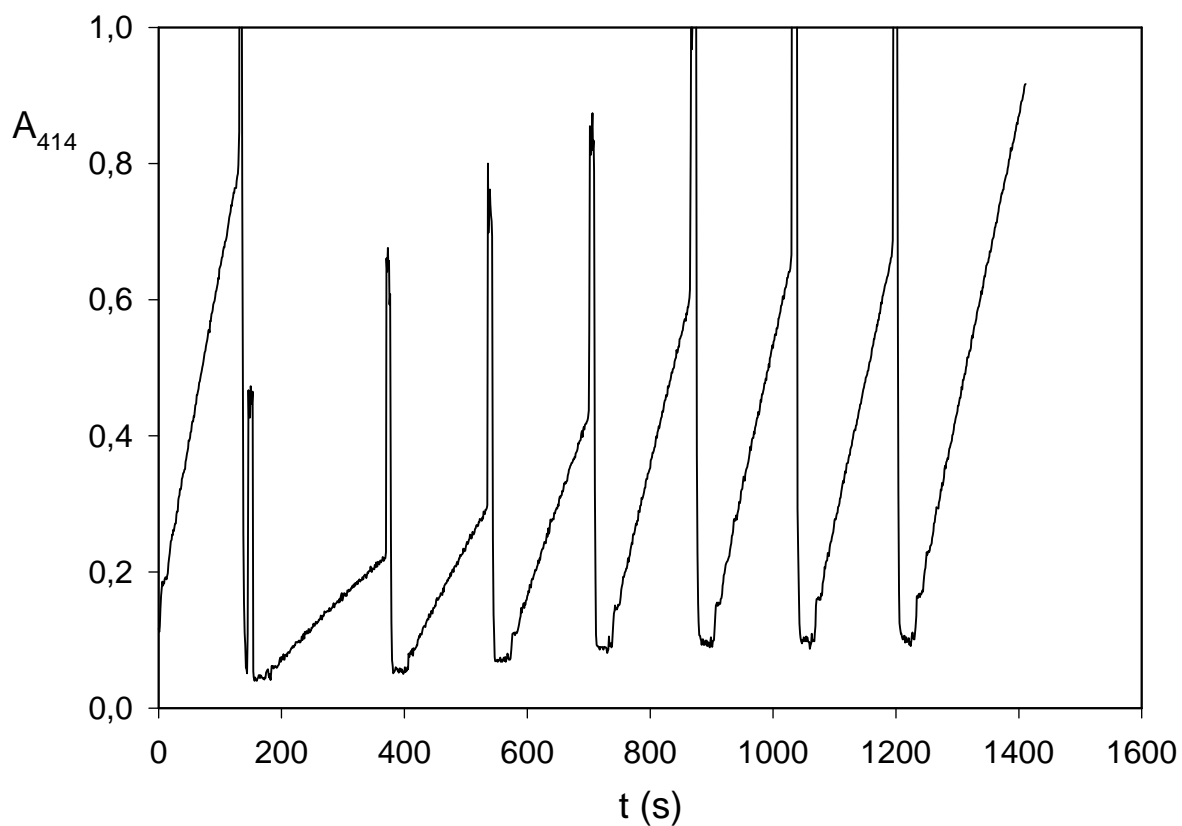


FIGURA A4.43

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 250 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

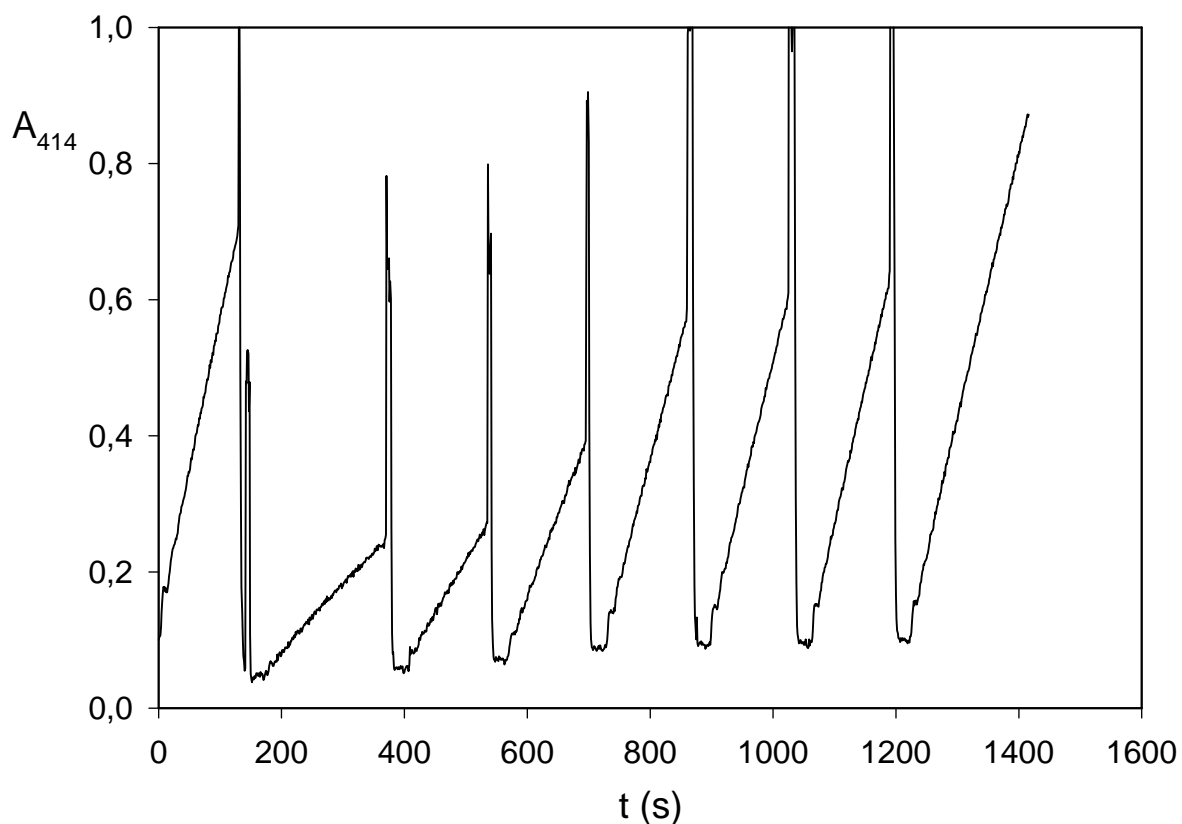


FIGURA A4.44

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 300 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

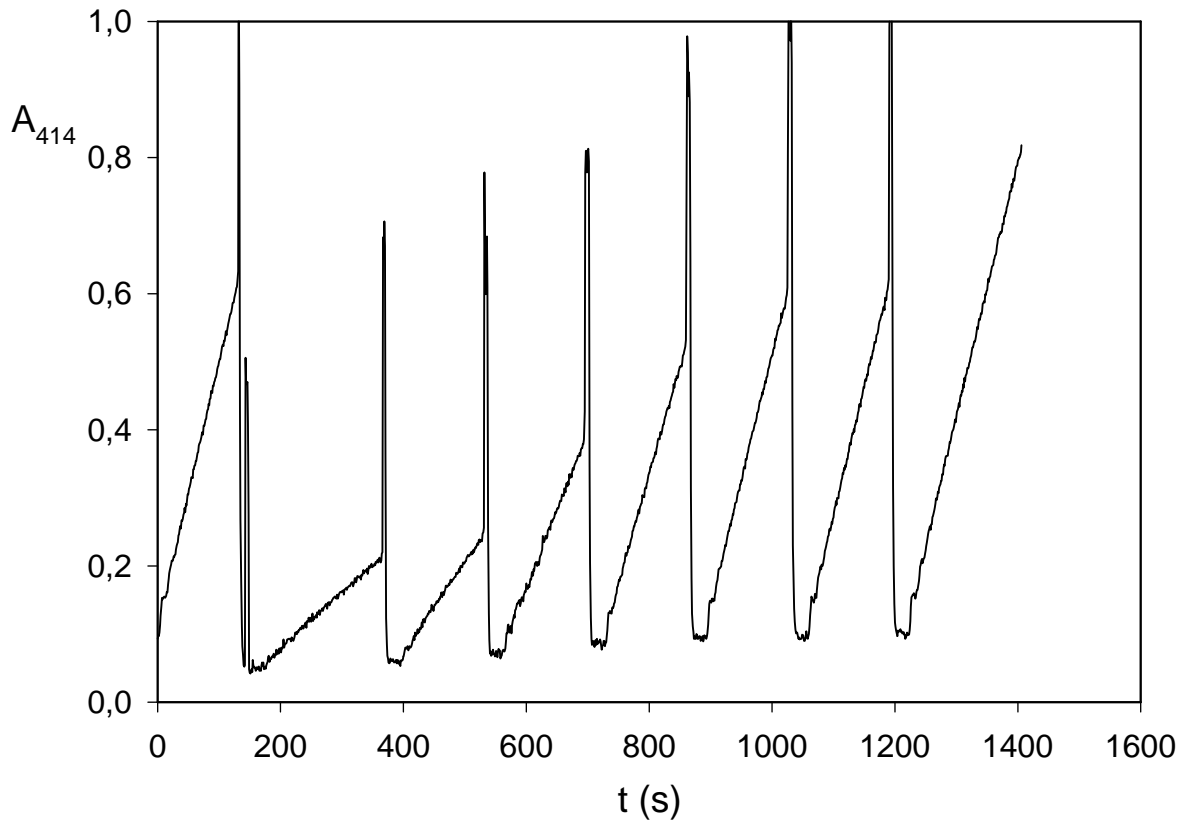


FIGURA A4.45

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 400 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

TABLA A4.35

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

[ABTS] (μM)	[H ₂ O ₂] (μM)					
	50	100	150	250	300	400
25	2,06	1,79	2,23	2,02	2,51	2,29
50	2,85	2,99	3,42	3,75	3,68	3,60
100	3,88	4,56	4,99	5,73	5,78	5,66
200	4,38	5,79	6,81	8,33	8,53	8,98
300	4,32	5,92	7,72	9,05	9,21	10,33
400	4,41	5,99	7,79	9,01	9,70	10,52
500	4,47	6,05	7,85	9,59	9,62	10,61

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de velocidad inicial de la reacción enzimática expresada en $\mu\text{M}/\text{min}$. Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en los espectros anteriormente citados y registrados para cada una de las concentraciones de H₂O₂ ensayadas.

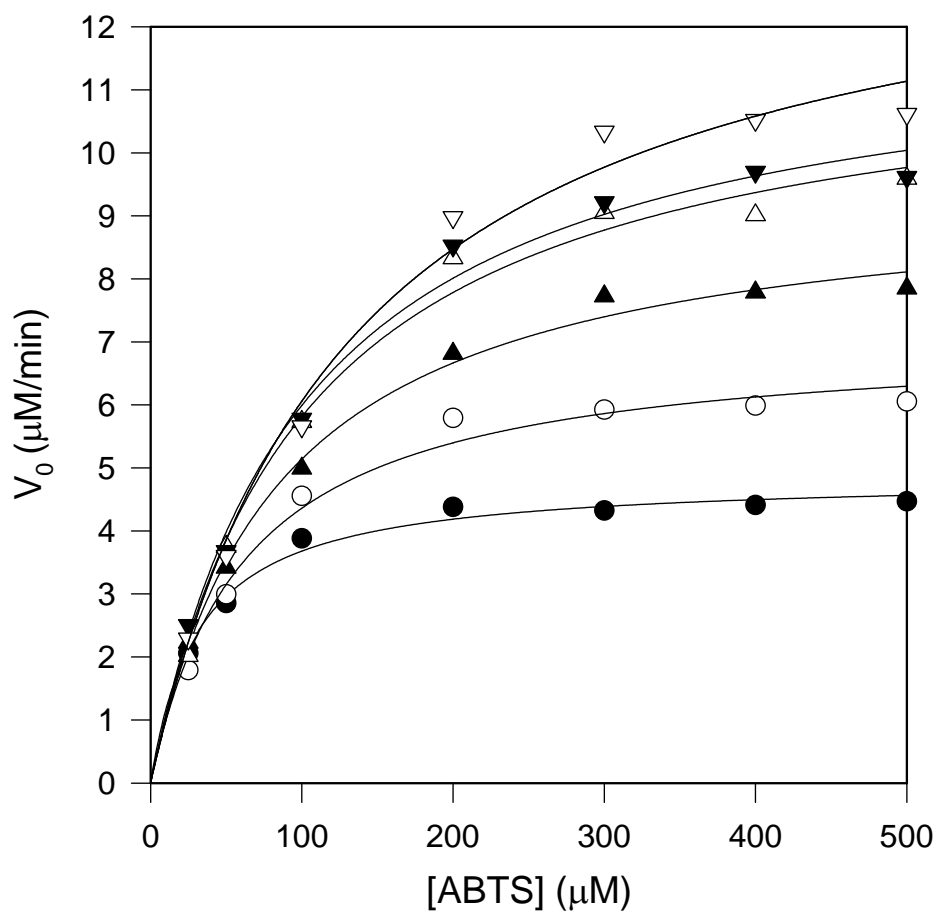


FIGURA A4.46

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de ABTS, $[\text{ABTS}]$ (μM). El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de reacción la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM , mientras que las concentraciones de H_2O_2 fueron las siguientes: (λ) 50 μM , (O) 100 μM , (σ) 150 μM , (Δ) 250 μM , (τ) 300 μM y (∇) 400 μM .

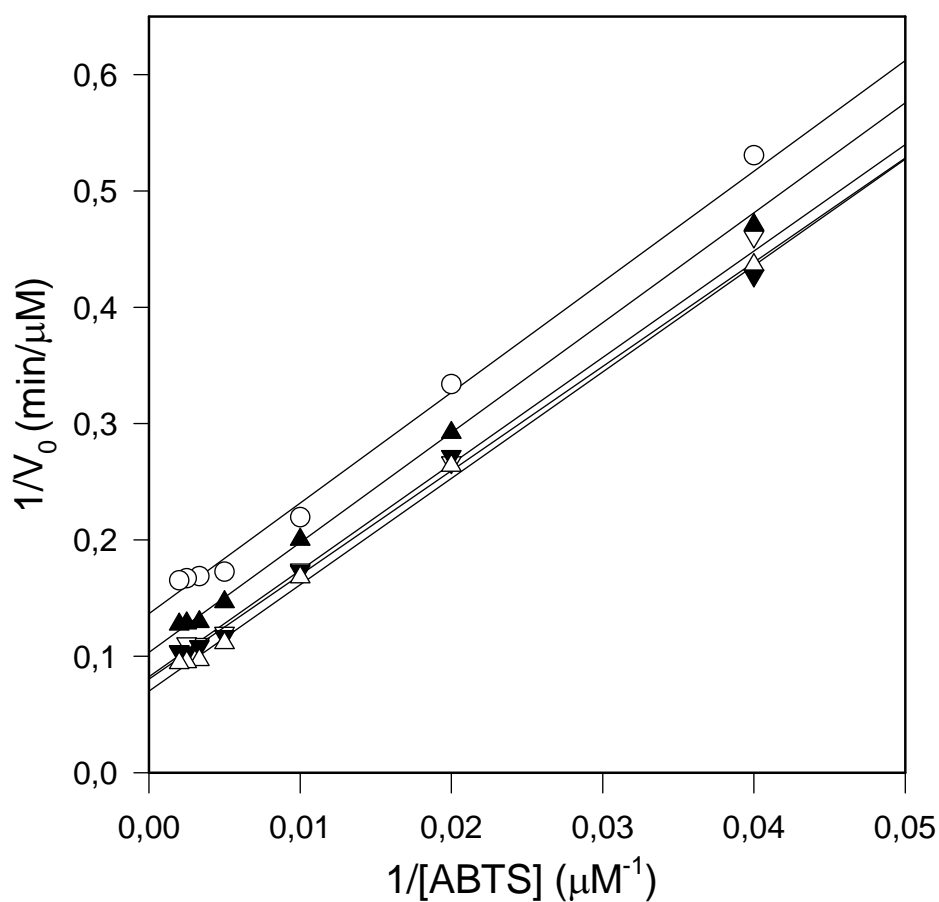


FIGURA A4.47

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Ajuste por regresión lineal de los datos de $1/V_0$ frente a $1/[ABTS]$. Cada una de las gráficas rectas obtenidas se correspondió con las concentraciones ensayadas de H_2O_2 siguientes: (O) 100 μM , (σ) 150 μM , (∇) 250 μM , (τ) 300 μM y (Δ) 400 μM .

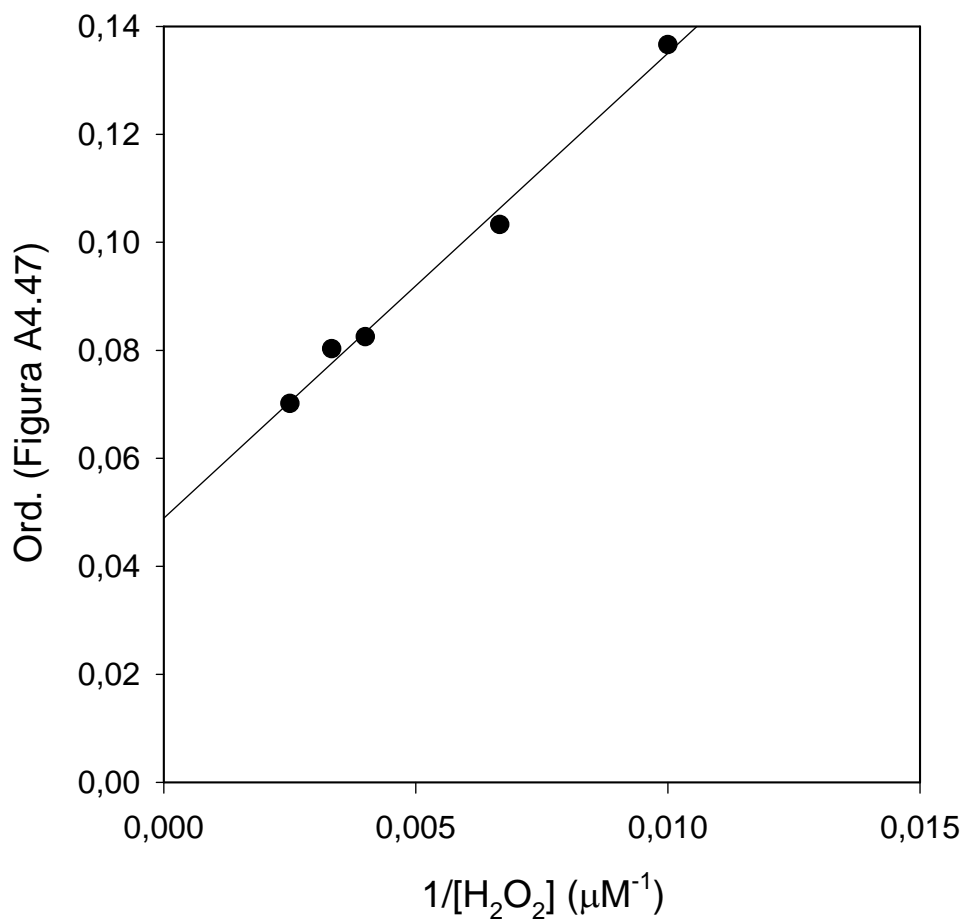


FIGURA A4.48

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-sorbitol.

Ajuste por regresión lineal de los datos de ordenada en el origen de la Figura A4.47 frente a $1/[H_2O_2]$.

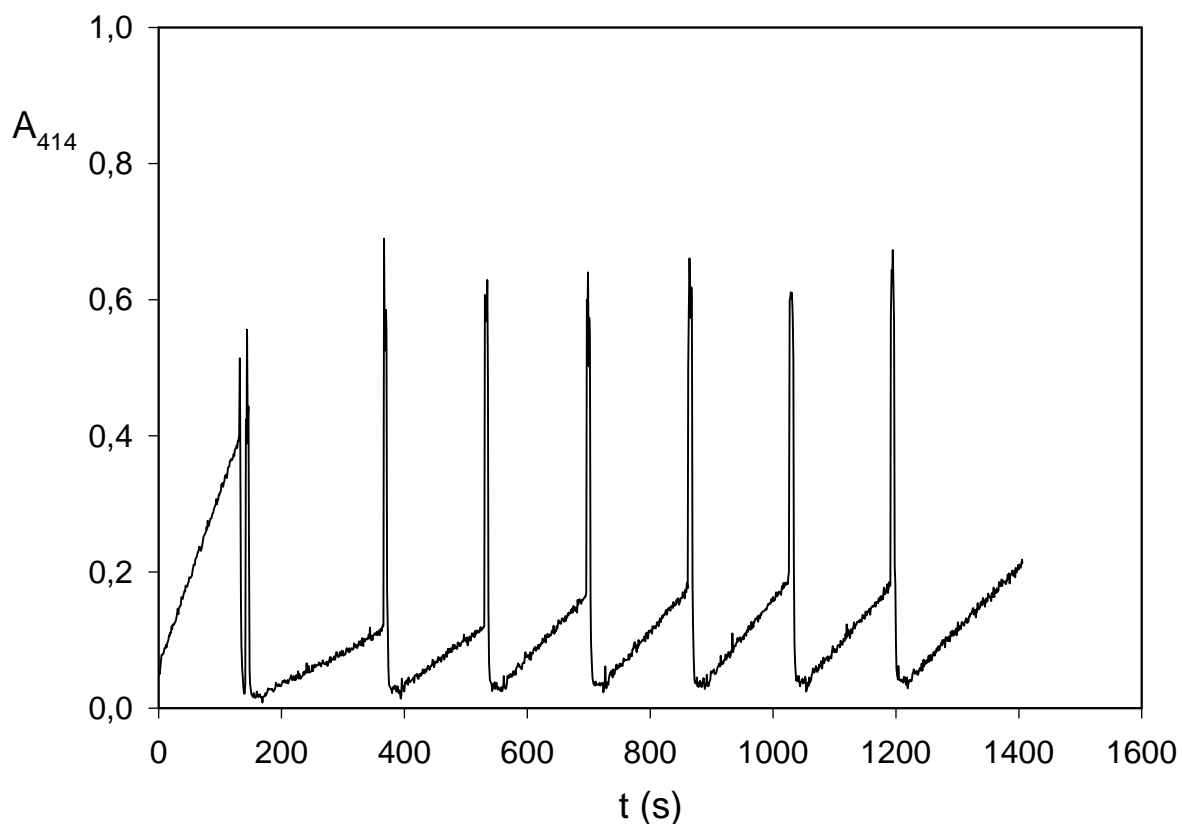


FIGURA A4.49

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación del valor de absorción medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 50 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

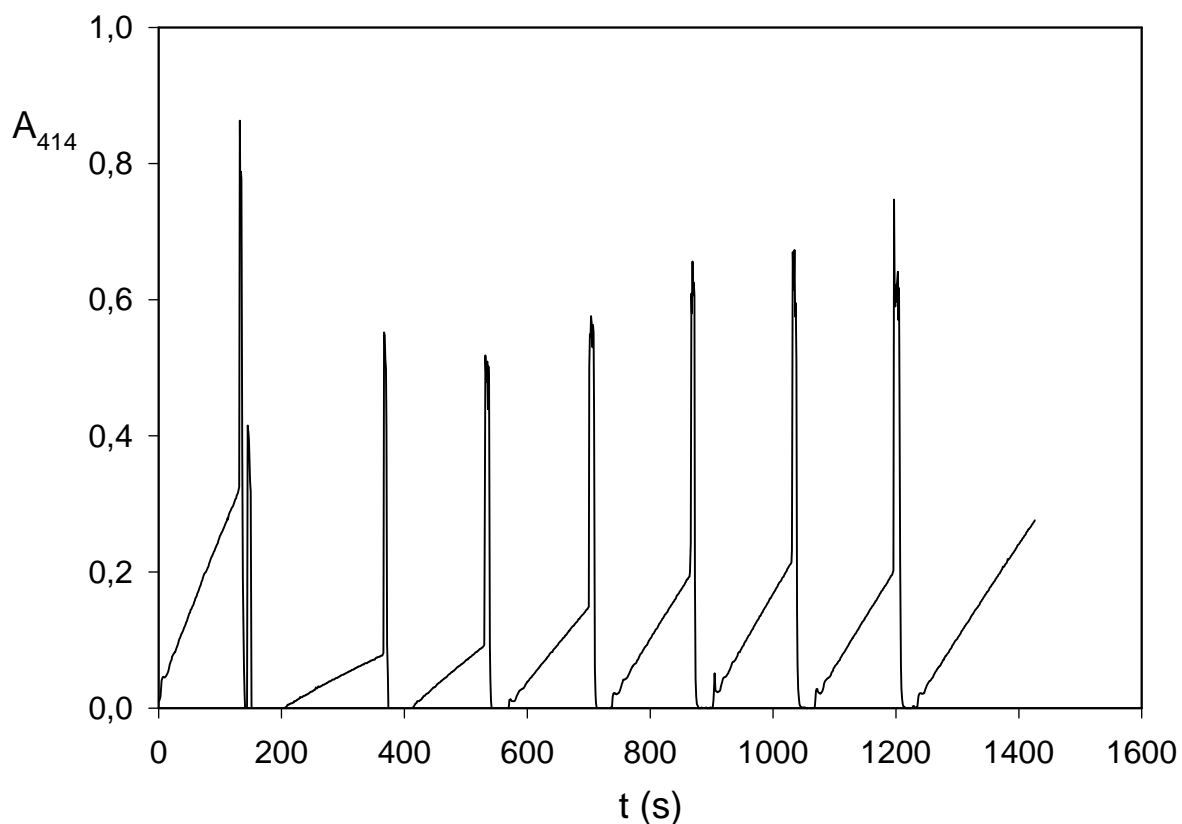


FIGURA A4.50

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 100 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

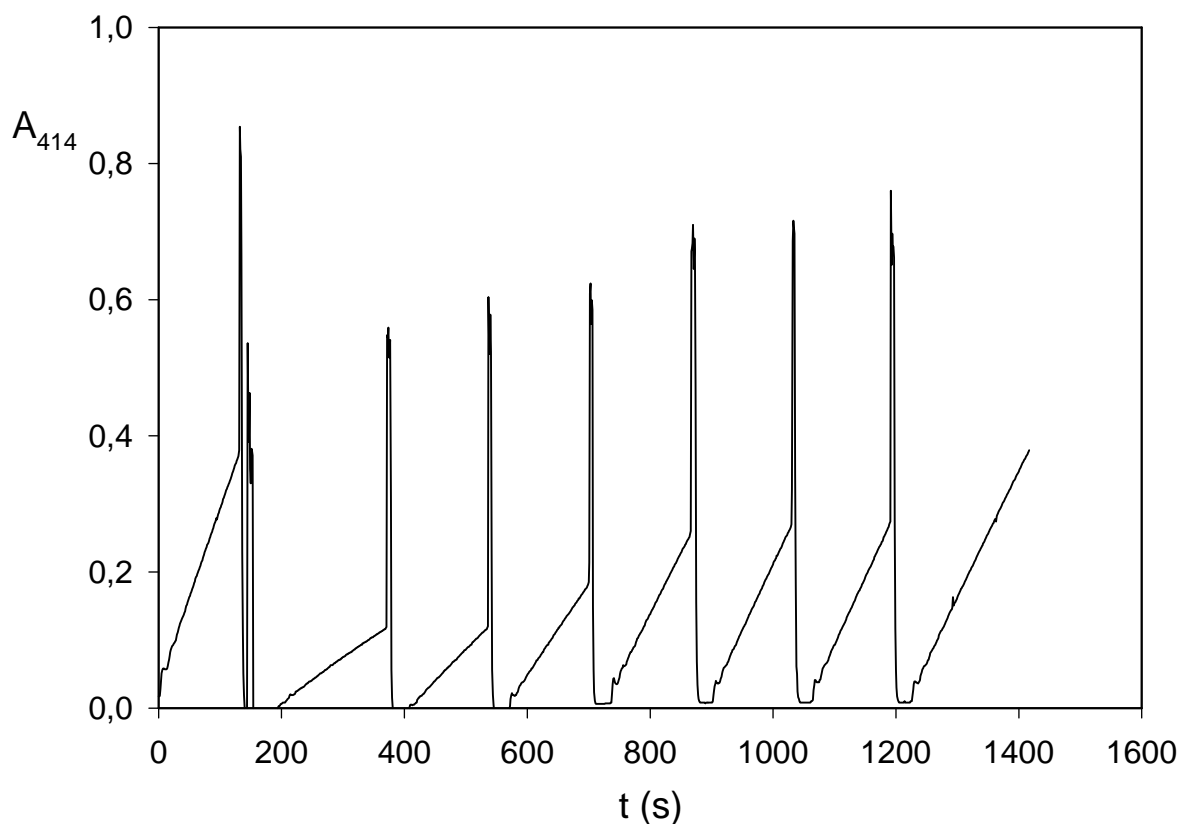


FIGURA A4.51

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 150 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

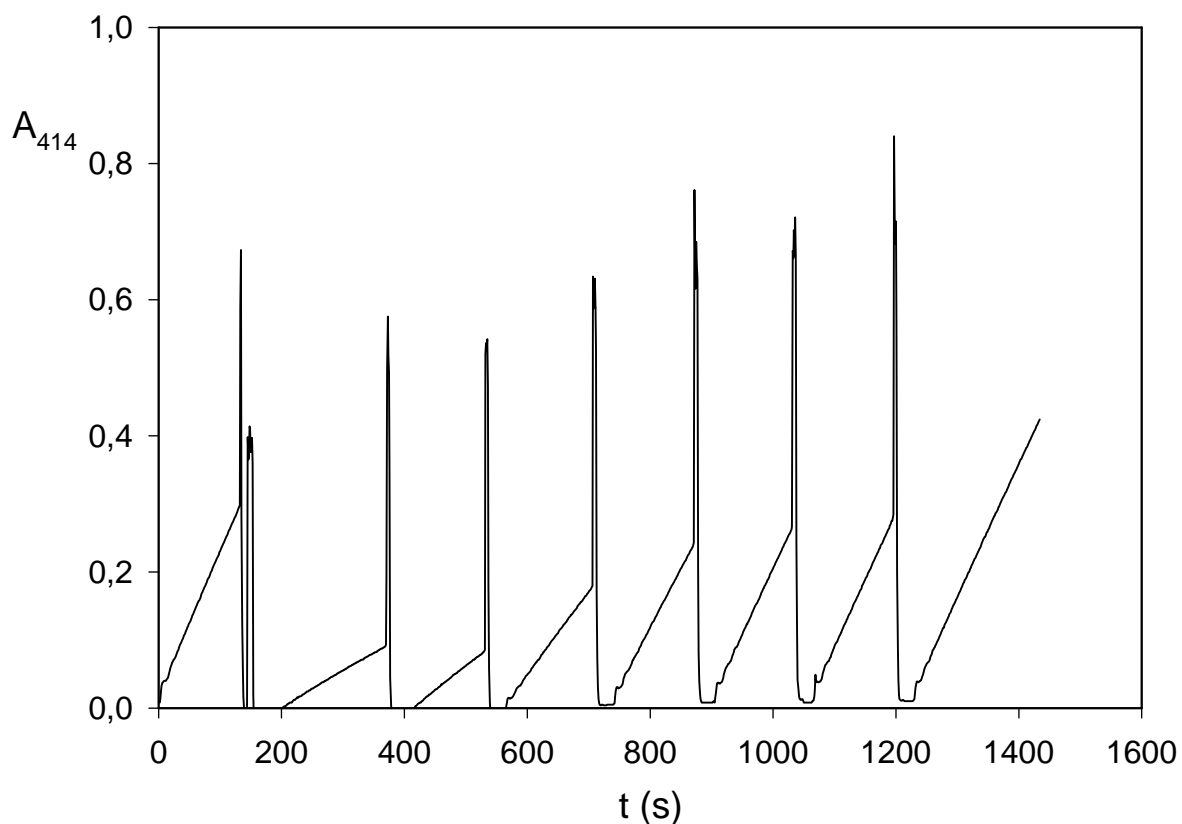


FIGURA A4.52

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 250 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

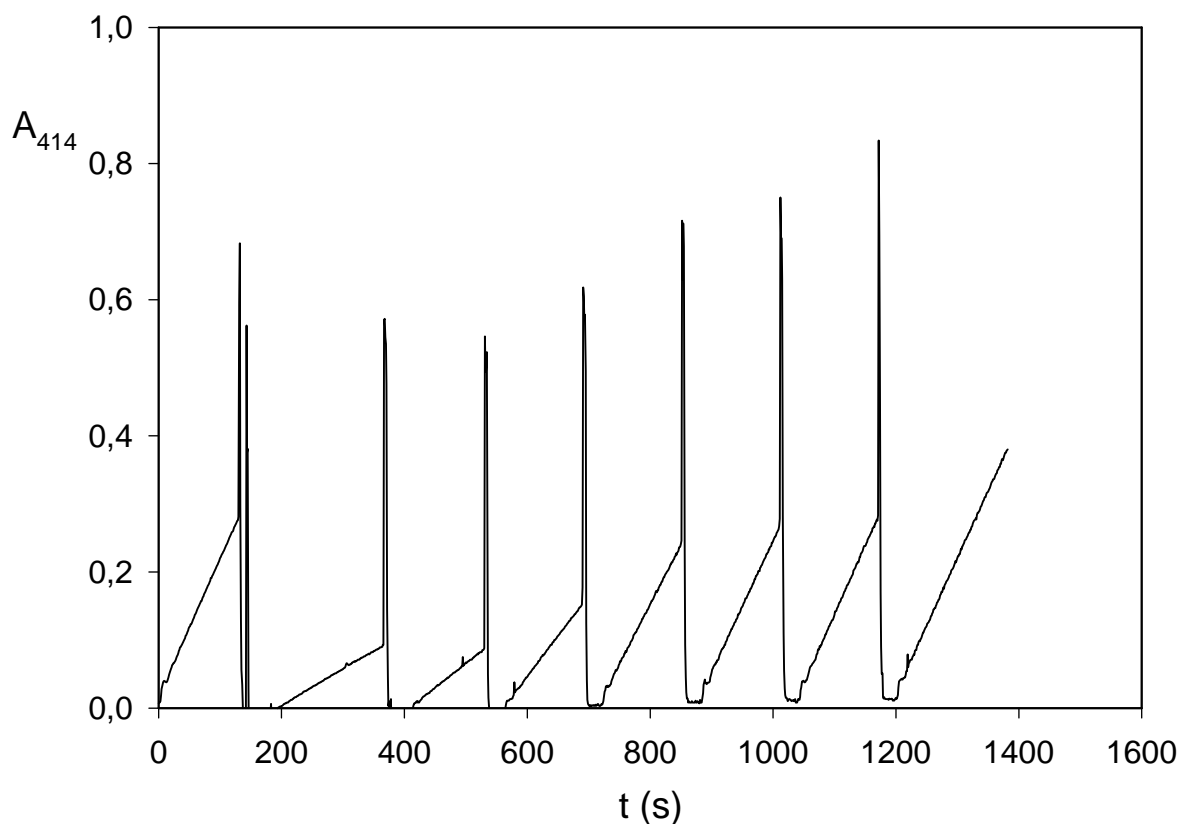


FIGURA A4.53

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 300 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

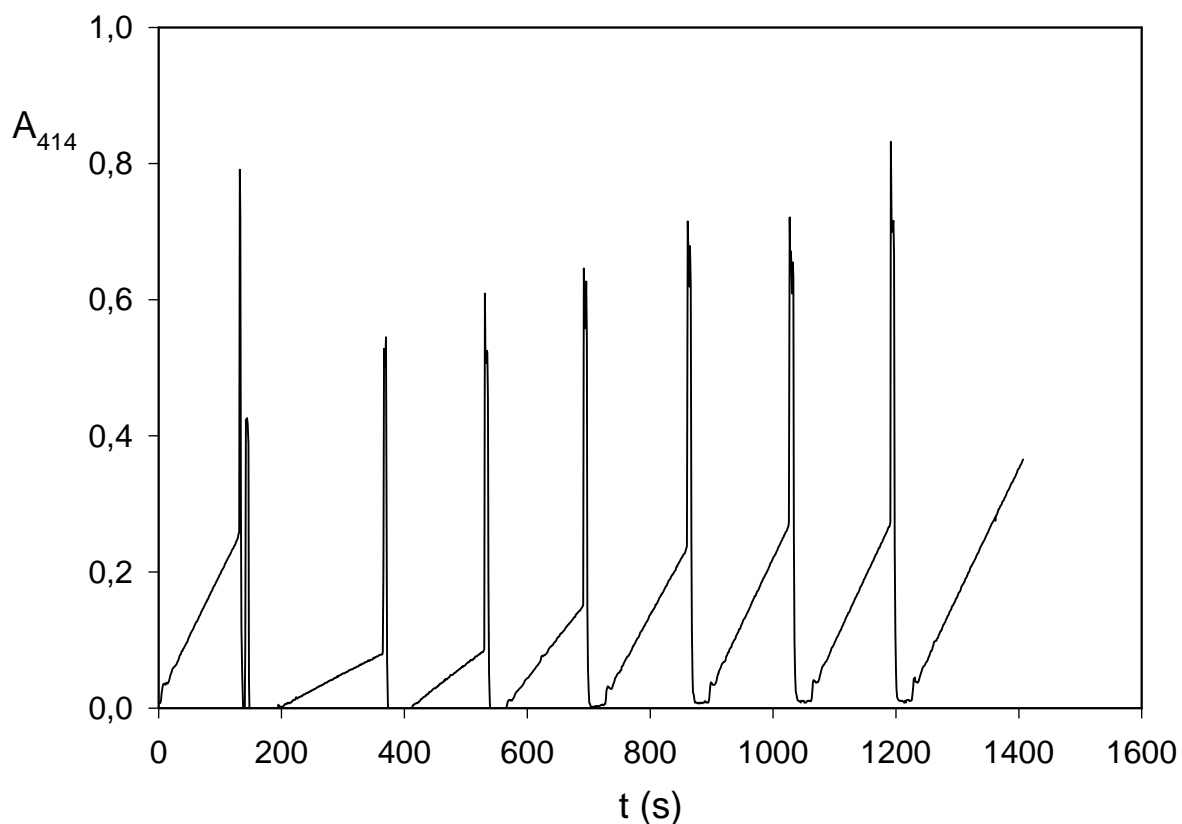


FIGURA A4.54

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 400 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

TABLA A4.36

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

[ABTS] (μM)	[H ₂ O ₂] (μM)					
	50	100	150	250	300	400
25	0,85	1,06	1,08	1,20	1,25	1,22
50	1,24	1,57	1,61	1,56	1,66	1,76
100	1,72	2,25	2,34	2,68	2,68	3,02
200	1,81	3,00	3,16	3,77	3,96	4,19
300	2,00	3,20	3,40	4,20	4,38	4,78
400	2,06	3,27	3,45	4,28	4,60	4,86
500	2,12	3,34	3,51	4,31	4,68	4,94

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de velocidad inicial de la reacción enzimática expresada en $\mu\text{M}/\text{min}$. Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en los espectros anteriormente citados y registrados para cada una de las concentraciones de H₂O₂ ensayadas.

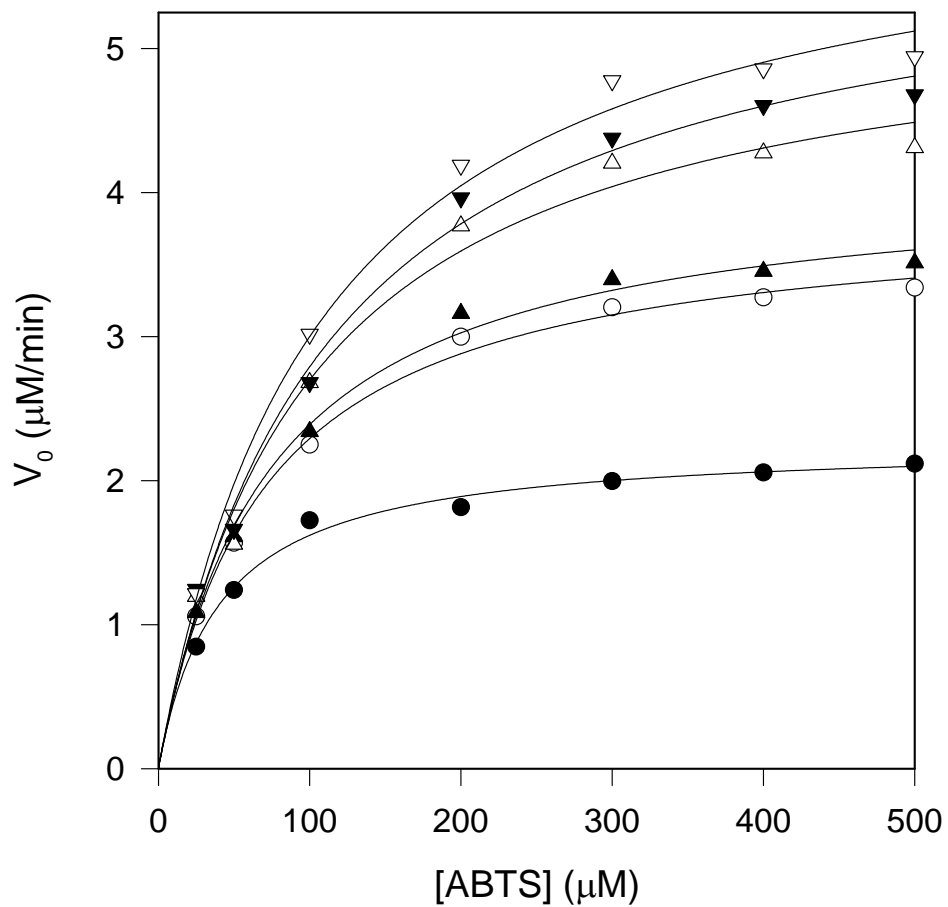


FIGURA A4.55

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de ABTS, $[\text{ABTS}]$ (μM). El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de reacción la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM , mientras que las concentraciones de H_2O_2 fueron las siguientes: (λ) 50 μM , (O) 100 μM , (σ) 150 μM , (Δ) 250 μM , (τ) 300 μM y (∇) 400 μM .

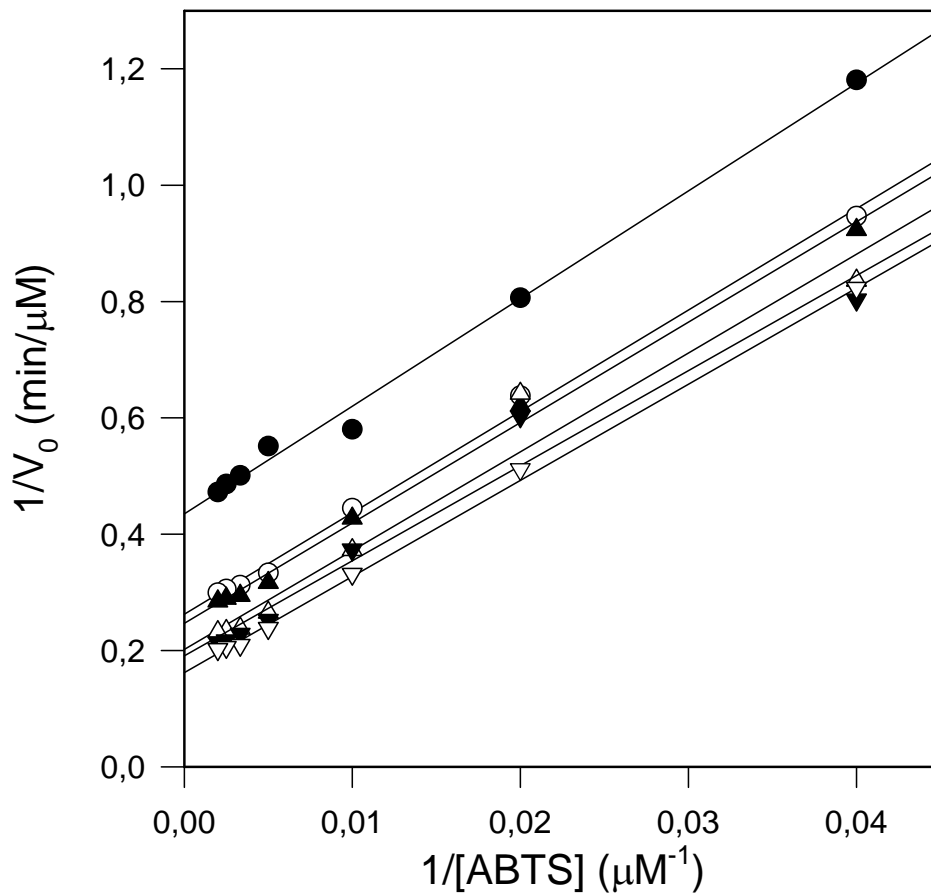


FIGURA A4.56

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Ajuste por regresión lineal de los datos de $1/V_0$ frente a $1/[ABTS]$. Cada una de las gráficas rectas obtenidas se correspondió con las concentraciones ensayadas de H_2O_2 siguientes: (λ) 50 μM , (O) 100 μM , (σ) 150 μM , (Δ) 250 μM , (τ) 300 μM y (∇) 400 μM .

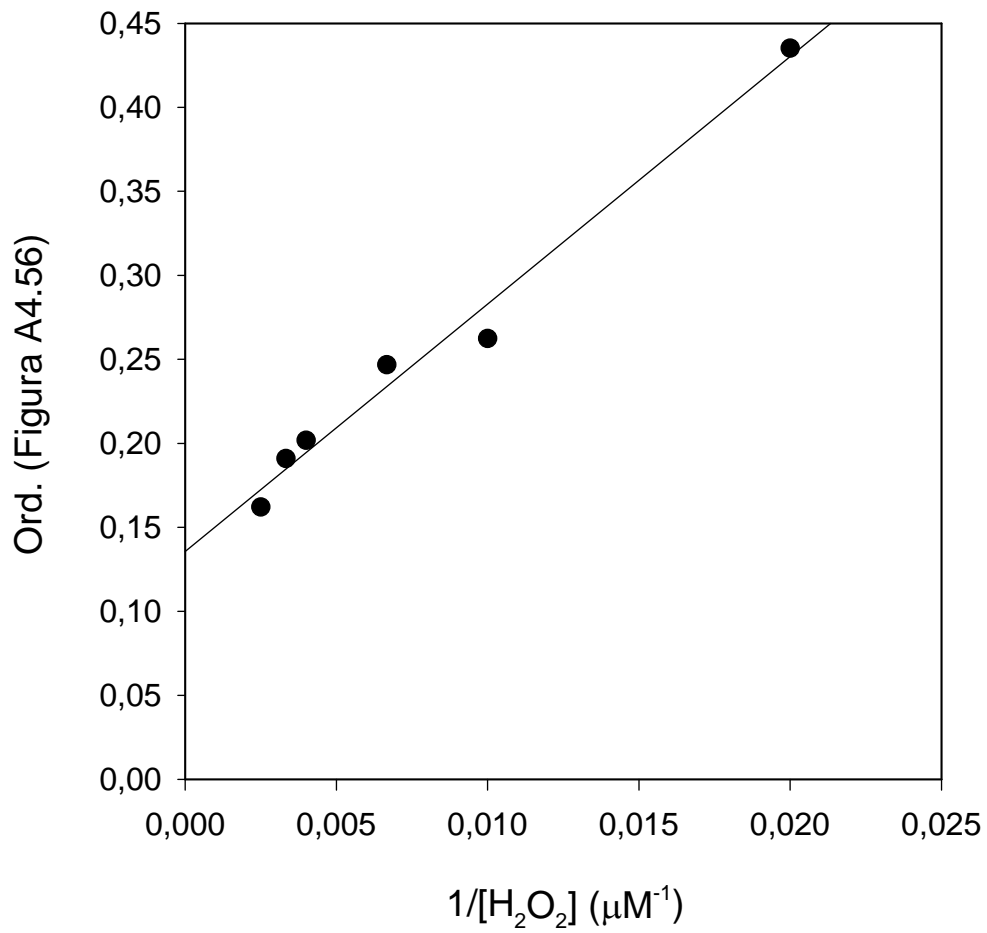


FIGURA A4.57

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de D-glucosona.

Ajuste por regresión lineal de los datos de ordenada en el origen de la Figura A4.56 frente a $1/[H_2O_2]$.

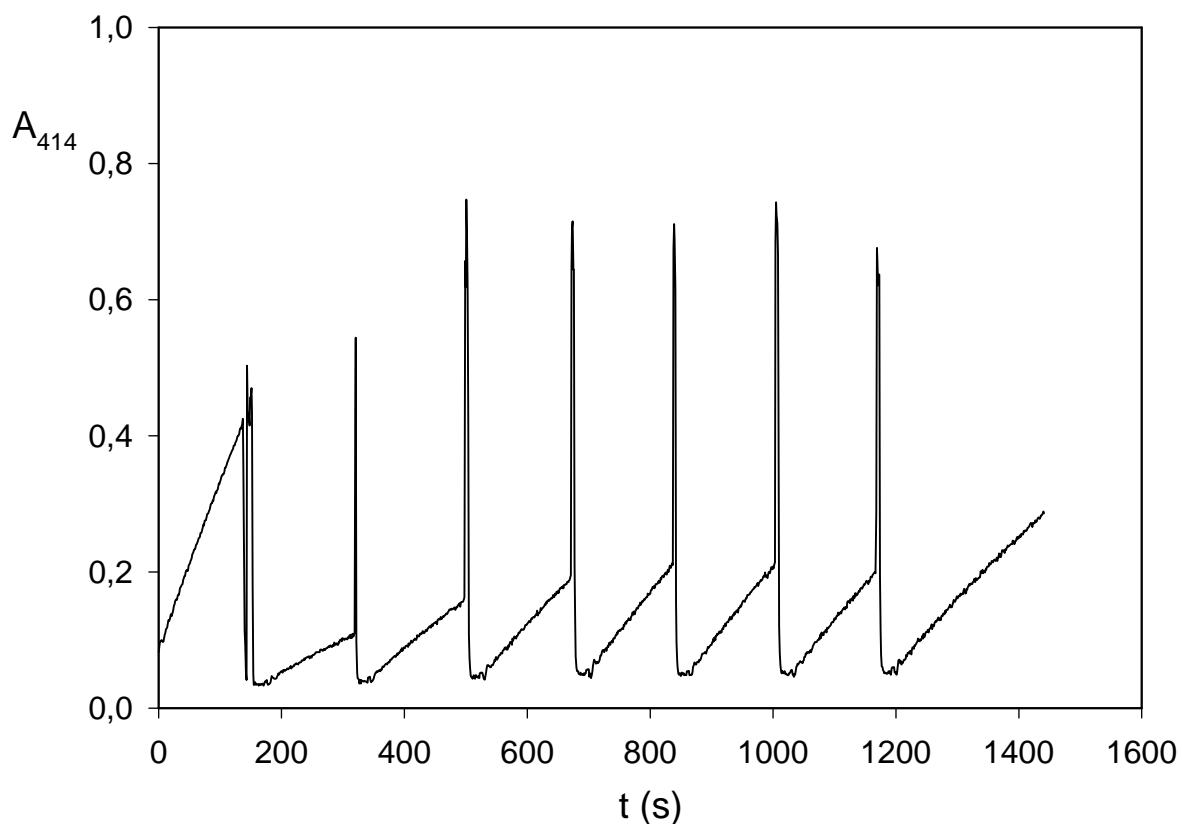


FIGURA A4.58

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 50 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

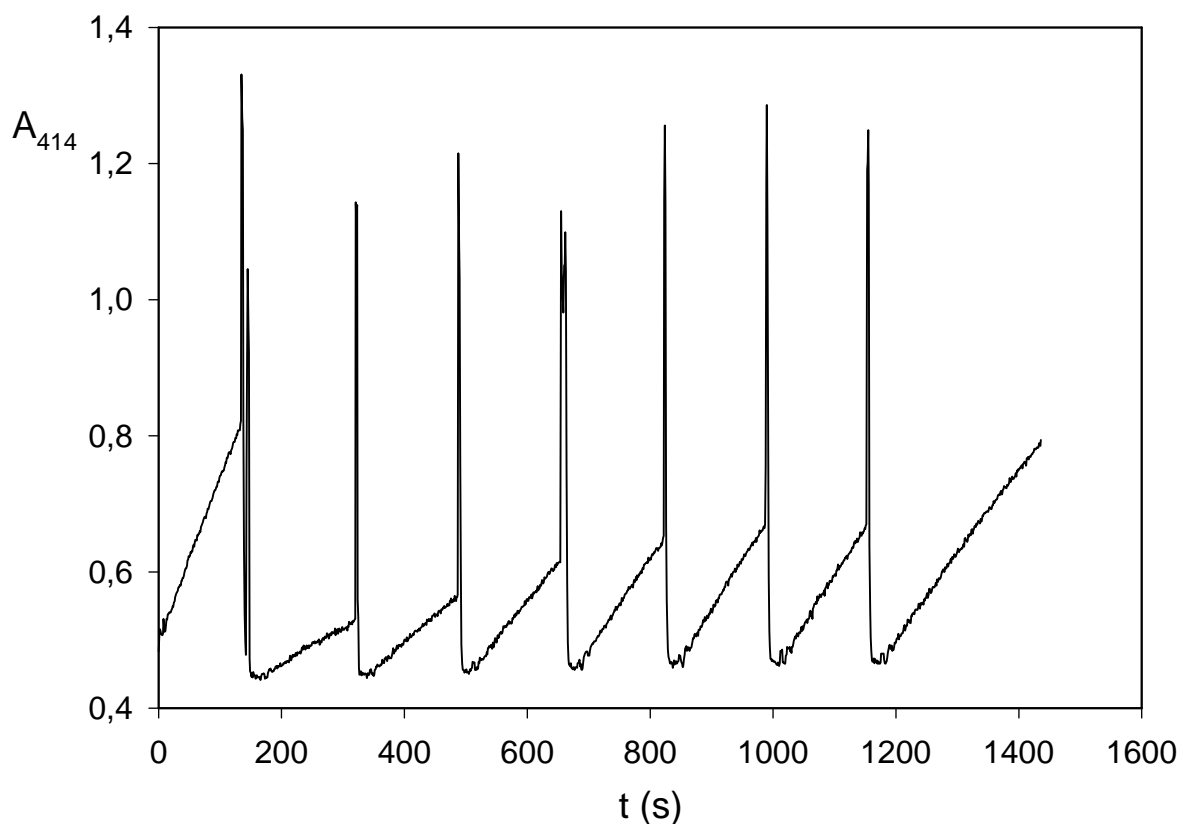


FIGURA A4.59

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 100 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

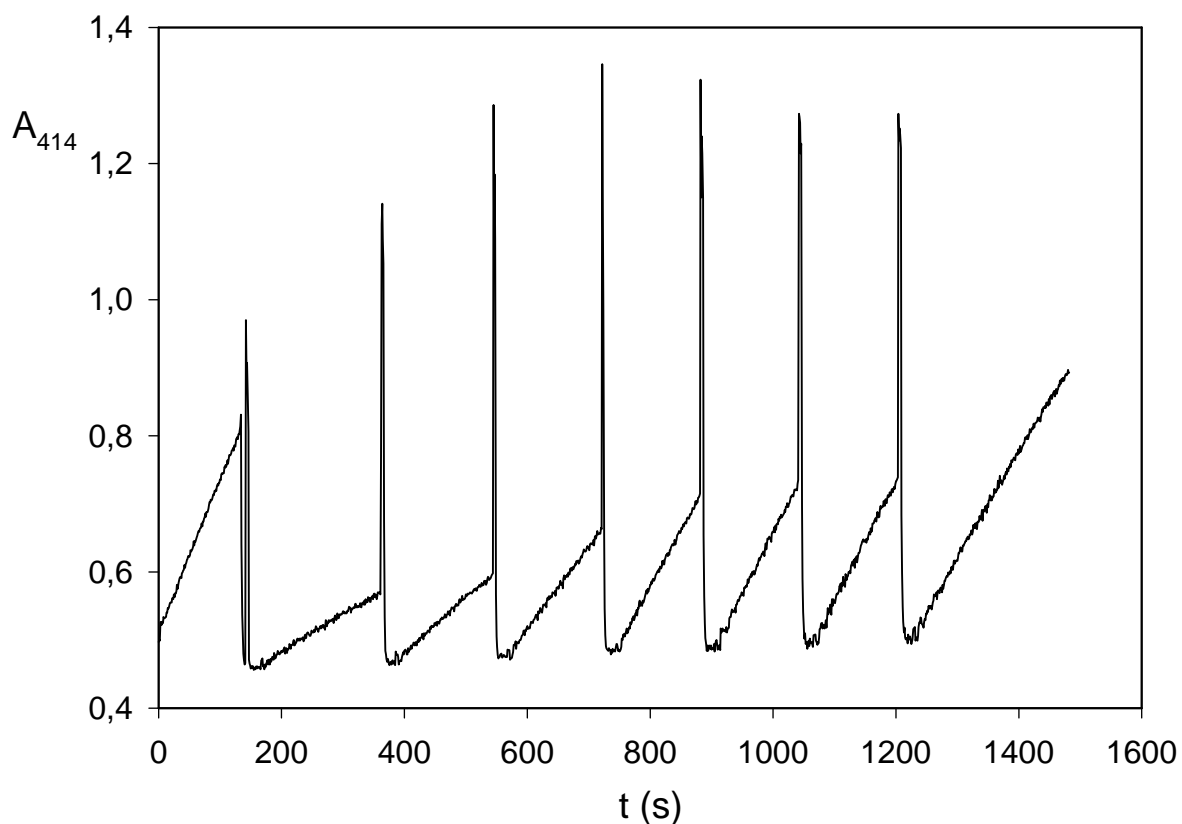


FIGURA A4.60

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 150 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

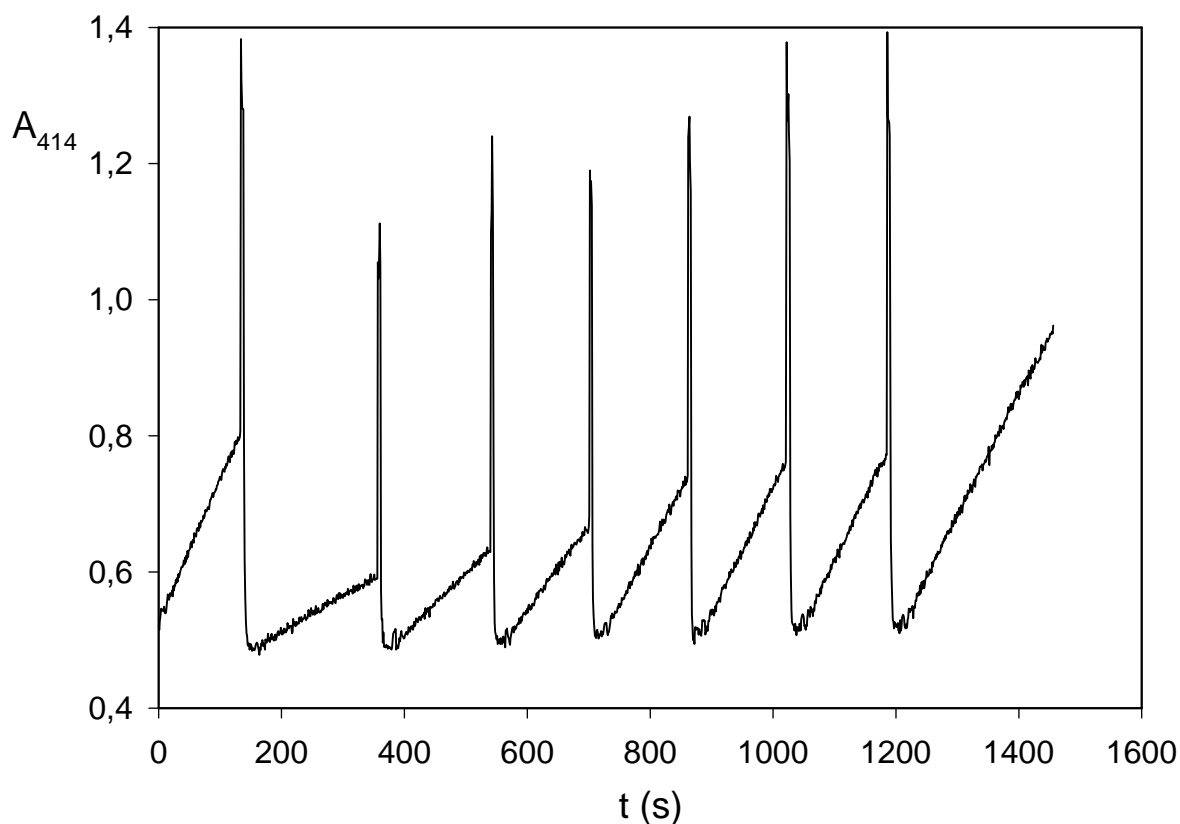


FIGURA A4.61

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 250 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

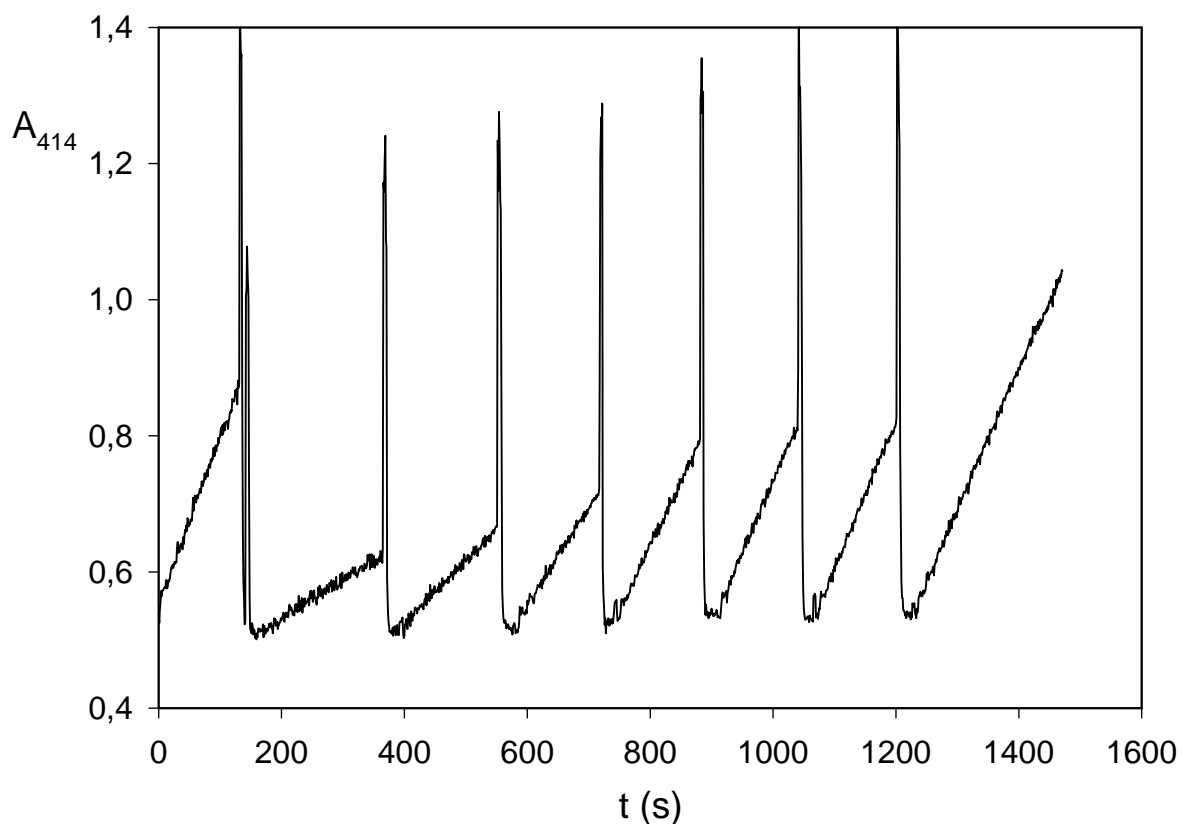


FIGURA A4.62

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 300 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

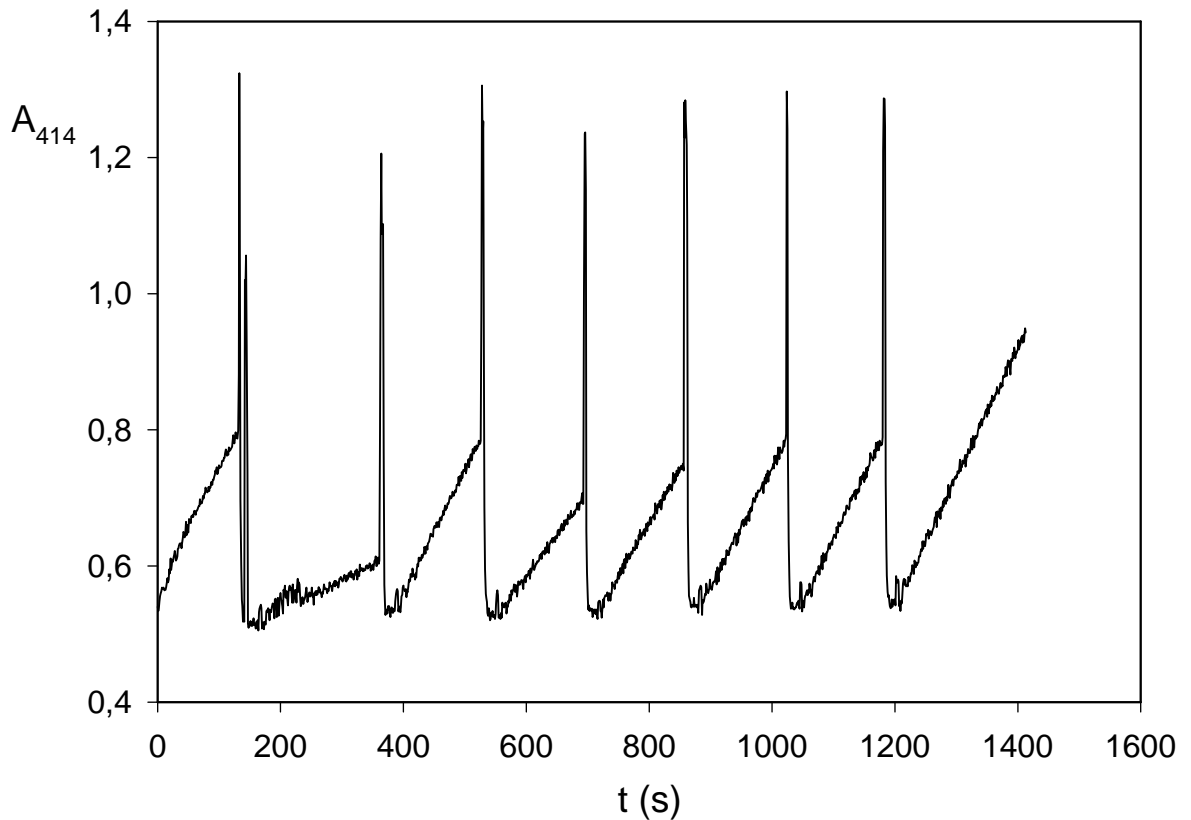


FIGURA A4.63

Cálculo de K_m (ABTS y H_2O_2) y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación del valor de absorbancia medido a 414 nm, A_{414} , frente al tiempo de ensayo, t (s). Fracción preparada utilizando, como matriz inerte, 15 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro. La concentración del sólido de inmovilización fue de 15 g/L. La concentración de HRPc fue de 4,9 $\mu\text{g/mL}$. La inmovilización se realizó en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 9,1) durante un tiempo de 21 horas y a una temperatura entre 0 y 4°C. Lavado 4.A descrito en el apartado 2.5.1. El ensayo se realizó en continuo y en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de ensayo, la concentración de H_2O_2 fue de 400 μM , mientras que la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM .

TABLA A4.37

Valores representados para el cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{máx}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

[ABTS] (μM)	[H ₂ O ₂] (μM)					
	50	100	150	250	300	400
25	0,90	1,05	1,11	1,19	1,09	1,16
50	1,40	1,52	1,68	1,84	1,80	-----
100	1,86	2,03	2,39	2,67	2,80	3,40
200	2,14	2,60	3,29	3,71	3,51	4,16
300	2,14	2,85	3,63	4,11	4,05	4,74
400	2,20	2,92	3,60	4,18	4,31	4,92
500	2,27	2,98	3,66	4,25	4,37	5,23

Los resultados representados en las diferentes columnas corresponden a valores de velocidad inicial de la reacción enzimática expresada en $\mu\text{M}/\text{min}$. Estos valores han sido calculados a partir de las pendientes de cada uno de los tramos iniciales rectos obtenidos en los espectros anteriormente citados y registrados para cada una de las concentraciones de H₂O₂ ensayadas.

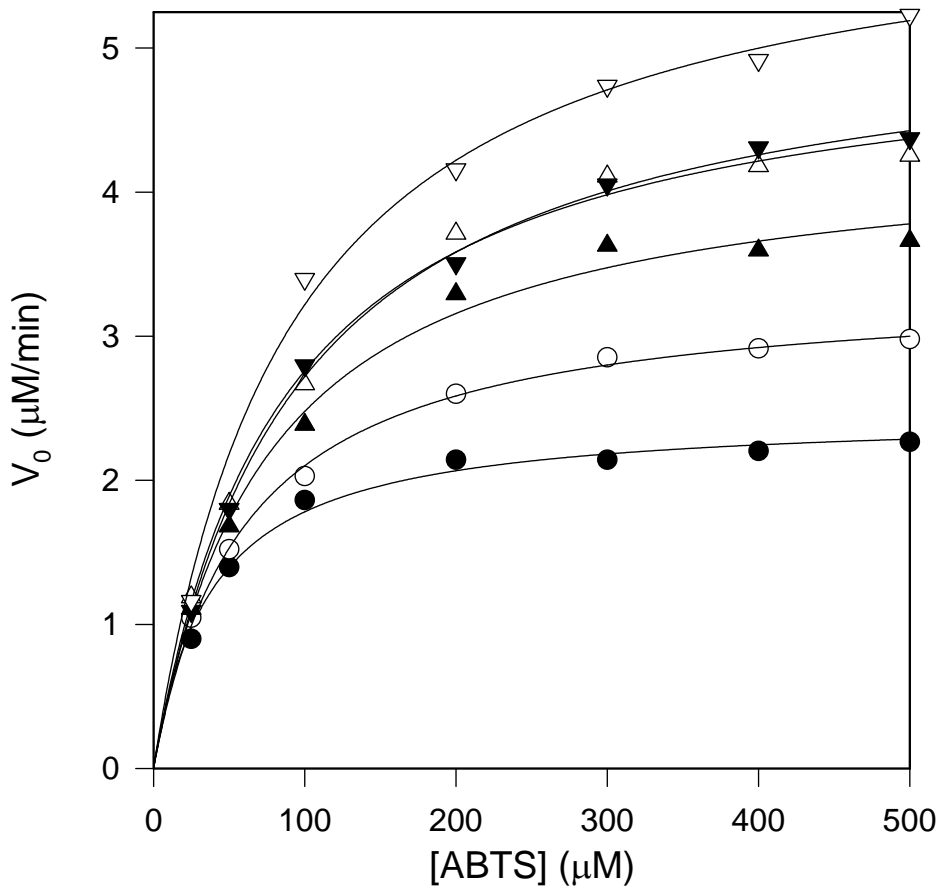


FIGURA A4.64

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Representación de los datos de actividad enzimática inicial, V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$), frente a la concentración de ABTS, $[\text{ABTS}]$ (μM). El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato sódico 50 mM (pH 4,5). En el medio de reacción la concentración de ABTS osciló entre 25-500 μM , mientras que las concentraciones de H_2O_2 fueron las siguientes: (λ) 50 μM , (O) 100 μM , (σ) 150 μM , (Δ) 250 μM , (τ) 300 μM y (∇) 400 μM .

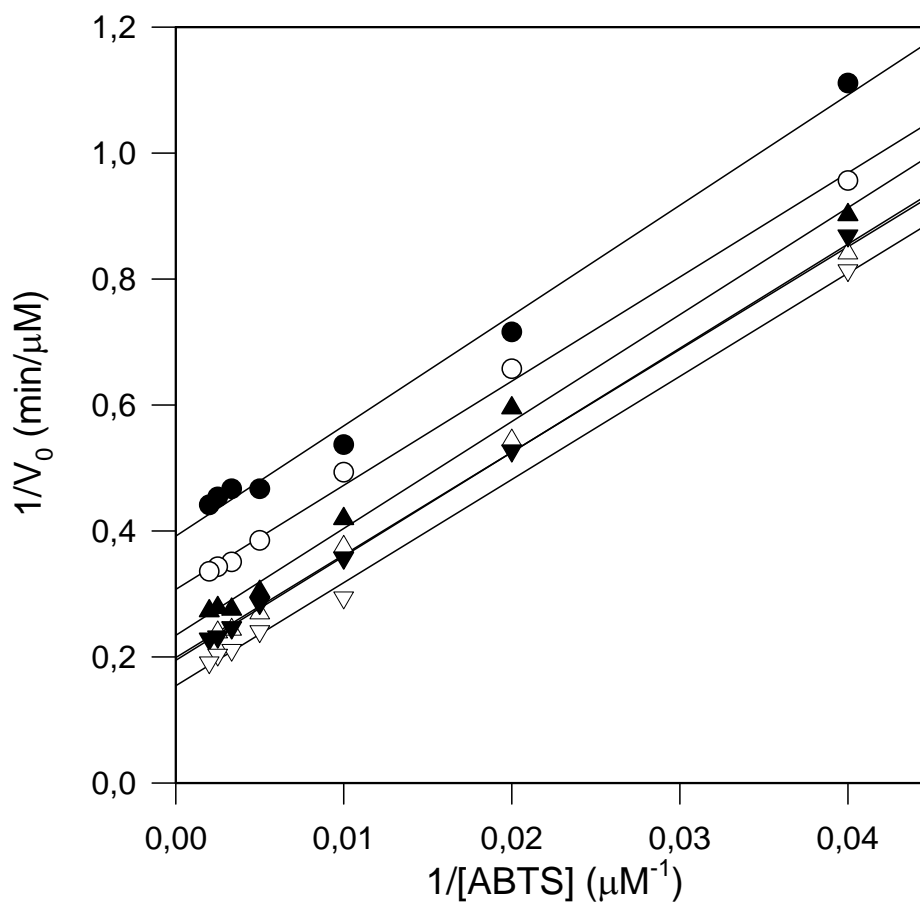
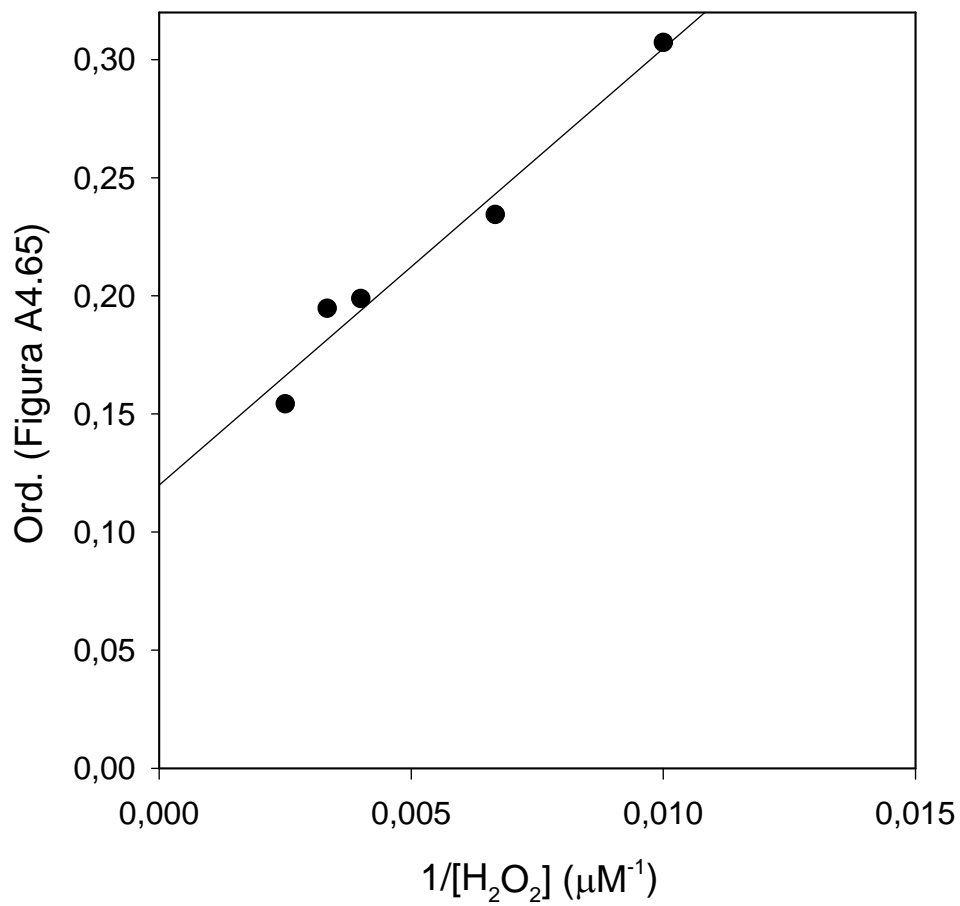


FIGURA A4.65

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Ajuste por regresión lineal de los datos de $1/V_0$ frente a $1/[\text{ABTS}]$. Cada una de las gráficas rectas obtenidas se correspondió con las concentraciones ensayadas de H_2O_2 siguientes: (λ) 50 μM , (O) 100 μM , (σ) 150 μM , (Δ) 250 μM , (τ) 300 μM y (∇) 400 μM .

**FIGURA A4.66**

Cálculo de las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima HRPc inmovilizada sobre el derivado totalmente cinamoilado de etil-D-glucopiranosido.

Ajuste por regresión lineal de los datos de ordenada en el origen de la Figura A4.65 frente a $1/[H_2O_2]$.

TABLA A5.1

Almacenado^a
($\Delta A/mL$)
0,015
0,027
0,064
0,038
0,013
0,005

(a) Actividad enzimática medida en el medio de almacenado.

TABLA A5.2

Almacenado^a
($\Delta A/mL$)
0,000
0,013
0,038
0,004
0,011
0,000

(a) Actividad enzimática medida en el medio de almacenado.