

MIGUEL JOÃO MANUEL FILHO



**PURIFICACIÓN, INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA
ALFA-GALACTOSIDASA DE *THERMUS* sp. CEPA T2, PARA SU USO
EN EL PROCESADO DE ALIMENTOS**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid**

DIRECTORES

**JOSÉ MANUEL GUISÁN SEIJAS
ALFONSO VICENTE CARRASCOSA SANTIAGO**

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica
Instituto de Fermentaciones Industriales
C.S.I.C., Madrid



**Facultad de Ciencias
Departamento de Química Física Aplicada
Ciencia y Tecnología de Alimentos
MADRID, 2007**

Purification, Immobilization and Stabilization of alfa-galactosidase from *Thermus sp.*, strain T2 and the use of immobilized enzymes for Food Processing

Enzymes exhibit excellent catalytic properties and they are potential industrial catalysts in food technology. However, enzymes also exhibit several important limitations for industrial application. In general, enzymes have to be greatly improved before their application in industrial reactors. The preparation of new biocatalyst of alfa-galactosidase and their use in hydrolysis and transglycosilation are reported in this p.H.D. Thesis. In addition to the specific interest of alfa-galactosidase this work has been planned as an example useful for any enzyme suitable in Food Processing. A thermo-resistant enzyme from a thermophilic microorganism (*Thermus sp.*, strain 2) was used as model and interesting native enzyme. A set of multidisciplinary tools of enzyme engineering were here developed:

a.- Production and over-expression of the enzyme in a GRAS mesophilic Host (*E. coli* MC2508). The levels of expression of an active and stable recombinant enzyme were optimized.

b.- Very simple protocols for enzyme purification were developed: a. the enzyme is more thermo-resistant than most of proteins from *E.coli* (mainly the largest ones). b.- a large protein (eg., 53.500 dalton alfa-galactosidase) can be purified from smaller proteins via a selective adsorption on lowly activated anion-exchange supports.

c.- New protocols for reversible and irreversible immobilization-stabilization of pure alfa-galactosidase were developed. Very active and very stable immobilized derivatives could be obtained. A new one-step protocol for purification, immobilization and stabilization of the enzyme was also developed.

d.- The possible dissociation of the multimeric (hexameric) structure of the enzyme was studied. The role of dissociation on thermal stability was also studied. By using a lowly stabilized derivative (the enzyme immobilized on BrCN-agarose) the crosslinking of subunits with aldehyde-dextran polymers was studied and optimized. In addition to a thermal stabilization (under certain experimental condition) a possible delivery of enzyme subunits during food processing becomes now impossible.

e.- Hydrolysis and Transglycosilations catalyzed by immobilized-stabilized alfa-galactosidase were also studied.

Abstract

As a consequence of this multidisciplinary approach very active and stable alfa galactosidase derivatives were prepared. Derivatives preserving 80% of catalytic activity and being 500 fold more stable than a very stable soluble enzyme. These derivative were very useful for the hydrolysis of raffinose and melibiose in liquid systems (eg., soya milk derivatives). In addition to that , interesting transglycosylations were observed when using melibiose as substrate and the best derivatives as catalysts.

Produção, Purificação, Imobilização e Estabilização da alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* espécie T2. para a sua utilização no processamento de alimentos

As enzimas possuem excelentes propriedades catalíticas como possíveis catalizadores industriais em química e tecnologia de alimentos. Não obstante, apresentam algumas limitações importantes para a sua aplicação industrial. Na imensa maioria dos casos, as enzimas devem ser rigorosamente melhoradas para a sua aplicação industrial. Nesta Tese pretendemos estudar a preparação de biocatalizadores de uma alfa-galactosidasa e o seu possível uso para processos de hidrólise e transglicosilação como um exemplo de Engenharia de Biocatalizadores para Tecnologia de Alimentos. Deste modo utilizamos de partida uma enzima muito estável de microorganismos termofílicos (*Thermus sp.*) e desenvolvemos um conjunto de ferramentas multidisciplinares de engenharia enzimática, para melhorar muito mais as suas propriedades:

a.- Produção da enzima num hospedador mesofílico e GRAS (*E. coli* MC 2508), otimizando os níveis de expressão e a produção de uma enzima activa e estável.

b.- Desenvolvimento de protocolos muito simples de purificação da enzima com vista a uma possível utilização a escala industrial: tratamento térmico (no qual a nossa enzima era a única proteína de elevado peso molecular que se mantinha solúvel e intacta entre as proteínas de *E.coli*MC2508) e aproveitamento do elevado peso molecular da nossa enzima (350.000 dalton) para a sua adsorção selectiva sobre suportes de intercâmbio aniónico muito pouco activados.

c.- Desenvolvimento de novos métodos de imobilização reversível e irreversível da enzima: Métodos muito simples, com elevada retenção da actividade catalítica e com significantes aumentos de estabilidade desta enzima nativa, já por si, muito estável. Neste sentido, fomos capazes de desenvolver um novo protocolo para a purificação, imobilização e estabilização da enzima num único passo.

d.- Estudo da dissociação da estrutura multimérica da enzima e da sua influência sobre a sua estabilidade em diferentes condições. Aplicação de estratégias de estabilização de enzimas multiméricas imobilizadas por um entrecruzamento posterior com dextrano aldeído.

e.- Desenho de processos de hidrólise e transglicosilação catalizados pelos melhores derivados enzimáticos. Estudos de inibição por produtos da reacção, estudos de cursos de hidrólises total e de produção de alfa-galactósidos.

Resumo

Como consequência destes estudos fomos capazes de obter grandes quantidades de uma enzima pura, muito activa e muito termorresistente. Fomos capazes de imobilizá-la com retenção de mais de 80 % de actividade e aumentando a sua estabilidade mais de 500 vezes. Os derivados eram muito activos e muito estáveis a diferentes pHs e temperaturas, não libertavam nem sequer sinais de proteína no meio e resultaram ser muito bons catalizadores para a hidrólise de rafinosa e melibiosa (pe., presentes no leite de soja). No caso da melibiosa, alguns derivados deram lugar a interessantes processos de transglicosilação.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

a1

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Las enzimas como catalizadores industriales	1
1.2.	Limitaciones para el uso de enzimas como catalizadores industriales	2
1.3.	Ingeniería enzimática	3
1.4.	Utilización de enzimas de microorganismos termófilos	5
1.5.	Enzimas recombinantes para el procesado de alimentos	7
1.6.	Utilización de enzimas recombinantes purificadas, inmovilizadas y estabilizadas	8
1.7.	La alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 en tecnología de alimentos	8
2.	OBJETIVOS	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	Materiales	13
3.2.	Métodos	14
3.2.1.	Condiciones de crecimiento y otros procedimientos	14
3.2.2.	Medios de cultivo	15
3.2.3.	Clonaje y secuenciación	15
3.2.4.	Ensayos de actividad enzimática	16
3.2.4.1.	Determinación de la actividad alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	16
3.2.5.	Caracterización bioquímica de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	17
3.2.5.1.	Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática	17
3.2.6.	Estudios cinéticos	18
3.2.6.1.	Determinación de las propiedades cinéticas	18
3.2.7.	Purificación de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	18
3.2.7.1.	Purificación por tratamiento térmico del extracto enzimático	18
3.2.7.2.	Purificación por adsorción a soportes MANAE-agarosa con distinto grado de activación	18

3.2.7.2.1. Adsorción de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 sobre soportes MANAE-agarosa	19
3.2.7.3. Desorción de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 previamente adsorbida sobre soporte MANAE-agarosa	19
3.2.8. Purificación de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 por adsorción a diferentes soportes sepabeads previamente activados con grupos IDA	20
3.2.8.1. Preparación de los soportes sepabeads-IDA-Cu ²⁺ y sepabeads-Ni ²⁺ -quelato	20
3.2.8.2. Caracterización Físico-Química de los soportes sepabeads-IDA-Me ⁺	20
3.2.8.2.1. Determinación de la concentración de iones metálicos	20
3.2.8.2.2. Determinación del tamaño de los poros y la distribución de los mismos en el soporte sepabeads-EB-Me ⁺ - quelato	21
3.2.8.2.3. Adsorción de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 sobre soportes sepabeads-IDA-metal	21
3.2.8.2.4. Desorción de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 adsorbida a soportes sepabeads-IDA-metal	21
3.2.9. Análisis por SDS-PAGE	22
3.2.10. Análisis por filtración en gel	22
3.2.11. Inmovilización de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 sobre diferentes soportes	
3.2.11.1. Preparación de soportes para la inmovilización reversible	23
3.2.11.1.1. Soporte Glioxil-agarosa	23
3.2.11.1.2. Soportes MANAE-agarosa recubiertos con Dextrano-sulfato de distinto peso molecular	23
3.2.11.1.3. Soportes agarosa polietilenimina	24
3.2.11.2. Preparación de soportes para la inmovilización irreversible	24
3.2.11.2.1. Protocolos generales de inmovilización	24
3.2.11.2.2. Soporte Glutaraldehído	24
3.2.11.2.3. Inmovilización reversible por adsorción a intercambiadores iónicos	25
3.2.11.3. Inmovilización irreversible de la enzima por unión covalente	25
3.2.11.3.1. Inmovilización sobre agarosa activada con BrCN	25
3.2.11.3.2. Inmovilización sobre soportes activados con glutaraldehído	26
3.2.11.3.3. Inmovilización sobre soportes Glioxil-agarosa	26
3.2.11.3.4. Inmovilización de la enzima sobre soportes epóxido y amino-epóxido	26
3.2.11.4. Entrecruzamiento con glutaraldehído de la enzima adsorbida	27
3.2.11.5. Reducción de derivados con borohidruro sódico	27

3.2.11.6. Modificación de enzimas con dextrano aldehído	28
3.2.11.6.1. Preparación de dextrano aldehído	28
3.2.11.6.2. Modificación de enzimas con dextrano aldehído	28
3.2.11.7. Análisis de la estabilización de las subunidades de la enzima inmovilizada	29
3.2.11.7.1. Purificación, inmovilización y estabilización de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2, en solo paso	29
3.2.12. Estudio de la fuerza de unión de la enzima a soportes iónicos	29
3.2.13. Estudio de estabilidad de los derivados obtenidos	29
3.2.13.1. Estabilidad térmica de los derivados	29
3.2.14. Reacciones de interés con las alfa-galactosidasas: hidrólisis de melibiosa y de rafinosa	30
3.2.14.1. Reacciones de transglucosilación. Hidrólisis de galacto-oligosacáridos (GOS)	31
3.2.14.2. Estudios cinéticos	31
3.2.14.2.1. Cálculo de las constantes cinéticas	31
4. RESULTADOS	33
4.1. Expresión del gen de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 en <i>Escherichia coli</i> MC2508	33
4.2. Producción y extracción de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	35
4.3. Caracterización bioquímica de la enzima	36
4.3.1. Influencia de la Temperatura en la actividad de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	36
4.3.2. Influencia del pH en la actividad alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	37
4.3.3. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	38
4.3.4. Especificidad de la enzima hacia diferentes sustratos	40
4.4. Purificación de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	42
4.4.1. Purificación por métodos físicos: tratamiento térmico	42
4.4.2. Purificación de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2, por adsorción selectiva a soportes MANAE-agarosa con diferentes grados de activación	43
4.5. Inmovilización de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2	47
4.5.1. Estudio de la estabilidad alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 en las condiciones de interés para su inmovilización y estabilización	47
4.5.2. Inmovilización reversible sobre diferentes tipos de soportes intercambiadores	

iónicos	48
4.5.3. Cinética de inmovilización de la enzima alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2, sobre soportes iónicos	48
4.5.4. Evaluación de la fuerza de unión de la enzima en los diferentes soportes	49
4.5.5. Estabilidad térmica de los biocatalizadores obtenidos por inmovilización reversible de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 en diferentes soportes	50
4.5.6. Efecto de la temperatura en la actividad del derivado PEI-agarosa	51
4.5.7. Efecto del pH en la actividad del derivado PEI-agarosa	52
4.5.8. Estabilidad frente al pH y la temperatura de la enzima soluble y los derivados MANAE-agarosa y PEI-agarosa	53
4.6. Purificación, inmovilización reversible y estabilización en un solo paso de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 sobre soporte sephabeads-quelato en presencia de imidazol	53
4.6.1. Adsorción-purificación de la enzima	53
4.6.2. Capacidad de carga y estabilidad térmica	56
4.6.3. Inmovilización irreversible de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 por unión covalente multipuntual	57
4.6.3.1. Rendimientos de inmovilización covalente de la alfa-galactosidasa sobre distintos soportes	57
4.6.3.2. Cinética de inmovilización covalente de la alfa-galactosidasa sobre los distintos soportes	58
4.6.3.3. Estabilidad térmica de las preparaciones de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 inmovilizados covalentemente	59
4.6.3.4. Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de los derivados inmovilizados covalentemente	60
4.6.3.4.1. Efecto del pH	60
4.6.3.4.2. Efecto de la temperatura	60
4.6.4. optimización de la inmovilización irreversible de la alfa-galactosidasa sobre MANAE-agarosa: entrecruzamiento con glutaraldehído	61
4.6.5. Estabilidad térmica de los derivados preparados sobre soportes MANAE-agarosa	63
4.7. Optimización de derivados de la alfa-galactosidasa de <i>Thermus</i> sp. T2 inmovilizada sobre soportes BrCN-agarosa por entrecruzamiento con dextrano aldehído	64

4.7.1. Efecto de la dilución del derivado BrCN-agarosa en la estabilidad frente a pH y frente a temperatura	66
4.8. Reacciones de interés con alfa-galactosidasa y sus derivados	67
4.8.1. Estudio de las cinéticas de inhibición de la alfa-galactosidasa de thermus sp. T2 soluble y de los derivados MANAE-glutaraldehído y PEI-glutaraldehído por los productos de las reacciones de mayor interés en tecnología de alimentos	67
4.8.2. Hidrólisis de rafinosa y melibiosa	69
4.8.3. Síntesis de galactooligosacáridos (GOS)	70
5. DISCUSIÓN	75
6. CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFIA	83
ANEXOS	

Ag	Agarosa
Ap ^r	Resistencia a ampicilina
ATCC	Colección Americana de cultivos tipo
BCL	Beads Cross Linked
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CECT	Colección Española de cultivos tipo
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas.
CM	Carboximetil
CNBr	Bromuro de cianógeno
DEAE	Dietilaminoetil
EDA	Etilendiamina
FDA	Administración de fármacos y alimentos de los EEUU
Glu	Glutaraldehído
Glutaraldehído-agarosa	soporte MANE-agarosa activado con glutaraldehído
GOS	Galacto-oligosacárido
GRAS	Generally recognized as safe= productos considerados generalmente seguros (microorganismos empleados en la elaboración de alimentos)
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IDA	Ácido Iminodiácetico
IFI	Instituto de fermentaciones industriales
IMAC	Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos
IPTG	Isopropopil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Miles de pares de bases
kDa	Kilodaltons
K _i	Constante de inhibición
K _m	Constante de afinidad
lacI	Gen represor del operón lactosa

Abreviaturas

LB	Luria Bertani (Medio de Cultivo)
MANAE	Soporte Mono-Amino-etil-N-Amino-etil
MANAE-Glutaraldehido	Derivado enzimático adsorbido sobre MANAE-agarosa y entrecruzado con glutaraldehido
nG	Nanogramo
PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimeraza
PEI	Poli-etilénimina
pNPG	para-nitrofenil-alfa-D-galactopiranosido
pNP	para-nitrofenil
p/v	Peso/volumen
SDS	Sodio Dodecil sulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
Sepabeads EC-EP	Matriz sepabeads activada con grupos epóxido
Sepabeads EC-HFA	Matriz sepabeads activada con el mismo número de grupos epóxido que de grupos amino secundarios
UI	Unidad internacional de actividad Enzimática
v/v	Volumen/volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Purificación, Inmovilización y Estabilización de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* cepa T2 para su uso en el Procesado de alimentos.

Las enzimas poseen unas excelentes propiedades catalíticas como posibles catalizadores industriales en química y tecnología de alimentos. Sin embargo poseen también importantes limitaciones para su aplicación industrial. En la inmensa mayoría de los casos las enzimas deben ser notablemente mejoradas para su aplicación industrial. En esta Tesis pretendemos estudiar la preparación de biocatalizadores de una alfa-galactosidasa y su posible uso para procesos de hidrólisis y trans-glicosilación como un ejemplo de Ingeniería de Biocatalizadores para Tecnología de Alimentos. De este modo utilizamos de partida una enzima de microorganismos termófilo (*Thermus sp.* T2) y desarrollamos un conjunto de herramientas multidisciplinarias de ingeniería enzimática:

a.- Producción de la enzima en un hospedador mesófilo y GRAS (*E. coli* M2508). Optimizando los niveles de expresión y la expresión de una enzima activa y estable

b.- Desarrollo de protocolos muy sencillos de purificación de la enzima con vistas a una posible utilización a escala industrial: tratamiento térmico (donde nuestra enzima era mucho más estable que las proteínas de *E. coli* y especialmente las de elevado peso molecular) y aprovechamiento del elevado peso molecular de nuestra enzima (350.000 dalton) para su adsorción selectiva sobre soportes de intercambio aniónico muy poco activados

c.- Desarrollo de nuevos métodos de inmovilización reversible e irreversible de la enzima: Métodos muy sencillos, con elevada retención de actividad catalítica y con importantes aumentos de la estabilidad de esta enzima nativa ya muy estable. Desarrollo de un nuevo protocolo para la Purificación, Inmovilización y Estabilización de la Enzima en un único Proceso

d.- Estudio de la Disociación de la Estructura Multimérica de la Enzima y de su influencia sobre la Inactivación de la enzima. Aplicación de Estrategias de Estabilización de Enzimas Multiméricas Inmovilizadas por entrecruzamiento posterior con dextrano aldehído.

e.- Diseño de procesos de Hidrólisis y Transglicosilación Catalizados por los mejores derivados Enzimáticos. Estudios de Inhibición por productos de la reacción, estudios de cursos de hidrólisis totales

Resumen

Como consecuencia de estos estudios fuimos capaces de obtener grandes cantidades de una enzima pura muy activa y muy termo-resistente. Fuimos capaces de inmovilizarla con retención de más del 80 % de actividad y aumentando su estabilidad más de 500 veces. Los derivados sean muy activos y muy estables a diferentes pHs y temperaturas y resultaron ser muy buenos catalizadores para la hidrólisis de rafinosa y melibiosa (pe., presentes en la leche de soja). En el caso de la melibiosa algunos derivados dieron lugar a interesantes procesos de transglucosilación

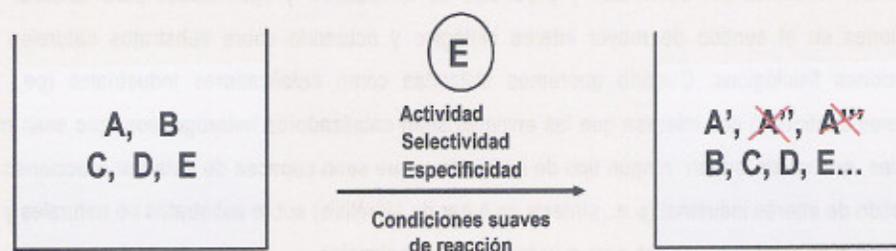
PURIFICACIÓN, INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE ALFA-GALACTOSIDASA DE *Thermus* sp. CEPA T2: POSIBLES APLICACIONES PRÁCTICAS.

1. Introducción

1.1. Las enzimas como catalizadores industriales

Las enzimas son catalizadores muy activos, selectivos y específicos y por ello capaces de catalizar una única transformación de un sustrato complejo presente en una mezcla de sustancias similares. En principio las enzimas podrían ser capaces de catalizar miles de procesos de posible interés industrial en condiciones experimentales y medioambientales muy suaves. Serían nuevos y mejores catalizadores casi-ideales para el diseño de procesos industriales de química sostenible: mínima formación de subproductos, ausencia de reactivos tóxicos, mínimos requerimientos energéticos, reducción de etapas de reacción, etc.

Por todo ello las enzimas presentan excelentes perspectivas de utilización industrial en Química Fina y Farmacéutica, en Química de Alimentos, en Química Analítica, etc.



- Química de alimentos
- Química orgánica y farmacéutica
- Química ambiental
- Biosensores
- Aprovechamiento integral de residuos agrícolas

Figura 1. Las enzimas como posibles catalizadores industriales

En el área de tecnología de alimentos las enzimas presentan excelentes perspectivas de utilización:

- a.- Modificación química de un único componente de un alimento (pe., hidrólisis de lactosa en leche) en condiciones muy suaves y dejando intactos todos los demás componentes del alimento (proteínas, vitaminas, etc.).
- b.- Síntesis de aditivos alimentarios (para la producción de alimentos prebióticos) sin formación de subproductos tóxicos.
- c.- Diseño de Biosensores enzimáticos para cuantificar la presencia de determinados compuestos en alimentos (lactosa, glucosa, glutamatos, etc.).

1.2. Limitaciones para el uso de enzimas como catalizadores industriales.

A pesar de sus excelentes propiedades catalíticas, las enzimas presentan generalmente algunas limitaciones para su uso industrial, debido a su origen biológico. Así, a lo largo de la evolución las enzimas se han ido optimizando para cumplir mejor su papel fisiológico y no para ser utilizadas en reactores industriales. Las enzimas son catalizadores solubles, generalmente inestables, inhibibles por substratos y productos de la reacción y optimizadas para catalizar las reacciones en el sentido de mayor interés biológico y actuando sobre substratos naturales en condiciones fisiológicas. Cuando queremos utilizarlas como catalizadores Industriales (pe., en reactores continuos) nos interesa que las enzimas sean catalizadores heterogéneos, que sean muy estables, que no sufran ningún tipo de inhibición y que sean capaces de catalizar reacciones en el sentido de interés industrial (p.e., síntesis en lugar de hidrólisis) sobre substratos no naturales y en condiciones de reacción inocuas pero a veces no convencionales.

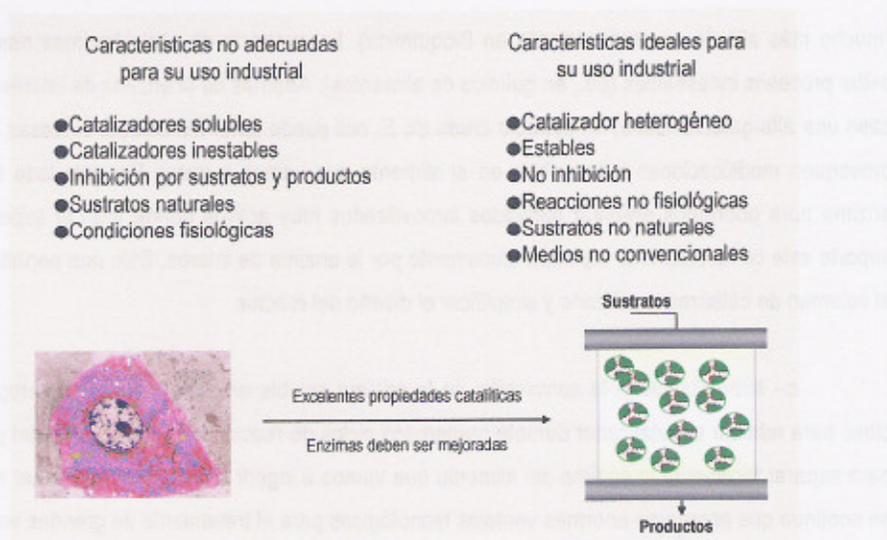


Figura 2. Propiedades catalíticas de las enzimas

1.3. Ingeniería enzimática

Podemos considerar la Ingeniería Enzimática como el conjunto de todo tipo de técnicas que nos permitan mejorar las posibilidades de utilización industrial de las enzimas. En principio es una disciplina ampliamente multidisciplinaria ya que incluye técnicas de Microbiología, Biología Molecular, Bioquímica, Ciencia de Materiales, Química-Física de Proteínas, Química Orgánica, Ingeniería Química, etc. En la presente Tesis Doctoral se abordan cinco problemáticas de Ingeniería Enzimática diferentes que vamos a comentar a continuación:

a.- Expresión de una alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en *Escherichia coli*. Esto nos permite obtener grandes cantidades de enzima (entre un 5 y un 10 % del total de proteínas intracelulares) baratas y fáciles de purificar.

b.- Purificación de la enzima.- La posibilidad de utilizar enzimas puras y baratas es una herramienta fundamental dentro de la Ingeniería de Procesos Químicos Catalizados por Enzimas

(mucho más allá de su propio interés en Bioquímica). La ausencia de otras enzimas nos permite evitar procesos indeseables (pe., en química de alimentos). Además de la enzima de interés (en este caso una alfa-galactosidasa) un extracto crudo de *E. coli* puede tener hidrolasas, oxidasas, etc. que provoquen modificaciones indeseables en el alimento que vamos a tratar. Por otro lado al utilizar enzima pura podremos preparar derivados inmovilizados muy activos donde toda la superficie del soporte este completamente tapizada únicamente por la enzima de interés. Esto nos permite reducir el volumen de catalizador utilizado y simplificar el diseño del reactor.

c.- Inmovilización:- la conversión de la enzima soluble en un catalizador heterogéneo es clave para reusar el catalizador durante numerosos ciclos de reacción (abaratamiento del proceso), para separar fácilmente la enzima del alimento que vamos a ingerir e incluso para diseñar reactores en continuo que presentan enormes ventajas tecnológicas para el tratamiento de grandes volúmenes de reacción.

d.- Inmovilización-Estabilidad-Estabilización.- La inmovilización de enzimas está íntimamente ligada con su estabilidad. Precisamente las inmovilizamos para reusar, pero solo se pueden reusar si son muy estables. Así pues, la disponibilidad de enzimas muy estables (p.e., procedentes de microorganismo termófilos) y la asociación de los procesos de inmovilización con estrategias de estabilización adicional nos permiten aumentar significativamente las posibilidades de utilización industrial de las enzimas.

e.- Diseño de la Reacción.- Una vez que disponemos de derivados baratos, activos y estables de las enzimas de interés tenemos que diseñar las mejores condiciones de reacción (pH, temperatura, etc) para optimizar actividad, estabilidad, ausencia de inhibiciones, etc. En el caso de la química de alimentos, es bastante importante el hecho de poder trabajar a temperaturas moderadamente altas para evitar contaminaciones microbianas (un alimento sería un caldo de cultivo muy interesante para numerosos microorganismos). Tampoco podemos utilizar pHs extremos (incluso aunque las enzimas fuesen muy estables), ya que no nos interesa dañar en absoluto ninguno de los componentes del alimento. Por otro lado, además de la reacción "natural" de la enzima (p.e., hidrólisis catalizada por alfa-galactosidasas) nos puede interesar el diseño de nuevos

procesos para los que la enzima no estaba diseñada biológicamente (p.e., reacciones de transglicosilación). Ahora tendremos que estudiar qué derivados y qué condiciones experimentales son los mejores para catalizar estos nuevos procesos.

Ingeniería Enzimática: Muchas Herramientas, Multidisciplinar e Integrado

- Microbiología
- Biología molecular
- Bioquímica
- Ingeniería bioquímica
- Ingeniería química
- Química orgánica
- Electroquímica

1.4. Utilización de enzimas de microorganismos termófilos

Los componentes celulares (pe., las enzimas) de los microorganismos termorresistentes son también termorresistentes. Esta termoestabilidad está muchas veces relacionada también con una mayor estabilidad frente a cualquier agente distorsionante (pH, codisolventes, etc). Por todo ello, las enzimas de microorganismos termófilos (cuando son también muy activas) presentan un gran interés para ser usadas como catalizadores industriales, por ejemplo en el área de la tecnología de alimentos. Los microorganismos termófilos son aquellos microbios que necesitan para desarrollar sus actividades fisiológicas temperaturas superiores a 50°C. (Haki et al, 2003).



Figura 3. Geiser en el Parque Nacional Yellowstone, EEUU con aguas termales calientes, de donde se retiró la muestra de agua conteniendo microorganismos extremófilos y de ellos se aisló la cepa de *Thermus* sp. T2.

Introducción

Los que han de crecer entre 80 y 115°C son conocidos como hipertermófilos. Las enzimas termoestables, gracias al ingente conocimiento disponible sobre muchas de ellas, tanto en relación a su origen como a su modo y características de empleo, son cada vez más interesantes para la industria agroalimentaria. El avance en lo que a número de microbios termofílicos aislados se refiere, ha sido una de las causas fundamentales de la posibilidad de empleo de nuevas enzimas. (Herbert and Sharp, 1992).

La enzima termorresistente más utilizada en la industria agroalimentaria es la amilasa, necesaria para la industria del almidón. También han sido utilizadas enzimas termorresistentes en procesos industriales relacionados con la alimentación, tales como en la síntesis de aminoácidos. (Sarikaya y col. 2000; Satosi y col, 2001). También podrían ser bastante útiles tanto beta-galactosidasas (hidrólisis de lactosa, síntesis de oligosacáridos, etc) como la alfa-galactosidasa que se propone en la presente Tesis Doctoral.



Figura 4. *Thermus* sp. En imagen tomada mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido ("Scanning electrón microscopy")

1.5. Enzimas recombinantes para el procesado de alimentos

La producción de enzimas mediante el empleo de microorganismos recombinantes permite la obtención de enzimas sin necesidad de contar con la cepa salvaje, lo que hace incluso posible fabricar enzimas de microorganismos no cultivables, extrayendo su ADN y trabajando a partir de él. Cuando se utilizan enzimas solubles en agroalimentación, la enzima recombinante, como cualquier otra proteína, es degradada y metabolizada tras su ingestión. Por ello aunque la enzima esté expresada en microorganismos seguros tenemos que estar seguros de que la enzima recombinante no produce alergenicidad. (Kumar y Nussinov, 2001); Zofia y col. 2006).

La primera enzima utilizada en procesado de alimentos data de 1874, cuando el científico danés Christian Hansen extrajo la renina (quimosina) del estómago de las vacas, para su empleo en la industria quesera. (Nielsen y col. 1994). Precisamente la quimosina es producida en la actualidad mediante ingeniería genética, en la cepa *Escherichia coli* K-12, cuyo genoma contiene clonada la proquimosina bovina y ha llegado a ser la primera enzima recombinante aprobada por la FDA, para su empleo en la industria alimentaria y por tanto considerada como GRAS (*Generally recognized as safe*). (Flamm, 1991). La regulación GRAS, que es la más importante sobre garantía de calidad higiénico-sanitaria y, por tanto, de seguridad de un ingrediente alimentario (Gaynor, 2006).

La búsqueda del huésped adecuado, la construcción del vector de interés, la transformación del huésped con la incorporación a su genoma de la proteína clonada, son las etapas que se siguen de ordinario en este tipo de desarrollos. Suelen ser huéspedes recomendables aquellos para los cuales existan herramientas moleculares en cantidad suficiente para optar por la mejor de ellas, y además es recomendable que no sean patógenos ni alterantes, es decir GRAS, como lo son los hongos *Aspergillus oryzae* y *A. Niger*, o la bacteria *Escherichia coli* K-12 y sus cepas derivadas. (<http://www.cfsan.fda.gov>). Esta bacteria, en vez de secretar la enzima al medio, lo que hace es acumularla en su interior. En 1990, la FDA afirmó que la quimosina bovina producida en *E. coli* K-12 era apta para su uso en alimentación y ello supuso un auténtico hito en la comercialización de enzimas recombinantes, dada la dureza y exigencia del protocolo a superar. (Flamm, 1991). Las evidencias bibliográficas indicaban ya que *E. coli* K-12 era un microorganismo seguro porque sus más de 30 años de empleo como herramienta biotecnológica no había producido jamás un caso de daño a humanos. Su genoma fue secuenciado en 1997. (Blattner, y col. 1997). *E. coli* MC1116,

cepa utilizada en esta tesis como hospedador heterólogo de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 es una cepa derivada de *Escherichia coli* K-12.

1.6. Utilización de enzimas recombinantes purificadas, inmovilizadas y estabilizadas

Cuando producimos una enzima recombinante en un microorganismo GRAS y posteriormente la purificamos a homogeneidad, la única fuente de alergenicidad es la enzima recombinante. Cuando esta enzima se usa inmovilizada covalentemente (a través de enlaces irreversibles y estables) para modificar alimentos líquidos, las posibilidades de reacciones alérgicas son prácticamente nulas. Incluso, si la enzima es multimérica hemos de asegurarnos que todas las subunidades están inmovilizadas sobre el soporte o entrecruzadas químicamente entre sí. En este caso la seguridad del tratamiento de alimentos con este tipo de derivados enzimáticos es total. (Pessela, 2002; Mateo y col. 2004; Dong y col. 1997; Velikodvorskaya y col. 1997).

1.7. La alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en tecnología de alimentos

Dentro de las líneas de aplicaciones agroalimentarias de las enzimas es importante la que está relacionada con los tratamientos de productos vegetales. Por ejemplo, las leguminosas son una fuente de alimentación importante tanto para el hombre como para los animales, ya que a partir de ellas se obtienen preparados (harinas, papillas, leche de soja), algunos de los cuales tiene una importancia especial en alimentación infantil y geriátrica. Las leguminosas, contienen oligosacáridos, como melibiosa, rafinosa y estaquiosa, difícilmente metabolizables por el ser humano, ya que carece de la alfa-(1-6)-galactosidasa en el intestino humano o de animales monogástricos. Los alfa-galactósidos no hidrolizados llegan al intestino grueso, donde sufren la fermentación anaerobia, produciendo dióxido de carbono, hidrógeno y trazas de metano, que son el origen de la flatulencia. La presencia de estos compuestos en productos derivados de las leguminosas tales como papillas, puede reducirse mediante tratamiento con alfa-galactosidasas solubles. En el caso de alimentos líquidos, como la cada vez más popular leche de soja, la eliminación de oligosacáridos con alfa-galactosidasa inmovilizada podría ser muy interesante. Guimaraes y col. 2001 y 2006; Kotwal, y col. 1998; (Gote y col. 2004).

También se aplica la alfa-galactosidasa para la hidrólisis de los mencionados azúcares en otras materias primas de la industria alimentaria como la melaza de remolacha. La eliminación de la D-rafinosa en las melazas de remolacha mediante alfa-galactosidasas se ha empleado para facilitar la cristalización de la sacarosa, y por consiguiente, el rendimiento global del proceso. La enzima alfa-galactosidasa además, está implicada en la maduración de frutos y en la elaboración de fibra con interés nutracéutico, tanto en diabetes como en dietas de adelgazamiento (Vuorinen, y col. 1992).

En la presente Tesis Doctoral utilizaremos una alfa-galactosidasa obtenida de la cepa *Thermus* sp. T2 que se aisló en aguas termales del Parque Nacional de Yellowstone. Esta cepa mostró una temperatura óptima de crecimiento de 70°C, en agitación y pH 7,7. La cepa, por sus características morfológicas y de cultivo, pertenece a la especie *Thermus aquaticus*, única especie reconocida de este género y se encuentra depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC 27737). La enzima se expresó en el hospedador *E. coli* MC 2805, que es una cepa derivada de *Escherichia coli* K-12 y por tanto un microorganismo GRAS.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis DOCTORAL es el desarrollo de herramientas multidisciplinares para el diseño de biocatalizadores muy activos y muy estables de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2* y su evaluación como posible catalizador industrial tanto para la hidrólisis de oligosacáridos en alimentos líquidos como para la síntesis de oligosacáridos de carácter prebiótico.

Este objetivo principal incluye los siguientes sub-objetivos

a.- expresión de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2* en el hospedador GRAS *E.coli* MC2805

b.- purificación de la enzima basándonos en

1.- su resistencia al calor comparada con las proteínas de *E.coli*

2.- su gran tamaño comparado con las proteínas de *E.coli* resistentes al calor

c.- inmovilización-estabilización por adsorción reversible muy intensa

d.- inmovilización-estabilización por unión covalente multipuntual a través de diferentes regiones de la enzima

e.- estabilización de la estructura cuaternaria de la enzima inmovilizada

f.- desarrollo de una nueva estrategia de purificación, inmovilización reversible y estabilización de la enzima

g.- diseño de reacciones de hidrólisis y transglicosilación de rafinosa y melibiosa usando los mejores derivados inmovilizados y estabilizados (comparándolos con la enzima soluble).

Independientemente del indudable interés industrial de la alfa-galactosidasa en esta Tesis Doctoral pretendemos desarrollar estrategias generales de preparación de biocatalizadores enzimáticos muy activos, muy estables y muy útiles en química de alimentos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Proveedor, país	Enzima, plásmidos y sustratos
Coli Genetic Stock Center, University of Yale	cepa <i>Escherichia coli</i> MC 2508
Roche Molecular Diagnostics, EEUU cedido por el Dr Y. Koyama, Japón	Enzimas de restricción pOS105 pIN-III- <i>lpp</i> ^{P5} -A3
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)	p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido, p-nitrofenil- α -D-maltósido, p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, p-nitrofenil- α -D-xilopiranosido, p-nitrofenil- α -D-mannopiranosido y p-nitrofenil- β -D-mannopiranosido, melibiosa, rafinosa, galactosa, sacarosa y glucosa.
Proveedor, país	Soportes
Hispanagar S.A. (Burgos, España)	Agarosa 4BCL
Amershan Bioscience (Uppsala, Suecia)	Agarosa 4BCL activada con bromuro de cianógeno
Resindion S. R. L. Mitsubishi Chemical Co. (Milán, Italia)	Sepabeads-epóxido (EC-EP) ; Sepabeads-amino epóxido (EC-HFA1).
GE Healthcare (Suecia)	DEAE-cefarosa y carboximetil-agarosa.
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)	Dextrano sulfato
Proveedor, país	Otros reactivos
Merk (Darmstadt, Alemania)	Imidazol
Antibióticos S.A. (Burgos, España)	Ampicilina y clorafenicol
Fluka (Neu Ulm, Germany)	Etilendiamina, etanolamina, NaBH ₄ , peryodato de sodio, glutaraldehído 25%, polietilenimina 25 y 600-1000 kDa, ácido iminodiacético (IDA), dextranos de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> diferentes pesos moleculares y CuSO ₄ .
Panreac Química S.A. (España)	NaCl (Barcelona, España)
Pierce (Rockford, Il, EEUU)	Reactivo de Bradford, reactivo Coomassie Brilliant Blue
Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)	Solución de 30% de acrilamida/bisacrilamida y bisacrilamida al 2%
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)	Glicina
Proveedor, país	INSTRUMENTOS MÁS USADOS
BECKMAN INSTRUMENTS, INC. Calif., EEUU	Centrifugadora, Beckman Coulter Avanti J-25
Bottmingen, CA, USA	Incubadora, Unitron AJ200 shaker, Infors AG,
J.P. Selecta S.A., Barcelona, España	Banho termostático

Shimadzu Corporation.Tokyo, Japón	Espectrofotómetro, Shimadzu UV-1201V
J.P. Selecta S.A., Barcelona, España	Agitador rotatorio (Movil-Rod) por rulos de doble movimiento de rotación y balancín - Sin calefacción
Hitachi kaki Co., Ltd., Tokyo, Japón	Micro-centrifugadora, Millipore
Crison Instruments, Barcelona, España	Medidor de pH, micro pH 2001 "CRISON"
Pharmacia Biotech LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden	Electrophoresis Power Supply EPS 600
LC, Lab-Center, S.L. (Labortechnik Staufen, Alemania)	Agitador de palas
American Instrument Co. Inc., Maryland, EEUU	Prensa de French

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Condiciones de crecimiento y otros procedimientos

Todos los resultados presentados en esta memoria, posteriores al clonaje, representan valores promedios de, al menos tres experimentos, y en todos los casos, el error experimental nunca fue superior al 5%.

La cepa *Escherichia coli* MC 2508 (Scmitt, 1968), interesante por carecer de actividad α -galactosidasa debido a llevar la mutación *meIA*, número referencia 4926 del Coli Genetic Stock Center, University of Yale), fue usada para llevar a cabo los experimentos de clonación y expresión de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2. Los plásmidos usados fueron pOS105 amablemente cedido por el Dr Y. Koyama (1990) y pIN-III-lpp^{P5}-A3 (Inouye e Inouye, 1985), que incorpora los sitios de restricción XbaI y EcoRI imprescindibles para el clonaje del gen *aglA*, el gen de resistencia a ampicilina Ap^R que sirve para seleccionar transformantes, y los promotores de hiperexpresión lpp^P-lac^{P0}. Los cultivos microbianos necesarios se realizaron en caldo o agar Luria Bertani (LB), suplemento con 150 microgramos por ml de ampicilina, incubando a una temperatura de 37°C, durante 12 horas y con agitación de 200 rpm en un agitador incubador (Unitron, Infors, Suiza). Los microorganismos fueron recolectados por centrifugación (Beckman. Instruments, Inc., Fullerton, Calif. EEUU), resuspendidos posteriormente en 50 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7, con posterior ruptura celular en Prensa French (Pessela y col., 2003).

3.2.2. Medios de cultivo

Las cepas bacterianas fueron conservadas en caldo LB con 20% (v/v) de glicerol a - 70 °C. En el momento de inocularlas, se descongelaron y se incubaron en caldo LB (Unieron, Infors, Suiza) a 37 °C con 200 rpm de agitación. La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo por tratamiento térmico en autoclave (Autoterm, Selecta, España) a 121 °C durante 20 minutos.

Luria-Bertani (LB) (Sambrook y col., 1989):

Se utilizó como medio de crecimiento habitual de las cepas, los siguientes compuestos adicionado de los correspondientes compuestos antimicrobianos, ampicilin^R (Miller, 1972).

Extracto de levadura (Difco)	0,5% (p/v)
Bacto-triptona(Difco)	1% (p/v)
Cloruro sódico	1%(p/v)
Agua destilada	950 ml.

El medio sólido agar LB se preparó añadiendo Bacto-agar (Difco) a una concentración final de 2% (p/v). Para la selección de transformantes se añadió a este medio ampicilina (Sigma-Aldrich, EEUU) en una concentración final de 150 µg/ml.

3.2.3. Clonaje y secuenciación

Los métodos utilizados siguieron en general protocolos convencionales (Sambrook y col. 1989). La secuenciación del ADN se realizó con un kit PRISM (Applied Biosystems), y un secuenciador automático modelo 377 de la misma casa comercial, usando plásmidos de doble cadena como moldes, y oligonucleótidos universales o específicos como cebadores.

La amplificación por PCR del gen *aglA* se llevó a cabo utilizando 0.5 unidades de *Taq* polimerasa (Perkin Elmer, EEUU), 10 nanogramos del plásmido pOS105, 0.25 µmoles de cada cebador sintético, 25 µmoles de cada dNTP y 2 mM de MgCl₂, en el tampón suministrado por el fabricante. La amplificación se efectuó con un ciclo de 0.5 min de desnaturalización a 95°C, 0.5 min de anillamiento a 52°C y 2.5 min repetidos 30 veces para extensión a 72°C con la polimerasa, con extensión adicional a 72°C durante 7 min, en un termociclador comercial (GeneAmp® PCR System 2400, Perkin-Elmer). Los oligonucleótidos sintéticos utilizados para la amplificación por PCR fueron 5'AGT (Bonsai Technologies, España)

(5'-GCTCTAGAGGGTATTACATATGTCGACTGTACTGGGGGGCTTGG-3'), (Bonsai Technologies, España) que presenta el sitio de restricción *Xba*I subrayado y el codón de inicio en negrita, y el oligo NEBL (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') #1211 (cebador "forward" M13/pUC, New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA). Se comprobó la inserción correcta del producto PCR en la expresión del vector pIN-III-Ipp^{P5}-A3 para la construcción de pAGT1, mediante análisis de secuencia de nucleótidos con un termociclador gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer EEUU).

Para la purificación de fragmentos de ADN a partir de las electroforesis de ADN en geles de agarosa, se empleó el kit basado en la beta-agarasa de New England Biolabs. El X-Gal y el IPTG, necesarios para la selección de transformantes, se adquirieron de Sigma-Aldrich Inc. Alemania.

3.2.4. Ensayos de actividad enzimática

3.2.4.1. Determinación de la actividad alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

La actividad alfa-galactosidasa se midió espectrofotométricamente de forma continua, por el incremento de la absorbancia a 405 nm provocada por la hidrólisis del pNPG a una concentración de 4 mg/ml, disuelto en tampón fosfato sódico pH 7 a 25 y 60 °C, (coeficiente de extinción molar, previamente calculado igual a 10310 mol⁻¹ cm⁻¹ a pH 7). Todos los datos se registraron durante la parte lineal de la reacción. También se utilizaron como sustratos de la enzima *p*-nitrofenil-alfa-D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil-alfa-D-xilopiranosido, *p*-nitrofenil-alfa-D-maltopiranosido y *p*-nitrofenil-alfa-D-manopiranosido, para estudiar otros parámetros cinéticos. La concentración de proteínas fue estimada mediante el método de Bradford (1976), usando como proteína estándar albúmina de suero bovino (BSA).

Para la determinación de la actividad enzimática se empleó un equipo como el que aparece en la figura 1 y la actividad fue calculada según la ecuación siguiente:

$$A_e = \frac{A \cdot 10^3 \cdot V_T \cdot d}{\epsilon \cdot L \cdot V_M}$$

Donde:

A_e: actividad enzimática (U/ml)

A: absorbancia (Unidades de absorbancia / min)

V_T: volumen total de cubeta (ml)

d: dilución

ε⁴⁰⁵: coeficiente de extinción molar (10310 mol⁻¹cm⁻¹)

L: longitud de paso de luz (cm)

V_M: volumen de muestra (ml)



Figura 5. Espectrofotómetro UV-Visible para medidas de actividad enzimática: modelo UV-1601 de SHIMADZU, provisto de agitación y termostatación.

La unidad de actividad alfa-galactosidasa, se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína en las condiciones de ensayo estandarizadas.

3.2.5. Caracterización bioquímica de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2*

3.2.5.1. Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática

La influencia del pH sobre la actividad enzimática de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2* fue determinada utilizando tampones en un rango de pH de 4 a 10, usando 50 mM tampón citrato sódico, (pH 4-5); tampón fosfato sódico, (pH 6-8) y tampón borato sódico, (pH 9-10). Para el estudio de la dependencia de la actividad enzimática con pH, inicialmente se calcularon, para cada pH, los respectivos coeficientes de extinción molar, que vienen definidas mediante la ecuación anteriormente expuesta.

Este parámetro se determinó ensayando alícuotas del extracto enzimático disuelto en tampón fosfato sódico pH 7 y a temperaturas comprendidas entre los 40 y 90 °C, durante diferentes intervalos de tiempo respectivamente. La estabilidad de la enzima se midió en forma de actividad residual tras la incubación del extracto enzimático en ausencia de sustrato a 70, 80 y 90 °C, para diferentes intervalos de tiempo. La actividad alfa-galactosidasa final fue medida a pH 7.0 y 25°C.

3.2.6. Estudios cinéticos

3.2.6.1. Determinación de las propiedades cinéticas

Los experimentos para determinar las constantes cinéticas se llevaron a cabo usando disoluciones de pNPG, en tampón fosfato sódico a 50 mM y pH 7. Las concentraciones de sustrato usadas, estuvieron en un rango entre 1 a 30 mM y a temperaturas de 50 y 60 °C, en baño termostático. Cuando se determinaron estos parámetros usando la enzima inmovilizada, fueron utilizados soportes con una carga enzimática situada entorno a 2-3 U/ml, con la intención de prevenir posibles inconvenientes de difusión. Los valores de K_m y V_{max} , fueron determinados por análisis de regresión no lineal utilizando procedimientos de Lineweaver-Burk (1934), y para la determinación de las constantes de inhibición se usó el método descrito por Cabaille y Combs, (1995).

3.2.7. Purificación de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

3.2.7.1. Purificación por tratamiento térmico del extracto enzimático

El extracto crudo conteniendo la enzima alfa-galactosidasa clonada en el plásmido pAGT1 e hiperproducida en K12, fue inicialmente calentado a 65 °C durante 30 minutos, valiéndonos en este caso, de la termoestabilidad de la enzima. El precipitado, formado por desnaturalización de un gran porcentaje de las proteínas no termófilas, fue eliminado por centrifugación y descartado. El sobrenadante, en el cual se suponía habría de estar la alfa-galactosidasa parcialmente purificada por el tratamiento térmico, fue recogido y sometido a posteriores ensayos para su caracterización bioquímica.

3.2.7.2. Purificación por adsorción a soportes MANAE-agarosa con distinto grado de activación

Para los ensayos de purificación por este método, se siguió un procedimiento recientemente desarrollado por Pessela y col. (2004a y 2004b). 10 ml de agarosa 4BCL conteniendo la cantidad deseada de grupos glioxil, se suspendieron en 90 ml de etilendiamina 2M pH 10,05 y se mantuvieron en agitación (agitador rotatorio por rulos) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se le añadieron 1 g de borohidruro de sodio sólido, y esta suspensión se dejó en agitación (agitador de palas) a temperatura ambiente durante 2 horas aproximadamente. Los soportes reducidos se filtraron (placas de filtración a presión) y se lavaron secuencialmente con

100 ml de tampón acetato sódico, pH 4, 100 ml de tampón borato sódico, pH 9 y finalmente con aproximadamente 1 L de agua destilada. La conversión total de los grupos glioxil en grupos amino permite tener una concentración de grupos amino correspondientes al número inicial de grupos glioxil presentes en la agarosa.

3.2.7.2.1. Adsorción de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre soportes MANAE-agarosa

10 ml de una suspensión enzimática (0,5 mg de proteína/mL, disuelta en tampón fosfato sódico 5 mM y pH 7) fueron ofrecidos a 1g de soporte amino-agarosa con diferente grado de activación (1; 2,5; 5; 20 y 40 μ moles de grupos amino por gramo de soporte (Pessela y col., 2004 A y B). Durante el proceso de adsorción, a intervalos de tiempo definidos, alícuotas del sobrenadante fueron retiradas de la mezcla en agitación continua a 25 °C y posteriormente medida su actividad enzimática residual, de acuerdo a procedimientos comentados en el apartado 2.7.2. Cuando se comprobó la adsorción total de la enzima al soporte (desaparición total de actividad enzimática en el sobrenadante), el soporte se filtró y se lavó abundantemente con agua destilada. Este procedimiento, fue aplicado de manera similar, en todos y cada uno de los soportes MANAE-agarosa.

3.2.7.3.- Desorción de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 previamente adsorbida sobre soporte MANAE-agarosa

Para la desorción de la enzima previamente adsorbida a los diferentes soportes amino, los soportes fueron incubados con un gradiente creciente de NaCl, y la enzima desorbida en cada caso, fue medida de acuerdo a los procedimientos anteriormente descritos, y paralelamente fue determinada la concentración total de proteínas tras su purificación. Finalmente se analizaron por SDS-PAGE el grado de pureza alcanzado en cada caso. Así, a 1 gramo del soporte con la enzima adsorbida fue resuspendido en 5 ml de tampón fosfato sódico 5 mM y pH 7. Entonces, diferentes concentraciones de NaCl se fueron añadiendo, tras la cual, se deja el sistema en agitación (agitador rotatorio por rulos), por lo menos durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, la actividad alfa-galactosidasa fue medida espectrofotométricamente tal como se expuso anteriormente o, en su caso, la cuantificación de la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se cuantificó la

actividad enzimática y la concentración de proteínas, tanto en el sobrenadante como en la suspensión, para evaluar el grado de desorción de la enzima del soporte. Paralelamente a este proceso, una muestra con la enzima soluble en las mismas condiciones, fue sometida al mismo proceso, con intención de estudiar el efecto que pudiera tener la sal en la actividad de la enzima.

3.2.8. Purificación de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 por adsorción a diferentes soportes sepabeads previamente activados con grupos IDA

Diferentes soportes comerciales tipo sepabeads, activados con ácido iminodiacético (IDA), fueron usados (soportes: sepabeads FP-IDA, FP-IDA3 y EB-IDA) generosamente donados por la casa Resindion S.R.L (Milán, Italia). 2 g de cada uno de los soportes con grupos IDA, se les hizo reaccionar con 10 ml de soluciones de CuSO_4 (II) penta-hidratado y con solución de NiSO_4 (II) hexa-hidratado, adquiridos de Fluka (Buchs, Switzerland). Durante el proceso de adsorción fueron usadas diferentes concentraciones de imidazol.

3.2.8.1. Preparación de los diferentes soportes sepabeads-IDA- Cu^{2+} y sepabeads- Ni^{2+} - Quelato

2 g de los diferentes soportes comerciales sepabeads-IDA fueron incubados en soluciones conteniendo 5 mg/ml de CuSO_4 (II) y NiSO_4 (II). Estas suspensiones fueron mantenidas en agitación (Movil-Rod, J.P. Selecta, S.A., Barcelona) a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas, tras las cuales, los soportes fueron exhaustivamente lavados con agua destilada para eliminar posibles restos de sales de metales que no hubiesen reaccionado con los soportes.

3.2.8.2. Caracterización Físico-Química de los soportes sepabeads-IDA- Me^+

3.2.8.2.1. Determinación de la concentración de iones metálicos

La concentración de iones metálicos (de Cobre y Níquel), en los soportes sepabeads quelato fue determinada por espectroscopia de emisión atómica en un equipo Perkin-Elmer 3300 DV /optima. Los soportes fueron filtrados en placas (POBEL TANGANICA) a presión y posteriormente secados en un horno (WTC blinder, Tuttlinger, Germany) a 110 °C durante 24 horas. Posteriormente, a 100 mg de cada soporte (sepabeads-IDA-metal-epóxido) se les añadió 2 ml de ácido nítrico, 1 ml de HCl, y finalmente 0,5 ml de H_2O_2 . La mezcla fue llevada en un reactor microondas PTFE MDS-

2000 (CEM) durante 55 minutos, escalando la potencia desde 0 hasta 500 W. Finalmente, las muestras fueron disueltas con agua destilada hasta un volumen final de 10 ml. La cantidad de iones metálicos fue medida entonces a 324,6 nm (Shimadzu UV-vis 1240, Japón).

3.2.8.2.2. Determinación del tamaño de los poros y la distribución de los mismos en el soporte sepabeads-EB-Me⁺-quelato

Para la determinación de la capacidad de carga y del tamaño de los poros de los soportes sepabeads-EB-IDA quelato, se usaron técnicas de isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno en un equipo TRISTAR 3000 de Micrometrics a 77 K. De este modo, 0,2 g del soporte fue desgasificado a 30 °C durante 72 horas. Tanto el diámetro, como la superficie de distribución del poro, fue determinada de acuerdo el método BJH descrito por Barret (1951).

3.2.8.2.3. Adsorción de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre soportes sepabeads-IDA-metal

10 ml de una solución de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre-expresada en *E.coli* (MC 2508), a una concentración de 5mg/ml (libre de DNA), en tampón fosfato sódico a pH 7 y 100 mM de NaCl, fue ofrecido 1 g a cada uno de los diferentes soportes sepabeads-IDA-metal (EB; FP y IDA3). Simultáneamente, durante la adsorción, diferentes concentraciones de imidazol se les fue añadiendo a cada uno de los soportes. Para prevenir problemas de difusión, solamente fueron preparados con aproximadamente 10 unidades de enzima por g de soporte. Durante la adsorción, alícuotas de la solución enzimática, fueron retiradas a diferentes tiempos, tanto de la suspensión como de los sobrenadantes, para medir tanto la actividad enzimática como la concentración de proteínas.

3.2.8.2.4. Desorción de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 adsorbida a soportes sepabeads-IDA-Metal

1 g de cada uno de los soportes con la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 adsorbida, fue suspendido en 5 ml de tampón fosfato sódico 5 mM pH 7 y 25 °C. Progresivamente, concentraciones de imidazol fueron añadidas a los soportes. Los sobrenadantes se retiraron a intervalos de tiempo de 30 minutos, y se analizó, tanto la actividad enzimática como la concentración

de proteínas.

Paralelamente, a una solución de referencia con la enzima soluble, se le fue dando el mismo tratamiento, con la finalidad de detectar posibles efectos que podría tener el imidazol en la actividad enzimática.

3.2.9.- Análisis por SDS-PAGE

Las electroforesis de las distintas muestras se realizaron en condiciones desnaturalizantes según los métodos descritos por Laemmli (1970). Las preparaciones enzimáticas así como los diferentes inmovilizados sobre diferentes soportes, fueron hervidos durante 5 minutos en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8; SDS al 2%, beta-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol al 0,005%). Este tratamiento no es capaz de romper los enlaces aminos secundarios formados entre la proteína y el soporte (Blanco y col. 1989), pero es capaz de liberar cualquier subunidad enzimática que no haya sido covalentemente unida al soporte (Fernandez-Lafuente y col, 1999). Las soluciones enzimáticas así tratadas y los sobrenadantes de las suspensiones fueron analizadas por SDS-PAGE y teñidos usando azul brillante de Coomassie R250 (Swank y Munkers, 1971) ó tinción de plata (Marchall., 1984).

3.2.10. Análisis por filtración en gel

Los experimentos de filtración en gel, se llevaron a cabo usando una columna empaquetada con geles de agarosa 4BCL, con un volumen de 100 ml. El tampón de elución usado fue fosfato de sodio 50 mM y pH 7. Todas las separaciones se llevaron a cabo a 25 °C, con un flujo de 0,5 ml / min, usando una bomba isocrática (Pharmacia LKB Optical Unit UV-1, Suecia) y un detector (Fraction collector, RediFrac™, Suecia) a 280 nm. La columna fue equilibrada haciéndola pasar un volumen de 500 ml del tampón fosfato sódico, 50 mM y pH 7. Las muestras eluidas fueron recogidas en alícuotas de 1ml y posteriormente se les determinó tanto la concentración de proteínas como la actividad enzimática.

Para calibrar la columna, fueron eluidas fracciones de proteínas de peso molecular conocido: apoferritina de caballo de 443 kDa (55-60 ml); catalasa bovina de 240 kDa (68-75 ml); beta-amilasa de 200 kDa (68-75 ml); alcohol dehidrogenasa 150 kDa (68-75 ml); PGA de 90 kDa (68-75 ml); BSA de 67 kDa (80 ml); anhidrasa carbónica de 29 kDa (85-90 ml) y lisozima de 14 kDa (85-90 ml).

3.2.11. Inmovilización de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp.T2 sobre diferentes soportes

3.2.11.1. Preparación de soportes para la inmovilización reversible

3.2.11.1.1. Soporte Glioxil-agarosa

La preparación de estos soportes se lleva a cabo activando la resina de agarosa con glicidol y posterior oxidación con periodato sódico (Guisan, 1988 y 1997 A). Los soportes con bajo grado de activación se lograron por oxidación directa de la agarosa con cantidades estequiométricas deseadas de periodato sódico, dado que la agarosa obtenida comercialmente posee 15 μ moles de dioles (OH) oxidables por gramo de resina. Del gel glioxil-agarosa con un grado de activación 75 mmol de grupos gliceril/ml de soporte, se prepara añadiendo a 150 ml de gel agarosa 4BCL suspendida en 30 ml de agua y 50 ml de NaOH 1.7N conteniendo 28.5 mg/ml de borohidruro sódico. Sobre esta disolución se añade muy lentamente 2M de glicidol y, controlando que la temperatura no suba de 25 °C, la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 18 horas. Después se lavan los geles con abundante agua destilada. Seguidamente se lleva a cabo la oxidación de los geles gliceril con peryodato sódico (112 mL 0.1M) y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Para finalizar, se lava con abundante agua destilada y se almacena a 4 °C para su posterior uso.

3.2.11.1.2 Soportes MANAE-agarosa recubiertos con Dextrano-sulfato de distinto peso molecular

En un volumen de 10 mL de tampón fosfato 25 mM, a pH 7, se disolvieron 2g de dextrano-sulfato de diferentes pesos moleculares (5, 10 y 500 KDa). Una vez conseguida su total disolución, se añadieron 5 g de MANAE-agarosa (dilución: $\frac{1}{2}$) y se dejó bajo agitación (agitador rotatorio por rulos) durante 16 horas, aproximadamente. Finalizando ese tiempo, se añadió 1 litro de agua destilada – para disminuir la viscosidad del polímero – dejándolo 1 hora bajo continua agitación (agitador rotatorio por rulos). El proceso se repite 3 ó 4 veces y, finalmente, se lava con abundante agua destilada (Fuente y col., 2004).

3.2.11.1.3. Soporte agarosa polietilenimina

Los soportes agarosa recubiertos con polietilenimina, se prepararon a partir de geles glioxil agarosa 4BCL como está descrito (Mateo y col, 2000). Para ello se prepara una disolución de PEI al 10% en bicarbonato 0.1M pH 11.0. A 9 ml de la solución de PEI se le adiciona 1 ml de gel glioxil-agarosa y se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación se reduce con 10 mg/ml de borohidruro sódico a 25 °C durante 2 horas. Por último se lava el gel con abundante agua destilada.

Con el gel glioxil-PEI ya preparado se procede a la inmovilización de la enzima. El curso de inmovilización se sigue como en el caso de otros derivados.

3.2.11.2. Preparación de soportes para la inmovilización irreversible

3.2.11.2.1 Protocolos generales de inmovilización

En todos los casos, los cursos de inmovilización se controlaron por la medida de la actividad del sobrenadante a diferentes tiempos.

Todas las suspensiones de referencia se prepararon teniendo exactamente la misma concentración de la enzima, condiciones del medio, (pH, temperatura, fuerza iónica) y añadiendo la cantidad correspondiente de soporte inerte en lugar del soporte activado. La actividad enzimática en el sobrenadante de estas soluciones de referencia, en todos los casos se mantuvieron, el descenso de la actividad en el sobrenadante (de la suspensión de inmovilización) fue equivalente a la cantidad de enzima inmovilizada sobre el soporte.

3.2.11.2.2 Soporte Glutaraldehído

Los soportes glutaraldehído se prepararon activando los grupos amino primario de los soportes MANAE-agarosa.

Se resuspendieron 10 g del soporte MANAE-Agarosa en 20 mL de una solución de glutaraldehído al 15% (v/v) en tampón fosfato sódico 200 mM pH 7, dejando la mezcla en reacción a 25 °C durante 16 horas. Posteriormente el soporte fue filtrado (placas de presión al vacío) y lavado exhaustivamente con fosfato sódico 25 mM pH 7 y finalmente con abundante agua destilada.

3.2.11.2.3. Inmovilización reversible por adsorción a intercambiadores iónicos

Como procedimiento general, a 1 g de soporte (cefarosa-DEAE; PEI-agarosa; CM-agarosa y Dextrano sulfato-agarosa), se le añadió una solución enzimática con aproximadamente 10 U/g de soporte, en tampón fosfato sódico 5 mM y a pH 5 y 7 a 25 °C con agitación constante (agitador de rulos). Durante el proceso de adsorción, se tomaron muestras del sobrenadante y de la suspensión y se determinó la actividad enzimática y/o la concentración de proteínas.

3.2.11.3. Inmovilización irreversible de la enzima por unión covalente

3.2.11.3.1. Inmovilización sobre agarosa activada con BrCN

A 1g del soporte comercial previamente activado con HCl a pH 2, se le añadió 10 ml de una solución enzimática de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en tampón fosfato sódico 5 mM y pH 7, dejándola en agitación durante un tiempo mínimo de 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se cuantificó la actividad enzimática y la concentración de proteínas. Al terminar el proceso, los derivados se lavaron (en placa de vidrio a presión al vacío (placa Pobel, España), inicialmente con tampón carbonato sódico 0,1M y posteriormente se bloquearon durante aproximadamente 3 horas los grupos BrCN remanentes con 4 ml/g de derivado, con una solución 3M de glicina pH 8,5. Finalmente, los derivados se lavaron exhaustivamente con agua destilada.

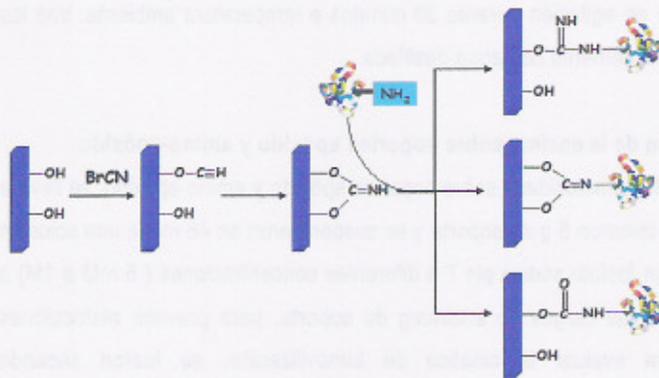


Figura 6. Esquema general propuesto para la inmovilización de proteínas sobre soportes activados con bromuro de cianógeno

3.2.11.3.2. Inmovilización sobre soportes activados con glutaraldehído

A 2 g de soporte se le añadió 20 ml de una solución enzimática con aproximadamente 10 U/g de soporte en tampón fosfato sódico 5 mM pH 7 (aproximadamente 5 mg /ml), dejándose en agitación (agitador de rulos) a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo de 30 minutos, se fueron extrayendo alícuotas de sobrenadante a las que se cuantificó actividad enzimática y/o concentración de proteínas. Una vez inmovilizada toda la proteína, el derivado se disolvió en tampón bicarbonato sódico 0,1 M pH 10 y se añadió NaBH₄ hasta una concentración final de 1 mg/ml. Esta suspensión se dejó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales, el derivado se lavó abundantemente con agua destilada.

3.2.11.3.3. Inmovilización sobre soportes Glioxil-agarosa

El proceso se llevó a cabo según procedimientos desarrollados con anterioridad (Guisán y col., 1987; 1988). A 2 g de soporte se le añadieron 20 ml de una solución enzimática aproximadamente 10 U/g de soporte en tampón bicarbonato sódico 100 mM pH 10,5 (aproximadamente 5 mg /ml), dejándose en agitación (en coulter) a temperatura ambiente. A diferentes intervalos de tiempo, se fueron extrayendo alícuotas de sobrenadante a las que se cuantificó actividad enzimática y/o concentración de proteínas. Una vez inmovilizada toda la proteína, se llevó a cabo la reducción de los enlaces formados entre los grupos glioxil y los grupos amino (NH₂ de las lisinas) de la proteína inmovilizada, mediante adición de 1 mg/ml de borohidruro sódico. Esta suspensión se dejó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales, el derivado se lavó abundantemente con agua destilada.

3.2.11.3.4. Inmovilización de la enzima sobre soportes epóxido y amino-epóxido

La inmovilización de la alfa-galactosidasa sobre soportes epóxido y amino-epóxido, se llevó a cabo de la manera siguiente. Se tomaron 5 g de soporte y se suspendieron en 45 ml de una solución enzimática preparada con tampón fosfato sódico pH 7 a diferentes concentraciones (5 mM a 1M) a 25 °C, usándose normalmente bajas cargas de enzima/g de soporte, para prevenir restricciones difusionales del sustrato. Para evaluar la cinética de inmovilización, se fueron sacando periódicamente muestras de sobrenadante y de la suspensión para determina actividad enzimática y/o concentración proteica.

En algunos casos, como en los soportes MANAE-agarosa y PEI-agarosa, se incubó la enzima inmovilizada bajo condiciones en la cuales las moléculas de proteínas adsorbidas físicamente se podrían desorber, para estudiar el grado de unión covalente de la enzima sobre el soporte. Terminado el proceso de inmovilización, los derivados se lavaron, normalmente, usando el tampón que se había usado durante el proceso de adsorción, con la intención de eliminar restos de proteínas que no se habían unido covalentemente al soporte. Finalmente, se bloquearon completamente los grupos epóxido remanentes durante aproximadamente 16 horas, añadiéndoles una solución de glicina al 3M y pH 8,5 a temperatura ambiente en una relación de 1/5 (g de derivad/g de glicina).

3.2.11.4. Entrecruzamiento con glutaraldehído de la enzima adsorbida

Una vez obtenido el derivado sobre MANAE-agarosa, como se ha descrito anteriormente, se incubó el derivado en agitación (agitador de rulos) en una solución 0,5% (v/v) de glutaraldehído en 25 mM de fosfato sódico a pH 7 y 25 °C durante 1 hora, bajo agitación suave. Este tratamiento permitió modificar totalmente los grupos amino primarios de la enzima y el soporte con una única molécula de glutaraldehído (Monsan, 1978, Fernández-Lafuente y col, 1995). Posteriormente, se lavaron (placas de presión al vacío) los derivados con 25 M de fosfato sódico a pH 7 para eliminar el exceso de glutaraldehído. Después, se incubaron (agitador de rulos) por un periodo adicional de 20 horas a 25 °C para lograr un entrecruzamiento más intenso entre la enzima y el soporte.

3.2.11.5. Reducción de derivados con borohidruro sódico

La reducción con NaBH_4 permite transformar el enlace base de Schiff en amina secundaria, covalente. Pero además con este tratamiento pueden reducirse los grupos aldehído que hayan quedado sin reaccionar con la enzima a grupos hidroxilo inertes, evitándose la posibilidad de producción de nuevas interacciones y permitiendo controlar el final del proceso (Blanco, 1988).

Las condiciones óptimas establecidas por Blanco (1988) fueron de 1 mg NaBH_4 /ml de tampón fosfato 25 mM pH 7, en un derivado preparado 1:10 (1 ml gel/10 ml de suspensión total), a la temperatura de 25 °C, con un tiempo de reducción de 30 minutos.

3.2.11.6 Modificación de enzimas con dextrano-aldehído

3.2.11.6.1. Preparación de dextrano-aldehído

Se obtiene por oxidación, con periodato sódico, de los grupos dioles vecinales presentes en las moléculas de glucosa que forman la molécula de dextrano-aldehído, generando grupos aldehído. En la oxidación total de los grupos dioles se consumen 2 moles de periodato por cada mol de glucosa (que consume dos moléculas y pierde uno de los carbonos vecinales), siendo una reacción totalmente estequiométrica y rápida. La disolución oxidada se dializa exhaustivamente, con agua destilada en una relación aproximadamente 1/100 y realizando entre 5 y 7 cambios, para eliminar posibles moléculas aldehídicas de bajo peso molecular. Disminuyendo la cantidad de periodato sódico, es posible realizar oxidaciones parciales del dextrano (Leonard y col, 1975; Drobchenko y col., 1996; Penzol y col, 1998; Guisán y col., 1997; Schachth y col, 1987; Fuentes y col., 2004).

A modo de ejemplo, describimos la preparación de un dextrano-aldehído con una oxidación del 20% de sus moléculas de glucosa. El dextrano aldehído se obtiene por oxidación de 50 mL de una solución de 33 mg/mL de dextrans (de diferentes pesos moleculares) con 0.872 g de periodato sódico. La oxidación se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, la solución resultante se dializó frente a agua destilada, en una relación de volúmenes de 1/100, con 3 cambios sucesivos.

3.2.11.6.2 Modificación de enzimas con dextrano-aldehído

Se utilizaron dextrano-aldehídos de diferentes grados de oxidación (20 y 100%). Así, 1 g de derivado fue incubado con 5 mL de solución de dextrano aldehído (15 mg/mL) en tampón fosfato de potasio 0,1 M a pH 7,0 y 4°C. A diferentes tiempos se retiraron muestras y se midió la actividad remanente de la suspensión. El proceso de entrecruzamiento se terminó añadiendo una concentración final de 1 mg/mL de NaBH₄ a la suspensión previamente ajustada a pH 10. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos y el derivado fue lavado con tampón fosfato de sodio antes de su almacenamiento a 4°C, para posterior utilización.

3.2.11.7. Análisis de la estabilización de las subunidades de la enzima inmovilizada

Muestras de los diferentes derivados de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 se hirvieron en presencia de 1% (p/v) SDS y 5% (v/v) de mercaptoetanol para desorber las sub-unidades proteicas que no se habían unido covalentemente al soporte. Los sobrenadantes de las

suspensiones hervidas en esas condiciones se analizaron en SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, los cuales fueron teñidos usando azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971).

3.2.11.7. Purificación, inmovilización y estabilización de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, en un solo paso

El proceso de purificación, inmovilización y estabilización, se lleva a cabo en soportes comerciales Sepabeads-IDA activadas con metales de transición. Posteriormente, se analizaron en SDS-PAGE para estudiar el grado de purificación obtenido y finalmente los derivados fueron incubados a 70 °C para analizar el grado de estabilización obtenido.

3.2.12. Estudio de la fuerza de unión de la enzima a soportes iónicos

Los distintos derivados enzimáticos de la alfa-galactosidasa sobre intercambiadores iónicos, se incubaron en concentraciones crecientes de NaCl a 25 °C, en tampón fosfato sódico 5 mM pH 7. Después de 30 minutos (periodos más largos de incubación no revelaron cambios en los resultados), se determinó la actividad alfa-galactosidasa en el sobrenadante

3.2.13. Estudio de estabilidad de los derivados obtenidos

La estabilidad se expresa como la vida media de cada derivado enzimático en las condiciones de incubación. El factor de estabilización se calcula como la razón entre las vidas medias del derivado en estudio y la vida media de la enzima soluble.

3.2.13.1. Estabilidad térmica de los derivados

Los diferentes derivados enzimáticos de la enzima se incubaron a diferentes temperaturas en condiciones de pH, fuerza iónica y concentración que se detallan en los pies de figura en cada caso. Periódicamente, se tomaron muestras de las suspensiones y se midió la actividad enzimática residual.

3.2.14. Reacciones de interés con las alfa-galactosidasas: hidrólisis de melibiosa y de rafinosa

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en matraces de 100 ml de capacidad Erlenmeyer (Schott, Alemania) revestidos de una camisa exterior por donde el agua podía recircular a la temperatura de 60 °C. El pNPG es el sustrato sintético de las alfa-galactosidasas que, al ser hidrolizado, rinde una molécula de galactosa y otra de pNP (para-nitrofenol). El pNP da coloración amarilla, siendo la absorbancia a 405-420 nm proporcional a la concentración de dicho producto.

Se incubaron 10 ml de (solución de rafinosa y/o melibiosa, según el caso) con 0,3 g de derivado (aproximadamente 3 unidades), durante el tiempo necesario para la hidrólisis total del sustrato en estudio, midiéndose el grado de hidrólisis en intervalos cortos de tiempo de aproximadamente 10 minutos.

La reacción se midió por HPLC (Thermus-Spectra System), en este caso y se detuvo añadiendo a 100 µl de muestra, 100 µl de BaSO₄ 0,1 M y 100 µl de ZnCl₂ 0,1 M, (para eliminar enzima del medio de reacción, con lo cual se protege la columna del HPLC), seguida de centrifugación en microcentrifuga (Millifuge, Hitachi Kaki CO., Ltd.) inyección al espectro, de 20 µl del sobrenadante de la dilución. Estas muestras se analizaron por HPLC utilizando un detector de dispersión de luz (Light Scattering-Sedex 75) a 45°C y 2,5 Bar de nitrógeno) con una columna Supelcosil-Ca (Sigma) 4,6 mm x 25 cm, termostaticada a 80°C. La fase móvil utilizada fue agua, con un flujo de 0,5 mL/min.

La cuantificación de los azúcares medidos por HPLC, se llevó a cabo determinando el área bajo el pico. Para conocer la relación entre el área del pico, la concentración del analito y los tiempos de retención de cada analito se realizaron calibrados tanto para el reactivo como para los productos, usándose sacarosa, melibiosa, glucosa y rafinosa en concentraciones muy bajas (0,1-1 mg/ml) como patrón interno.

Para la recogida de datos, el mismo equipo de HPLC dispone de un ordenador provisto de un software Cromo Queso, que recoge la señal que va midiendo el detector integrando los picos del cromatograma. Con el área bajo el pico se calcula, mediante uso de calibrados, de los respectivos azúcares, la concentración de cada analito.

3.2.14.1. Reacciones de transglicosilación. Hidrólisis de galacto-oligosacáridos (GOS)

Se prepararon los GOS con los derivados MANAE-Glutaraldehído, MANAE-agarosa, Agarosa-BrCN, y con la enzima soluble, para efectos comparativos en cuanto a rendimientos de transglicosilación. 1 g de derivado (aproximadamente 3 U en 10 mL de una solución al 35 % de melibiosa y/o rafinosa) en tampón fosfato de sodio 5 mM a pH 5 y pH 7 y se tomaron muestras de sobrenadante a diferentes tiempos. Estas muestras se analizaron por HPLC utilizando un detector de dispersión de luz (Light Scattering-Sedex 75, 45°C, 2,5 Bar de nitrógeno) con una columna Supelcosil-Ca, 4,6 mm x 25 cm., termostatizada a 80°C. La fase móvil utilizada fue agua con un flujo de 0,5 mL/min.

3.2.14.2. Estudios cinéticos

3.2.14.2.1. Cálculo de las constantes cinéticas

Los ensayos para determinar las constantes cinéticas se llevaron a cabo usando como sustrato pNPG (13,3 mM) en tampón fosfato sódico 5 mM a pH 7, usando como inhibidores sacarosa, galactosa y glucosa, como productos naturales de las reacciones de hidrólisis, en concentraciones desde 1% hasta aproximadamente 35%. Las reacciones tuvieron lugar a 60 °C en baños de agua termostatizados (Tectron Bio, J.P.Selecta s.a. España). Se estudiaron los derivados MANAE-Glutaraldehído, MANAE-Agarosa, Agarosa-BrCN, muy poco cargados (aproximadamente con 2 U/ml, para prevenir posibles inconvenientes de difusión). Las reacciones fueron seguidas espectrofotométricamente (Shimatzu UV-VIS 1240, Japón) a 405 nm y 25 °C.

Para calcular las constantes cinéticas (K_m , V_{max}), se utilizó el procedimiento de Lineaweaver-Burk (1934) y para calcular las constantes de inhibición el método descrito por Caballe y Combs (1995). Los modelos cinéticos se ajustaron según Ladero (1999).

4. RESULTADOS

4.1. Expresión del gen de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en *Escherichia coli* MC2508.

La secuencia completa del inserto pOS105 presenta una pauta abierta de lectura de 1425 pb (incluyendo un triplete de terminación) que codifica para un polipéptido de 474 aminoácidos con un peso molecular deducido de 53,515 g.mol⁻¹. (Genbank, número de acceso AJ012327). Esta pauta abierta coincide exactamente con otra depositada por otro grupo de investigación (AB018548), (Ishiguro y col., 2001), y que confirma la existencia de un operón que está involucrado en el transporte del metabolismo de azúcares en *Thermus* sp. cepa T2 (Koyama y col., 1990). El gen fue obtenido del plásmido pOS105 por amplificación con PCR usando como cebadores los oligonucleótidos 5'-AGT y NEBL 1211, clonado en un vector de expresión, y transformado en *E. coli* M2508, como se detalla en la Figura 1.

El cebador 5'-AGT introduce un nuevo sitio de restricción *Xba*I en la posición 5' terminal en la secuencia del *aglA*. El uso de este cebador genera una mutación. El uso del primer triplete 5'-AGT genera una mutación: mientras que la alfa-galactosidasa salvaje empieza en su extremo N terminal con la secuencia MRLVL, la proteína codificada en el fragmento amplificado empieza con la secuencia MSTVL (los dos residuos modificados están subrayados). El cebador NEBL 1211 mantiene un sitio *Eco*RI presente en pOS105 en el fragmento amplificado por PCR que contiene *aglA*. El sitio de restricción *Eco*RI está localizado 35 pb por debajo de la pauta abierta de lectura.

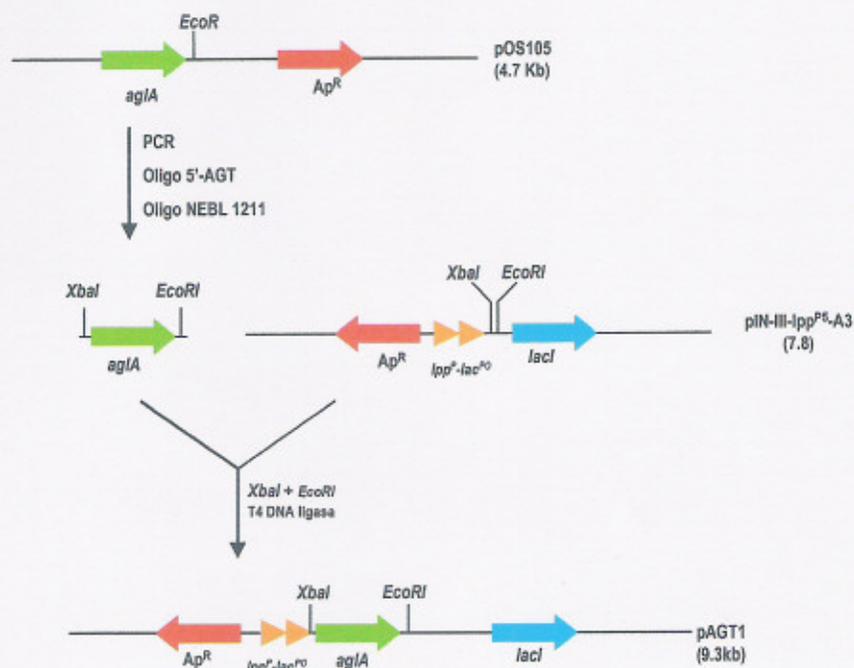


Figura 7.- Construcción del plásmido pAGT1. El gen que codifica la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. cepa T2 está señalado como *agIA*, el gen de resistencia a ampicilina (*Ap^R*) y el gen represor del operón de lactosa (*lac I*) están representados por diferentes flechas. La posición de los promotores *lpp^{P5}* y *lac^{PO}* pertenecientes al vector de expresión *E. coli* denominado pIN-III-*lpp^{P5}*-A3 están indicados por los triángulos. Solamente los sitios de restricción relevantes y únicos para la clonación son destacados. El esquema no fue elaborado a escala.

El producto de PCR fue purificado, digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRI* y ligadas al vector de expresión pIN-III-*lpp^{P5}*-A3 de *E. coli*, que había sido previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, para generar el plásmido pAGT1, como también se muestra en la Figura 7. La actividad alfa-galactosidasa se midió en células enteras, permeabilizándolas con cloroformo y dodecil sulfato sódico de modo similar a como está descrito para la beta-galactosidasa (Pessela y col., 2003), pero empleando pNPG como sustrato. El clon de *E. coli* M2508 (pAGT1), depositado en la CECT con el n° de registro 5152 y cuyo uso ha sido objeto de patente en España (ES 2 172 380, 2003). produce por término medio 322 unidades por L de cultivo, mientras que los controles equivalentes con pOS105 en las mismas condiciones producen 84 unidades/L. Los clones

de control no-productores, como M2508(pIN-III-*lppP* 5-A3) y M2508(pUC19) producen ± 2 unidades/L, lo que da idea de la precisión y/o el posible valor de fondo del ensayo.

En análisis por SDS-PAGE (12%) de CECT5152, los extractos crudos mostraron una nueva proteína con más o menos 53 kDa, que corresponde con el tamaño de la alfa-galactosidasa esperada, como se puede apreciar en la Figura 8.

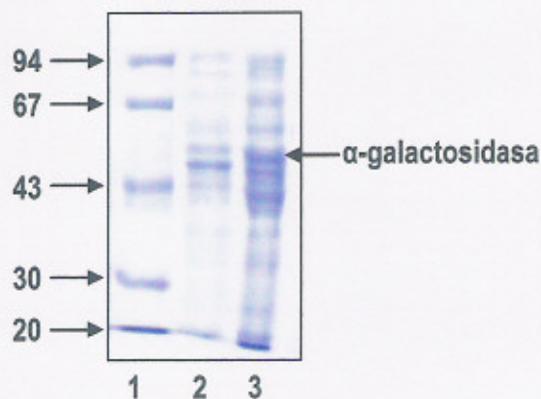


Figura 8.- Análisis por SDS-PAGE (12%) de la producción de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. cepa T2. Calles: 1. Patrón de peso molecular. 2. Extracto celular de *E. coli* MC 2508. 3. Extracto celular de *E. coli* MC 2508 (conteniendo pAGT1).

4.2. Producción y extracción de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

Seguidamente se realizó la producción de extractos enriquecidos en alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2. Las células recombinantes de *E. coli* MC 2508 se cultivaron en medio LB, con 150 μ g/ml de ampicilina sódica, a una temperatura de 37 °C, durante un periodo de 12 horas en un agitador incubador (Unitron, Infors, Suiza) a 200 rpm. Las mismas células, fueron recogidas por centrifugación y se rompieron mediante Prensa French® (Spectronics, EEUU). El extracto tratado se centrifugó, obteniéndose un sobrenadante claro y enriquecido en actividad alfa-galactosidasa. Todos los pasos llevados a cabo en los procesos de producción y extracción de la proteína, están resumidos en el diagrama que se presenta a continuación (Figura 9).

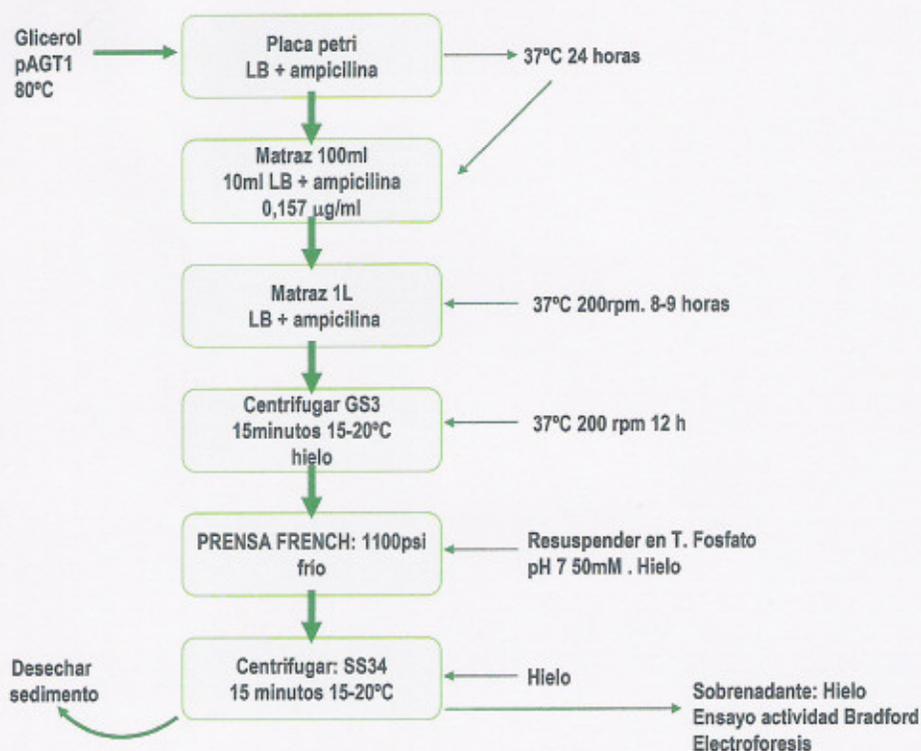


Figura 9.- Representación general del proceso de fermentación y extracción de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2*

4.3. Caracterización bioquímica de la enzima

4.3.1. Influencia de la temperatura en la actividad de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2*

La actividad enzimática fue valorada usando *pNPG* como sustrato en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (3.2.4.1.) y se ha obtenido un perfil actividad / temperatura como se observa en la figura 10. La máxima actividad enzimática tuvo lugar a 65 °C y pH 6.5, como aparece en la figura 11.

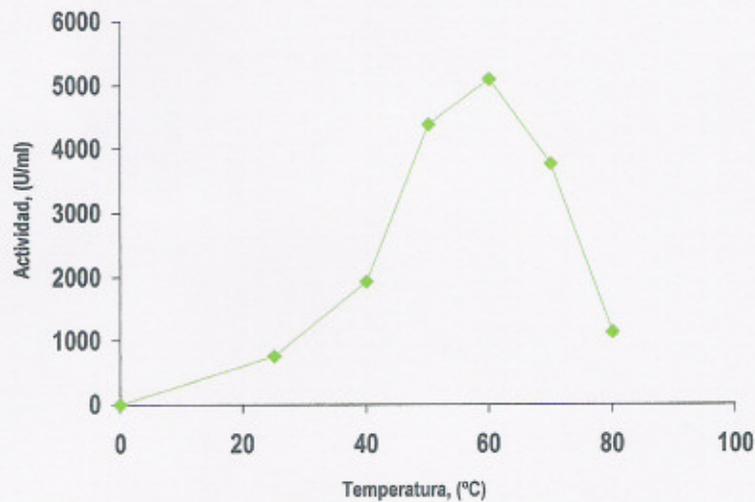


Figura 10.- Gráfica de actividad a diferentes temperaturas de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

4.3.2. Influencia del pH en la actividad alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

En la Figura 11 podemos observar que el valor óptimo de pH fue 6,5 y el más bajo valor estudiado fue pH 4,0 (pH más bajo produjo un coeficiente de extinción muy bajo y un error en la determinación de actividad demasiado grande), manteniendo altos valores de actividad entre pH 6,5 y pH 8,0, mientras que hay una brusca caída en la actividad a valores de pH más básicos.

Este valor encontrado del pH óptimo, es similar a los encontrados para otras alfa-galactosidasas termostables como las de *Thermus brockianus* IT1360 con valores de entre pH 5,5 y 6,5 (Fridjonsson y col., 1999) y *Thermus maritima* con valores entre pH 5,0 y 5,5 (Liljeström y Liljeström, 1987).

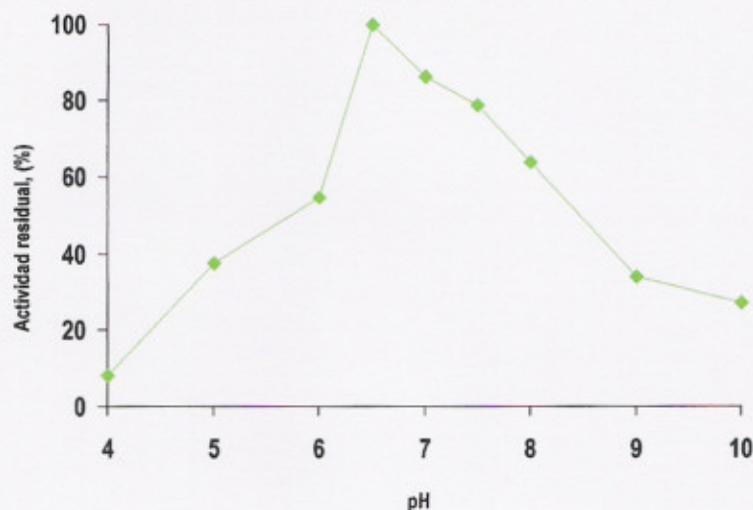


Figura 11.- Gráfica de actividad a diferentes pH de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, estudiada a temperatura ambiente.

4.3.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática

Como se pudo ver en la Figura 11, la enzima presenta su valor óptimo de actividad entorno a pH 6.5-7.0, siendo el valor de estabilidad más baja tanto para pH alcalinos y pH's ácidos. En la Figura 12 se observa que la enzima queda completamente activa durante 24 h a 50 °C y 60 °C y pH 7, mientras que sufre una caída brusca de la actividad a temperaturas entre 70 y 80°C. Los tiempos medios de inactivación a 70 °C y 80 °C fueron de 150 y 15 minutos, respectivamente. Estos valores de termoestabilidad son igualmente similares a los obtenidos para la poli-His-alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 a 60 °C y pH 7,0 (Ishiguro y col. 2001) y *Bacillus stearothermophilus* ($t_{1/2}$ = 10 minutos a 80 °C) (Fridjonsson y col., 1999B), y algo superiores a *Thermococcus* sp. AN1 ($t_{1/2}$ = 40 min a 98°C) (Piller y col., 1996).

Como esta enzima es hexámerica, era de esperar que existiera cierta dependencia de la estabilidad con el grado de dilución de la misma (Poltorak y col., 1998). Sin embargo, este efecto no fue observado a pH 5.0. (Figura 13A). A pH 7,0 algunas diferencias pudieron ser apreciadas (Figura

13B), mientras que a pH 9,0 se observó claramente dicho efecto (Figura 13C). Este resultado lleva a la conclusión de que, la unión entre las sub-unidades de la enzima es más fuerte a valores de pH más bajos.

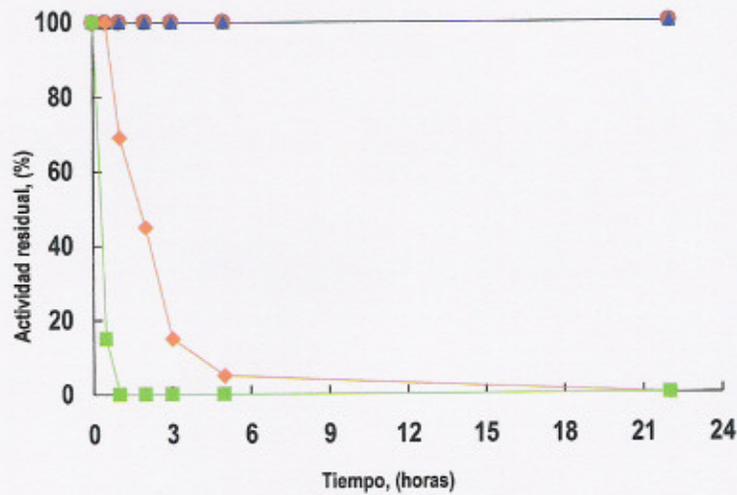


Figura 12.- Estabilidad térmica alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 a diferentes temperaturas. (●) alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 incubada a 50 °C. (▲) alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 incubada a 60 °C. (◆) alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 incubada a 70 °C. (■) alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 incubada a 80 °C.

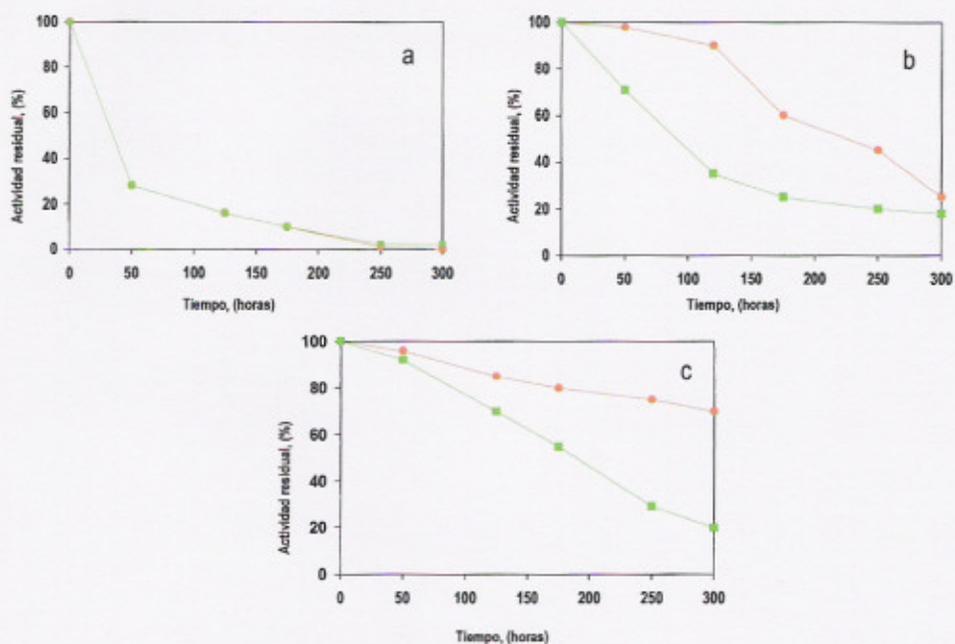


Figura 13.- Efecto de la dilución en la estabilidad de la enzima a diferentes pHs. El ensayo se realizó a 65 °C, en tampón fosfato de sodio 50 mM. (■) Concentración de enzima = 0.64 mg/mL (●). Concentración de enzima 3,20 mg/mL. (a) Enzima soluble incubada a pH 5.0. (b) Enzima soluble incubada a pH 7.0. (c) Enzima soluble incubada a pH 9.0.

4.3.4. Especificidad de la enzima hacia diferentes sustratos

Para estudiar este efecto, a la enzima soluble se le hizo reaccionar con diferentes sustratos. La enzima reconoció variados y diferentes sustratos. El sustrato que registró mejor actividad alfa-galactosidasa fue el alfa-D-galactopiranosido, mientras que sobre su homólogo beta-D-galactopiranosido las actividades medidas fueron 20 veces menores.

Sustratos	Enzima 25°C	Derivado (MANAE-GLUT) 25°C
p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido	0,06	0,0687
p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido	0,003	0,01137
p-nitrofenil- α -D-maltósido	0,006	0,094
p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido	0,0048	0,0083
p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido	0	0
p-nitrofenil- α -D-xilopiranosido	0	0,0045
p-nitrofenil- α -D-mannopiranosido	0,0056	0,0107
p-nitrofenil- β -D-mannopiranosido	0,0042	0,0056

Tabla 1. Especificidad de alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2. Las reacciones fueron realizadas a pH 7,0 y 25 °C. La concentración de todos los sustratos fue de 4 mg/ml y se han disuelto en tampón fosfato de sodio 50 mM .

Como se puede observar en la tabla, la actividad de la enzima es muy superior en un solo sustrato comparado con los demás, no reconoció el sustrato beta derivado glucopiranosido. Sin embargo, se observó más de 10% de la actividad enzimática frente a derivados *p*-nitrofenil-alfa-D-maltósido, *p*-nitrofenil-alfa-D-xilopiranosido y *p*-nitrofenil-alfa-D-manopiranosido. Los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla 1. Estos resultados, sobre la especificidad de la enzima, están en concordancia con los encontrados en la bibliografía para otras alfa-galactosidasas de microorganismos termófilos. Por ejemplo, Ishiguru y col., (2001) no observaron hidrólisis con el sustrato *pNP-alfa* y *beta glucopiranosidos* y una hidrólisis mínima con el *pNP- α -D-xilopiranosido*, en el derivado MANAE-agarosa entrecruzado con glutaraldehído.

Cabe destacar que el estudio realizado con el derivado MANAE-glutaraldehído (en todos los casos), la actividad recuperada fue el doble que la actividad de la enzima en disolución a la misma temperatura.

4.4. Purificación de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2.

4.4.1. Purificación por métodos físicos: tratamiento térmico

El tratamiento por calor permitió aumentar la purificación de la enzima con un factor de 2,1, y obtener un rendimiento de recuperación de actividad cercano al 80%, como aparece descrito en la Tabla 2.

Muestra	Actividad (U/mL)	Conc. proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo de la α -galactosidasa	0,36	9,93	0,036	100	1,0
Extracto crudo de la α -galactosidasa purificada por precipitación térmica	0,29	3,8	0,076	80,6	2,1

Tabla 2. Efecto del tratamiento térmico en la purificación del extracto crudo de la enzima, incubada a 70°C y pH 7,0, durante 30 minutos.

Aunque podamos considerar un sistema de purificación sencillo, rápido y muy económico, los rendimientos que se obtienen no son lo suficientemente buenos atendiendo a que las exigencias de aplicabilidad de la enzima requieren niveles muy altos de pureza, fundamentalmente en procesos en que es clave evitar posibles reacciones colaterales de otras proteínas que puedan estar presentes en el extracto, como por ejemplo en reacciones en Tecnología de Alimentos. Además, se pudo comprobar (datos no recogidos en la presente memoria) que largos periodos de incubación del extracto proteico (más de 48 horas a 65 °C) mejoró muy poco el grado de pureza de la enzima, ocasionando en cambio cierta pérdida de actividad de la misma.

Sin embargo, como comentamos en la introducción de este trabajo, nuestro objetivo era valorar el efecto de este tratamiento físico por aplicación de calor moderado en las enzimas multiméricas y del hospedador mesófilo. Para analizar el perfil de las proteínas del extracto con y sin el respectivo tratamiento térmico, las muestras fueron analizadas por filtración en gel como aparece en la Figura 14. En la misma, podemos observar que las proteínas de mayor tamaño presentes en el

extracto crudo, fueron eliminadas por calor o quizás, disociadas su estructura multimérica (Anspach y col., 1999).

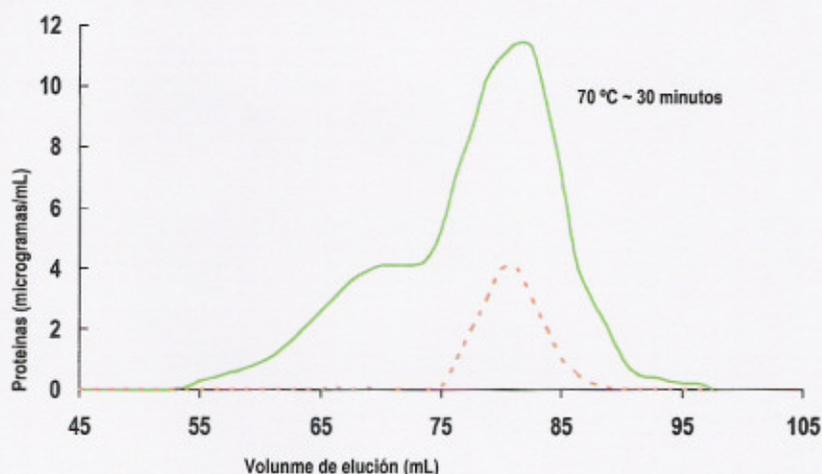


Figura 14.- Análisis por filtración en gel del extracto de *E. coli* MC 2508, sin calentar y calentado a 65°C durante 30 minutos y después centrifugado. La muestra fue inyectada en una columna conteniendo 100 mL de gel agarosa al 4%. El flujo aplicado fue de 0,5 mL/min. Otros detalles están descritos en métodos: (-) extracto crudo antes de la precipitación térmica; (- - -) extracto crudo después de la precipitación térmica.

4.4.2. Purificación de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. cepa T2, por adsorción selectiva a soportes MANAE-agarosa con diferentes grados de activación

Se estudió la purificación de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 por adsorción selectiva sobre soportes MANAE-agarosa con diferentes grados de activación: desde 1; 2,5; 5; 20 hasta 40 μ moles de grupos amino/g de soporte. Así, durante 1 hora se ofrecieron los extractos crudos de alfa-galactosidasa a estos soportes, y se vio que más del 95% del total de las proteínas no se adsorbían a los soportes con menor grado de activación, en cambio, entre 70 y 75% de las proteínas sí se adsorbían a los soportes de mayor grado de activación, como se puede observar en la Figura 15.

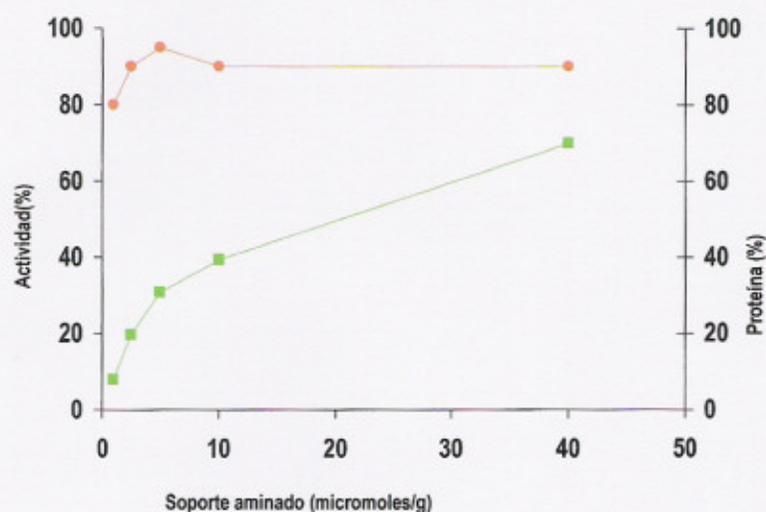


Figura 15.- Adsorción del extracto de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre soportes MANAE-agarosa con diferente grado de activación. El experimento se ha llevado a cabo como está descrito en materiales y métodos: (■) actividad alfa-galactosidasa; (●) proteínas totales.

Con los resultados representados en las curvas de la Figura 15, concluimos que con los soportes poco cargados es posible adsorber las proteínas de gran tamaño, impidiendo de esta forma que las de menor tamaño tengan el mismo grado de interacción con el soporte, eliminándolas de las enzimas de interés.

Los soportes altamente activados, además de adsorber un porcentaje muy elevado de otras proteínas del extracto, se observó que necesitaban de una concentración más alta de NaCl para desorber no solo la proteína de interés, sino también otras proteínas del extracto (Figura 16).

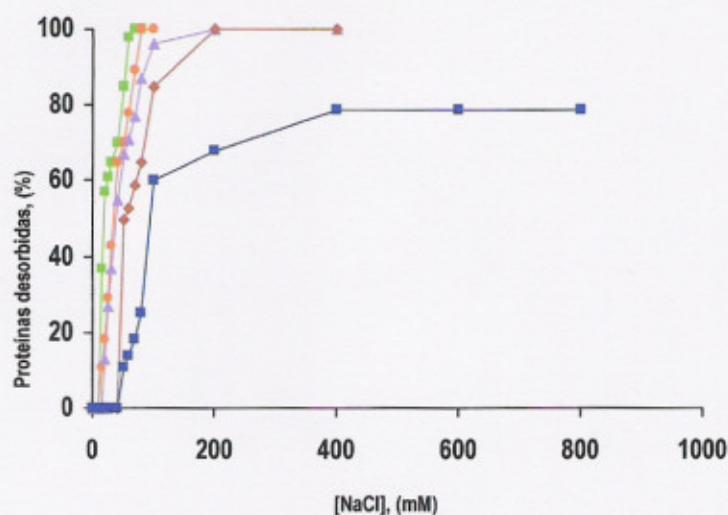


Figura16.- Desorción de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 adsorbida sobre diferentes soportes MANAE-agarosa con distintos grados de activación (1; 2,5; 5; 20 y 40 μ moles de grupos amino/g del soporte). Las proteínas adsorbidas en diferentes soportes aminados fueron incubadas gradualmente en concentraciones crecientes de NaCl a pH 7,0 : (■) alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 desorbida del soporte activado con 1 μ mol/g de soporte; (●) alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 desorbida del soporte activado con 2,5 μ mol/g de soporte; (▲) alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 desorbida del soporte activado con 5 μ mol/g de soporte; (◆) alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 desorbida del soporte activado con 20 μ mol/g de soporte; (■) alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 desorbida del soporte activado con 40 μ mol/g de soporte.

En este caso, algunas proteínas se unían tan fuertemente al soporte que, ni aplicando 1M de NaCl se pudieron desorber de los soportes, revelando una fuerte adsorción de las proteínas de gran tamaño, por interacción iónica muy intensa, a través de numerosos enlaces entre ésta y el soporte, dificultando así, su desorción. Sin embargo, este fenómeno no fue observado cuando se hizo uso de soportes muy poco activados, en los que como se observa en la Figura 16, a muy baja concentración de NaCl (50-100 mM) se desorbió casi el 100% de la alfa-galactosidasa.

La Figura 17 presenta la electroforesis resultante de la desorción de la alfa-galactosidasa adsorbida sobre soportes poco activados, donde podemos corroborar que, efectivamente, solamente aparece la banda correspondiente a la enzima objeto de estudio en este trabajo.

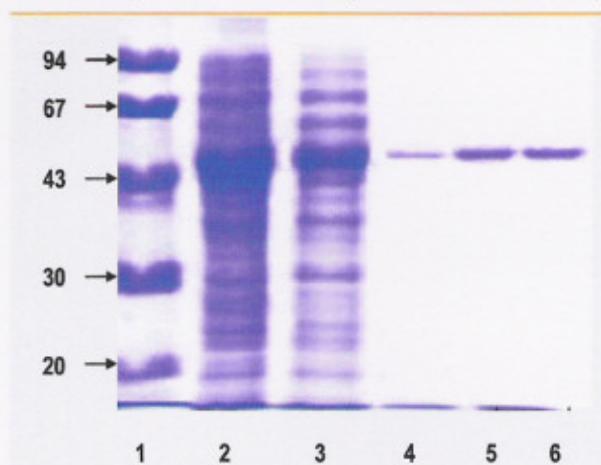


Figura 17. Gel en SDS-PAGE (12%), de proteínas desorbidas de soportes MANAE-agarosa con 1; 2,5; y 5 μmol/g de soporte, después de hervir en presencia de SDS

Carril 1: patrón de peso molecular. Carril 2: extracto crudo de alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2. Carril 3: extracto crudo de alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 después de la precipitación térmica. Carril 4: proteínas sueltas del soporte aminado con 1 μmol. Carril 5: proteínas desorbidas del soporte aminado con 2,5 μmoles. Carril 6: proteínas desorbidas del soporte aminado con 5 μmoles.

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos tras la adsorción y desorción de la alfa-galactosidasa sobre los diferentes soportes MANAE. En ella puede observarse que los mejores rendimientos de purificación fueron logrados cuando se utilizaron soportes amino de muy bajo grado de activación, donde hemos alcanzado un factor de purificación en torno al 20 X, manteniendo niveles de pureza muy elevados.

Muestra	Actividad (U/mL)	Concent. proteína (mg/mL)	Rendimiento (%)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Extracto soluble	0,290	3,400	100	0,086	1
MANAE-agarosa 1 μ mol	0,240	0,086	83	2,000	22
MANAE-agarosa 2,5 μ moles	0,210	0,097	72	2,100	24
MANAE-agarosa 5 μ moles	0,200	1,100	70	0,180	2,1
MANAE-agarosa 20 μ moles	0,160	1,220	55	0,130	1,7
MANAE-agarosa 40 μ moles	0,144	1,040	50	0,140	1,8

Tabla 3. Resumen del proceso de purificación de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, por adsorción a soportes MANAE-agarosa con distinto grado de activación. El proceso se llevó a cabo a 25 °C.

4.5. Inmovilización de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

4.5.1. Estudio de la estabilidad alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en las condiciones de interés para su inmovilización y estabilización

Aunque el objetivo primordial de esta Tesis se centra en el desarrollo de nuevas y sencillas metodologías para la preparación de biocatalizadores inmovilizados de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, es preciso conocer los márgenes de las condiciones en que se puedan utilizar (es decir, los márgenes de estabilidad de la enzima inmovilizada) para realizar los diversos protocolos de inmovilización y estabilización. En este caso, el pH de interés es 7 (donde tiene lugar normalmente casi todo el proceso de inmovilización de la enzima) y pHs alcalinos (p.e. pH 10), para conseguir una intensa interacción multipuntual entre los grupos reactivos de la proteína y los grupos del soporte.

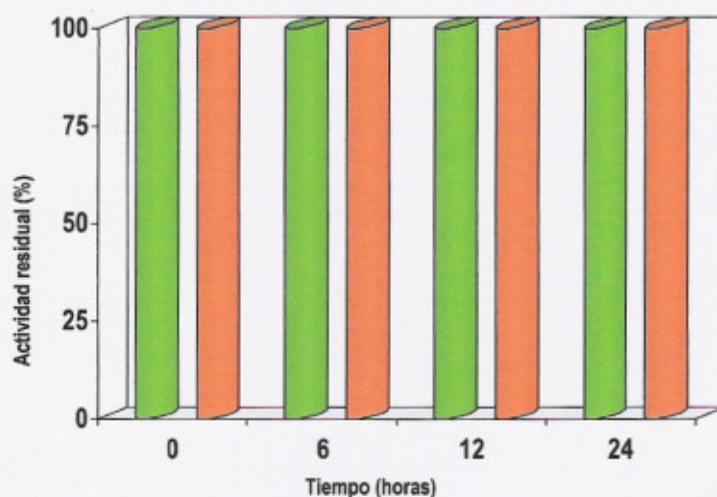


Figura 18.- Influencia del pH en la estabilidad de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en las condiciones estandarizadas de inmovilización. Muestra que esta enzima es sumamente estable en todo el rango de condiciones estudiadas (25 °C), tanto durante la inmovilización como en la incubación a

diferentes pH. (●) incubación del extracto en tampón fosfato pH 7 (●) incubación del extracto en tampón bicarbonato pH 10.

4.5.2 Inmovilización reversible sobre diferentes tipos de soportes intercambiadores iónicos.

Tras el análisis de las condiciones de inmovilización (25 °C pH 5 y 7) de la alfa-galactosidasa, se estudió el proceso de inmovilización de la enzima, sobre distintos intercambiadores iónicos. Se probaron los siguientes soportes: carboximetil-agarosa (CM-agarosa); polietileneimina-agarosa (PEI-agarosa); DEAE-agarosa (DEAE-agarosa) y sobre dextrano-sulfato-agarosa (DxtSO₄-agarosa). En todos los casos para evaluar su influencia sobre la actividad y recuperación de la actividad enzimática. Los resultados del proceso de inmovilización de la enzima, se resumen en la Tabla 4.

Soporte	pH	Rendimiento (%)	Actividad intrínseca (%)
CM- celulosa	5	53	85
CM- celulosa	7	49	85
Agarosa- 4BCL- PEI (25kD)	5	73	90
Agarosa- 4BCL- PEI (25kD)	7	98	100
Agarosa- 4BCL- Dxt SO ₄	5	67	88
Agarosa- 4BCL- Dxt SO ₄	7	33	84
DEAE sepharose	5	74	91
DEAE sepharose	7	77	92
MANAE-agarosa- 4BCL	5	88	92
MANAE-agarosa- 4BCL	7	98	100

Tabla 4.- Efecto del pH sobre el rendimiento de inmovilización y actividad intrínseca de la alfa-galactosidasa durante el proceso de su inmovilización.

4.5.3. Cinética de inmovilización de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre soportes iónicos.

En la Figura 19 se representa la cinética de inmovilización alcanzada en uno de los mejores derivados, según los datos de la Tabla 4, durante 1 hora de inmovilización, en las condiciones descritas. Como se puede observar la alfa-galactosidasa se inmovilizó rápidamente (en aproximadamente 1 hora) tanto en el soporte activado con grupos amino (MANAE-agarosa) a pH 7

como sobre el soporte glioxil-agarosa recubierto con PEI igualmente a pH 7, siendo además, los derivados donde se había alcanzado el 100% de recuperación de la actividad enzimática. En el caso de los derivados preparados tanto sobre el soporte DxtSO₄-agarosa como sobre el CM-agarosa, aunque se recuperaba la actividad por encima del 80%, la cinética de inmovilización fue bastante mas lenta en ese tiempo, ya que se lograron solamente un 80 y 50% de inmovilización respectivamente, durante 1 hora.

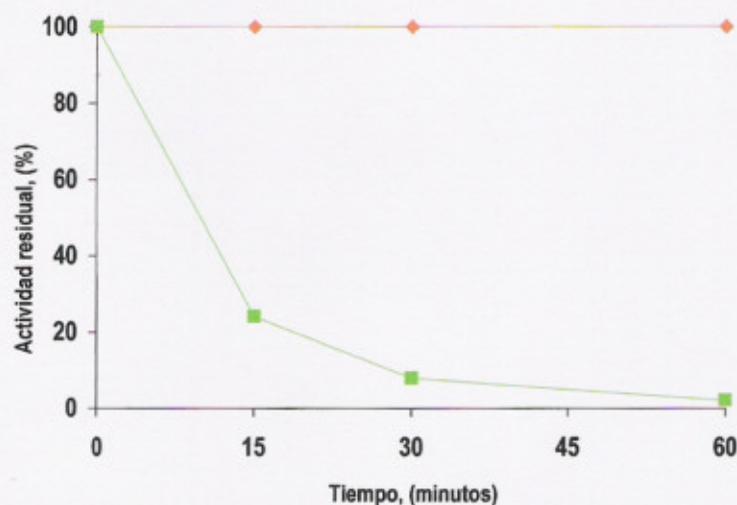


Figura19.- Curso de inmovilización de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, sobre el soporte PEI-agarosa. PEI-agarosa (■) sobrenadante (◆)

4.5.4. Evaluación de la fuerza de unión de la enzima en los diferentes soportes.

Tras lograr la inmovilización de la alfa-galactosidasa sobre los distintos soportes de intercambio iónico, se realizaron estudios de desorción para cuantificar la fuerza de unión entre la enzima y el soporte. Los derivados se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de NaCl y se determinó la cantidad de enzima que se liberaba al medio. En la Figura 20 se presentan los resultados obtenidos en la desorción de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, de los soportes iónicos donde se registraron enlaces más fuertes, coincidiendo con los soportes que mejor adsorbieron la enzima. Como puede observarse en la Figura 20, la concentración de NaCl necesaria para desorber la enzima de los soportes representados es mucho mayor en los derivados MANAE-agarosa y PEI-agarosa pH 7,0 que en otros derivados, analizados a pH 7 y 5. También, de esto se pudo inferir que, de forma general, la enzima se adsorbe mucho más fuertemente a pH 7 (en casi todos los soportes), que a pH 5, con excepción del derivado preparado sobre CM-agarosa, donde se

observa que a 200 mM de NaCl se desorbe menos del 40%. Durante el proceso de desorción la solución mantuvo la actividad enzimática, y solo se pudo desorber el 60% de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 con una adición de NaCl de 800 mM.

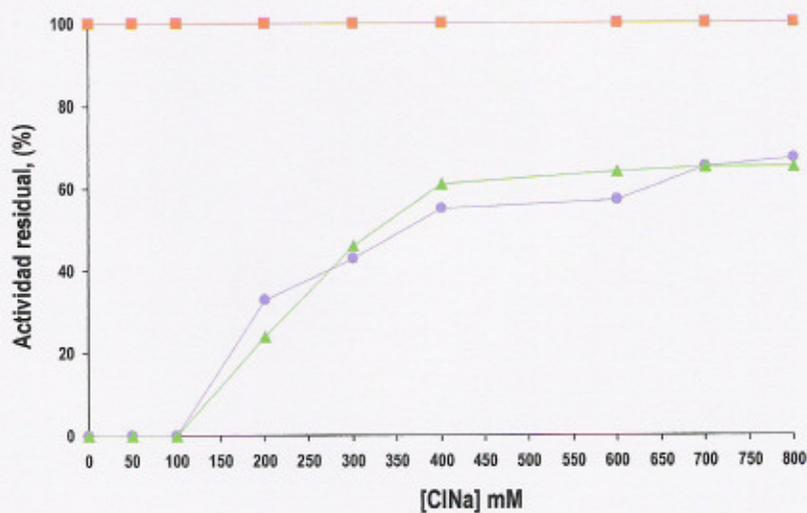


Figura20.- Desorción de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en soportes policatiónicos. Los derivados fueron incubados en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. La reacción transcurrió a temperatura ambiente, tras la inmovilización del 100% de la enzima en ambos soportes. (■)Suspensión. (●) Enzima desorbida del soporte PEI-agarosa. (▲) Enzima desorbida del soporte MANAE-agarosa.

4.5.5. Estabilidad térmica de los biocatalizadores obtenidos por inmovilización reversible de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 en diferente soportes.

La gran fuerza de adsorción iónica que se encontró entre la enzima y el soporte tanto en el derivado MANAE-agarosa como en el derivado PEI-agarosa, ambos a pH 7, podría conferir también un mayor grado de estabilización de la estructura tridimensional de la enzima frente a distintos agentes inactivantes, entre ellos la temperatura, por lo que se llevaron a cabo estudios de estabilidad térmica.

La Figura 21 A y B muestran los cursos de inactivación térmica de los diferentes derivados de la alfa-galactosidasa adsorbida sobre intercambiadores iónicos. En este experimento, se pudo comprobar que el derivado preparado sobre MANAE-agarosa a pH 7 fue el que mejor estabilidad

presentó después de incubar a 75 °C durante un tiempo aproximado de 7 horas, (Figura 21B), seguido del derivado sobre PEI igualmente preparado a pH 7, coincidiendo con los resultados encontrados cuando estudiamos la desorción de la enzima de estos mismos soportes, al necesitar de mayor concentración de NaCl en relación a los demás soportes.

Un caso singular, es el observado sobre los soportes PEI-agarosa; DxtSO₄-agarosa y MANAE-agarosa a pH 5, que en términos de fuerza de unión parecía que la enzima se adsorbía mucho más débilmente, y en cambio, presentó una gran estabilidad en las condiciones experimentales, alcanzando normalmente más del 50% de vida media, al mismo tiempo de incubación a 75 °C. Los restantes derivados presentaron actividades residuales muy moderadas, con valores mínimos las preparaciones sobre DEAE-cefarosa, a los dos pH ensayados ya que casi presentan una estabilidad muy parecida a la de la enzima soluble. De esta forma, decidimos usar el derivado MANAE-agarosa y PEI-agarosa, a pH 7, como derivados reversibles modelos, para posteriores experimentos, para posibles aplicaciones en reacciones de hidrólisis de mayor interés en la industria alimentaria, debido a que el rendimiento de inmovilización, la fuerza de adsorción y la estabilidad alcanzadas fueron los más adecuadas.

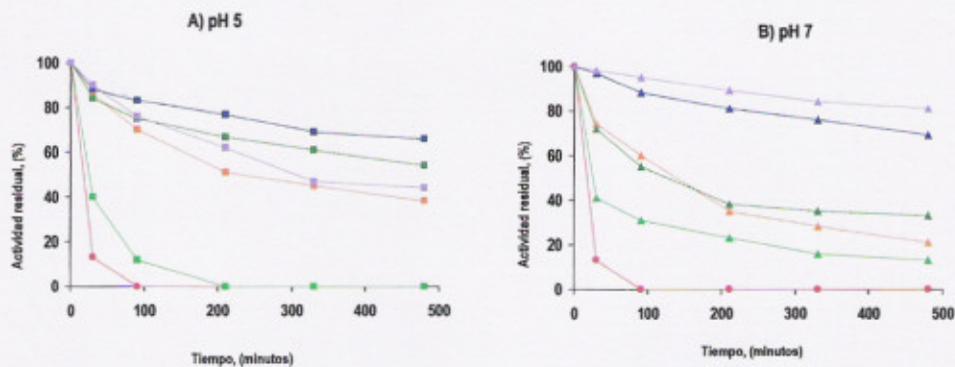


Figura 21.- Inactivación térmica de los derivados de alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, tras la incubación a pH 7 y pH 5 a 75 °C. (●) Extracto de la enzima soluble (■, ▲) Derivado CM-agarosa (■, ▲) Derivado DxtSO₄-agarosa (■, ▲) Derivado PEI-agarosa (■, ▲) DEAE-sefarosa (■, ▲) Derivado MANAE-agarosa.

4.5.6. Efecto de la temperatura en la actividad del derivado PEI-agarosa

Para determinar la temperatura óptima de la actividad enzimática de los derivados, los ensayos se realizaron como está indicado en el apartado 3.2.5.1. de Materiales y Métodos. Se

hicieron estudios de diferentes derivados preparados a pH 7 y pH 5 a diferentes temperaturas. Los dos mejores derivados presentaron temperaturas óptimas similares a la de la enzima soluble, con la peculiaridad de presentar una relativa estabilidad en el intervalo entre 60 y 70 °C.

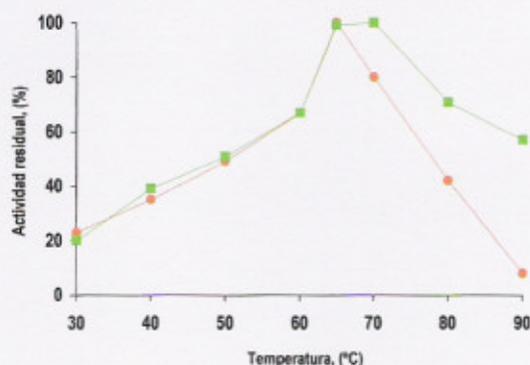


Figura 22.- Actividad a diferentes temperaturas del derivado PEI-agarosa. Las condiciones experimentales fueron tampón fosfato 50mM pH 7, conteniendo 2,2 mg/mL. (●) Enzima soluble (■) Derivado PEI-agarosa

4.5.7. Efecto del pH en la actividad del derivado PEI-agarosa

El ensayo para determinar el pH óptimo, tanto en la enzima soluble como en los derivados, registró la actividad máxima en el intervalo entre el pH 6,5 y pH 7. Estos son los valores de pH empleados para los ensayos posteriores. El experimento se realizó como está descrito en el apartado 3.2.5.1. de Materiales y Métodos.

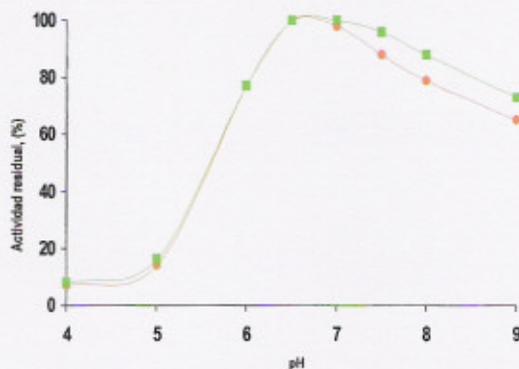


Figura 23.- Efecto del pH en la actividad alfa-galactosidasa a 25°C. (●) Enzima soluble (■) Derivado PEI-agarosa.

4.5.8. Estabilidad frente al pH y la temperatura de la enzima soluble y los derivados MANAE-agarosa y PEI-agarosa

La enzima soluble alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 resultó ser menos estable que los derivados MANAE-agarosa y PEI-agarosa en las mismas condiciones de estudio. La inmovilización de la enzima permitió un incremento de la estabilidad de un 40% en relación a la enzima soluble a 65 °C y pH 9. La arquitectura de la enzima inmovilizada permitió que la enzima conservara su actividad a esta temperatura tras 70 horas de incubación. El grado de estabilidad logrado en la inmovilización ofrece ventajas prácticas frente al uso de la enzima soluble.

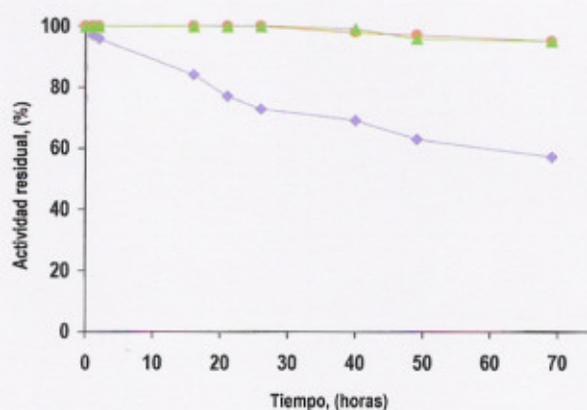


Figura 24.- Estabilidad térmica de la enzima soluble y de los derivados a 65 °C pH 9 . (●) Derivado MANAE-agarosa (▲) Derivado PEI-agarosa (◆) Enzima soluble.

4.6. Purificación, Inmovilización reversible y estabilización en un solo paso de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre soporte Sepabeads-quelato en presencia de imidazol

4.6.1. Adsorción-purificación de la enzima

Para la inmovilización de la enzima hemos usado diferentes soportes Sepabeads-quelato (de acuerdo al grado de activación del soporte con grupos IDA). En la Figura 25 representamos el proceso de inmovilización de la enzima sobre el soporte Sepabeads-EB-IDA-Ni (activado con 115 μ moles de grupos IDA / g de soporte) frente a varias concentraciones de imidazol. El proceso de adsorción de la enzima fue bastante rápido y, tras aplicar distintas concentraciones de imidazol,

observamos que cuando aplicamos hasta 50 mM de imidazol, más del 80% de la enzima se adsorbía al soporte, mientras que solamente un 5-10% de otras proteínas del extracto se adsorbían al mismo. Así, pudimos establecer nuestro protocolo de adsorción sobre este soporte usando 50 mM de imidazol, con el que se aumenta notablemente el grado de pureza de la enzima ya en el paso de adsorción de las proteínas del extracto. En la figura observamos que a concentraciones por debajo de 50 mM de imidazol, el proceso de adsorción no era selectivo, ya que el porcentaje de adsorción de otras proteínas naturales del extracto era bastante elevado, por ej. 30% de otras proteínas al aplicar 20 mM de imidazol durante la adsorción.

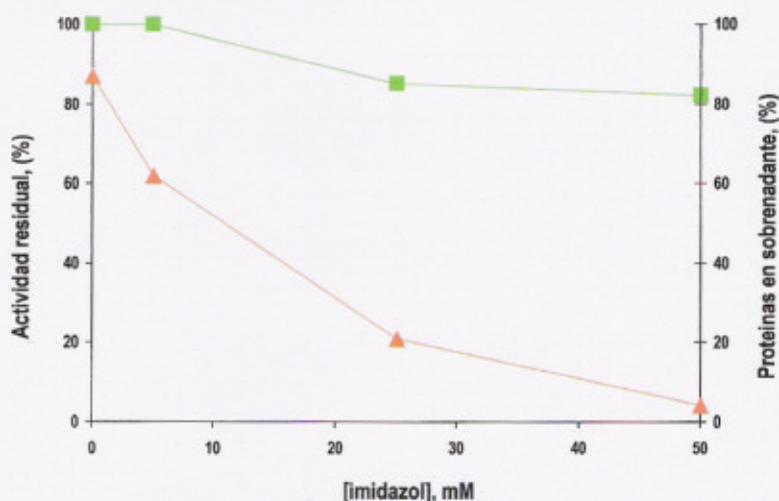


Figura 25.- Estabilidad térmica del derivado de la alfa-galactosidasa sobre soportes Sepabeads-EB-IDA-Ni adsorbida en presencia de 50mM de imidazol. La inactivación tuvo lugar en Tampon fosfato sódico 5mM y pH 7, a 70°C. (■) Enzima soluble, (▲) derivado Sepabeads-EB-IDA-Ni

En la Figura 26, se observa el grado de purificación alcanzado, tras la adsorción de la enzima sobre el soporte Sepabeads-IDA-Ni quelato en presencia de 50 mM de imidazol. Para alcanzar estos niveles de purificación, hemos precalentado el extracto a 70 °C durante 10 minutos, para eliminar la mayoría de las proteínas de *E. coli* y, seleccionado el soporte adecuado (atendiendo al grado de activación del mismo, concentración de iones metálicos, el diámetro de poro del soporte y la distribución de los poros en el mismo).

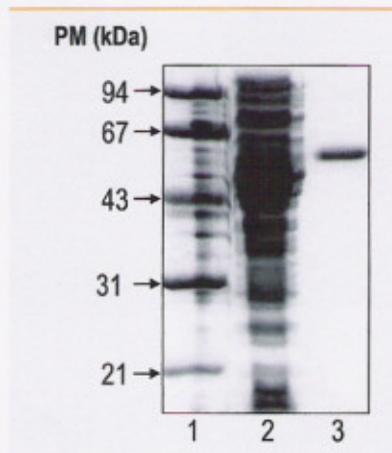


Figura 26.- Análisis en SDS-PAGE (12%) de las preparaciones de extracto crudo de *E. coli* conteniendo alfa gal adsorbida en soportes Sepabeads-EB-IDA-Ni , en presencia de 50mM de imidazol a pH 7 y 25°C

Carril1: PM

Carril2: Extracto crudo de alfa-galactosidasa

Carril 3: Proteínas adsorbidas sobre Sepabeads-EB-IDA-Ni

Teniendo en cuenta estos parámetros y la naturaleza de la enzima (enzima lo suficientemente grande - hexámero), deducimos que a concentraciones moderadamente grandes (50 mM) de imidazol solo las grandes áreas superficiales de la enzima son las que han podido superar la gran concentración de imidazol en el medio de reacción y adsorber de forma muy selectiva al soporte.

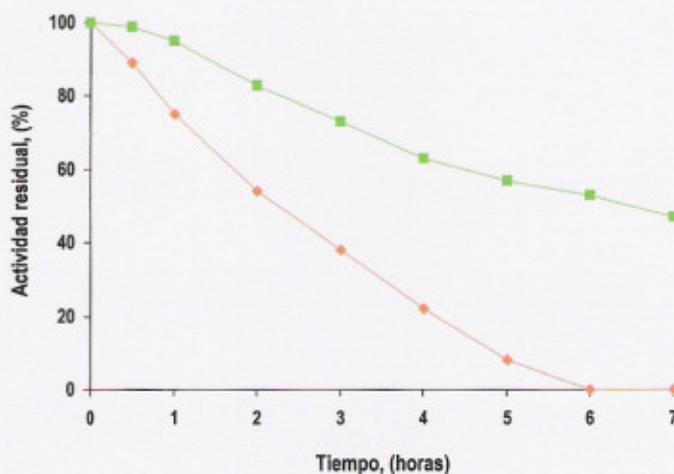


Figura 27.- Efecto de la presencia de imidazol en la adsorción de extractos proteicos de *E. coli* conteniendo alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2* sobre el soporte Sepabeads-EB-IDA-Ni . La adsorción se llevó a cabo en tampón fosfato 5mM pH7.

4.6.2. Capacidad de carga y estabilización térmica.

Usando el soporte MANAE-agarosa en condiciones de adsorción estándar, solamente cerca de 2 mg de la enzima se adsorbía por gramo de soporte, ya que conjuntamente se habían adsorbido otras proteínas del extracto. En cambio, aplicando la estrategia que acabamos de analizar, se ha podido adsorber cerca de 10 mg de enzima por g de soporte, previo calentamiento del extracto enzimático, como se comentó en el apartado 4.6.1. siendo esta cantidad idéntica cuando se había adsorbido la enzima previamente purificada. En la Figura 24 se observó que la estabilidad del derivado es mucho mayor que la correspondiente enzima soluble. Este hecho puede estar motivado, por la naturaleza misma de la enzima (enzima hexamérica) y además por el hecho posiblemente, de las condiciones restrictivas impuestas a la enzima durante el proceso de adsorción, en que un mayor número de subunidades de la enzima se han implicado en el proceso de inmovilización.

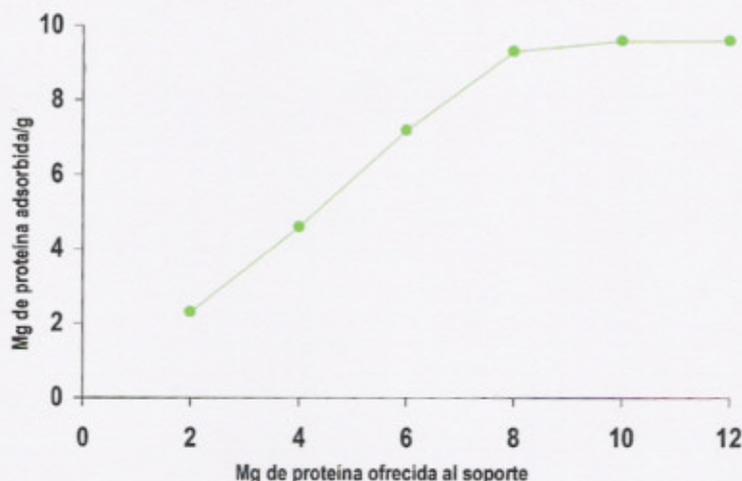


Figura 28.- Efecto de la carga de proteína de alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre la enzima inmovilizada en MANAE-agarosa 4BCL. La inmovilización de la proteína se llevó a cabo en una solución de fosfato de sodio 5mM pH 7 a 25 °C.

4.6.3. Inmovilización irreversible de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 por unión covalente multipuntual

Habíamos comentado en el inicio de esta Memoria, que el principal objetivo de esta Tesis se centra en el desarrollo de nuevas metodologías para la preparación de biocatalizadores inmovilizados de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, por lo que era necesario conocer los márgenes de condiciones que podemos utilizar, es decir, aquellos valores entre los cuales la enzima es estable para realizar los diversos protocolos de inmovilización y estabilización que se pretenden aplicar (Mateo, 2001). En este caso, los pH de interés son 7, donde tiene lugar la inmovilización de la enzima en casi todos los soportes y pH's alcalinos, p.e., 9, donde se consigue una intensa interacción de tipo multipuntual entre los grupos reactivos de la proteína y los grupos reactivos del soporte. En el epígrafe 4.5.2. donde se comentaron los resultados de la inmovilización reversible, ya habíamos visto que, la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, es sumamente estable en todo el rango de condiciones experimentales estudiadas.

4.6.3.1. Rendimientos de inmovilización covalente de la alfa-galactosidasa sobre distintos soportes

Para llevar a cabo este experimento, la enzima fue inmovilizada sobre los soportes bromuro de cianógeno-agarosa; glioxil-agarosa; glutaraldehído; Sepabeads-epóxido y Sepabeads-amino-epóxido, como se ha descrito en Materiales y Métodos.

En la Tabla 5 se resumen los rendimientos obtenidos tras la inmovilización de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 sobre estos soportes. La mayoría de los soportes permitían rendimientos de inmovilización tras 90 minutos, a excepción de los derivados preparados sobre soportes glioxil-agarosa y Sepabeads estándar, que lo hicieron en 24 horas de interacción, alcanzando en todos los casos una adsorción superior a 85% y con rendimientos de recuperación de actividad por encima del 90% en casi todos los casos, a excepción del derivado sobre Sepabeads estándar, donde se ha alcanzado un 85 % de recuperación de actividad enzimática.

Tipo de soporte	Rendimiento (%)	Actividad intrínseca (%)
CNBr agarosa	96	100
Glioxil-agarosa	94	100
Glutaraldehído	96	100
MANAE-glutaraldehído	96	100
Sepabeads EC-EP	85	86
Aminoepóxido EC-HFA	91	86

Tabla 5.- Rendimiento de inmovilización en soportes covalentes de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

4.6.3.2. Cinética de inmovilización covalente de la alfa-galactosidasa sobre los distintos soportes

La Figura 29 (A y B), muestra la inmovilización de la enzima sobre los distintos soportes. En casi todos los soportes se pudo apreciar que las adsorciones fueron casi totales, después de los respectivos tiempos de inmovilización y las condiciones de cada caso. El soporte que más rápidamente inmovilizaba la enzima fue el BrCN-agarosa, que inmoviliza toda la enzima en 1 hora, seguido del soporte glutaraldehído.

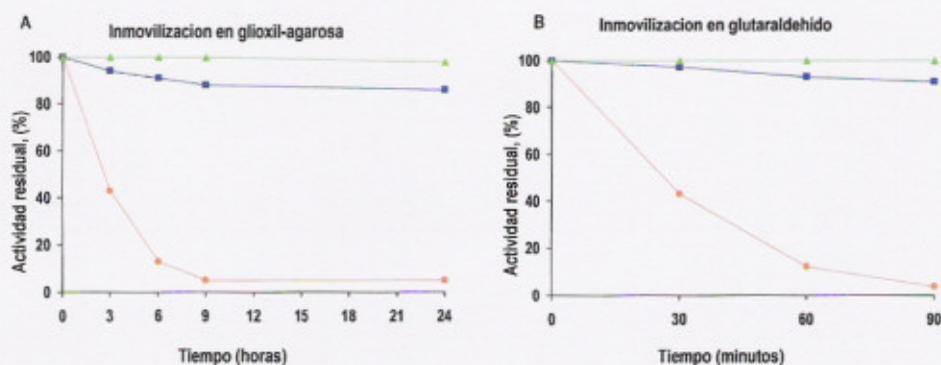


Figura 29 (A y B).- Curso de inmovilización de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, sobre soportes Glioxil-agarosa y Glutaraldehído-agarosa. ● Sobrenadante ■ Suspensión ▲ Blanco

4.6.3.3. Estabilidad térmica de las preparaciones de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 inmovilizadas covalentemente.

En la Figura 30 se muestra el efecto de la temperatura en las cinéticas de inactivación de diferentes preparaciones de la alfa-galactosidasa. En ella se observa que todas las preparaciones inmovilizadas de la enzima eran mucho más estables que la enzima soluble, siendo el derivado preparado sobre MANAE-agarosa, el que mejor estabilidad presentó, manteniendo casi la totalidad de su actividad, (alcanzándose un grado de estabilización de unas 40x con respecto a la soluble), seguido del derivado sobre soporte glutaraldehído, que mantuvo cerca del 75% de la actividad tras más de 5 horas de incubación a 75 °C y pH 7. Un dato significativo fue el observado en las preparaciones sobre soportes sepabeads. Tanto el derivado Sepabeads-amino epóxido como el derivado sobre Sepabeads estándar, presentaron una estabilidad muy parecida a la de la enzima soluble, con excepción del derivado preparado sobre el soporte quelato epóxido (Sepabeads-IDA-Cu), que conservaba casi 60-65%; lo que podría indicar que esta enzima posee zonas con una densidad muy gran de residuos His capaces de unirse con los quelatos del soporte.

De esta forma, decidimos usar MANAE-agarosa entrecruzado con glutaraldehído para posteriores experimentos, debido a que el rendimiento de la inmovilización y la estabilidad alcanzada fueron las que encontramos más adecuadas para el diseño de las reacciones de interés en alimentos.

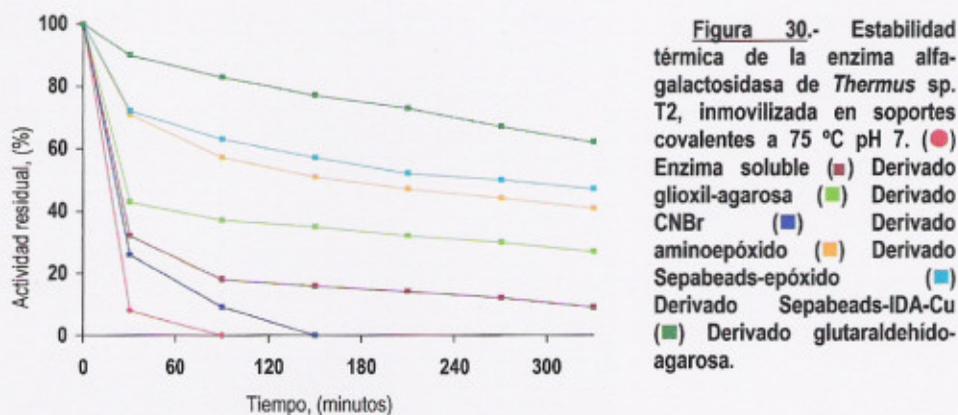


Figura 30.- Estabilidad térmica de la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, inmovilizada en soportes covalentes a 75 °C pH 7. (●) Enzima soluble (■) Derivado glioxil-agarosa (■) Derivado CNBr (■) Derivado aminoepóxido (■) Derivado Sepabeads-epóxido (■) Derivado Sepabeads-IDA-Cu (■) Derivado glutaraldehído-agarosa.

4.6.3.4. Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de los derivados inmovilizados covalentemente

4.6.3.4.1. Efecto del pH

En la Figura 31 (A y B), se observa el efecto del pH en la actividad de cada uno de los derivados de la alfa-galactosidasa preparados de forma covalente, comparándolos con la respectiva enzima soluble. Fueron estudiados en un rango de pH de 4 a 10, y en casi todos los derivados observamos un perfil casi idéntico al de la enzima soluble, siendo los derivados glioxil-agarosa y glutaraldehído-agarosa, los que presentaron mayor identidad. De forma general, los derivados presentaron un pH óptimo en torno a pH 6,5-8,0. Estas pequeñas diferencias, podían estar motivadas por el ensamblaje de la enzima en cada uno de los soportes. Dado que la alfa-galactosidasa es una enzima multimérica (hexamérica) y la interacción de cada una de las subunidades en cada soporte, puede influenciar esa ligera modificación en el comportamiento con el pH.

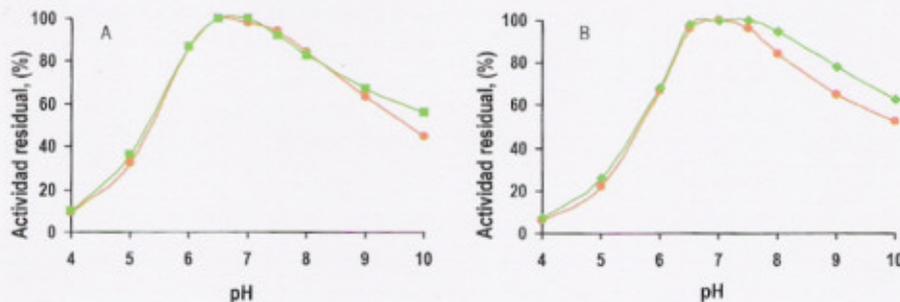


Figura 31 (A y B) - Análisis del efecto del pH en la actividad de la enzima inmovilizada en soportes covalentes, comparada con la enzima soluble. (●) Enzima soluble (■) Derivado glioxil-agarosa (▲) Derivado glutaraldehído-agarosa

4.6.3.4.2. Efecto de la Temperatura.

Una vez inmovilizada la enzima y estudiado el efecto del pH en la actividad, se estudió posteriormente el efecto de la temperatura sobre la actividad de los derivados obtenidos, de forma similar a como se procedió durante la caracterización bioquímica de la enzima soluble en un rango

de temperatura desde 25 hasta 80 °C, como se puede observar en la Figura 32(A y B). El comportamiento en todos los casos fue similar, tanto en la enzima soluble como en los derivados, aunque se observó claramente una ligera diferencia a temperaturas superiores a 65 °C; donde la enzima inmovilizada resultó más estable que la soluble.

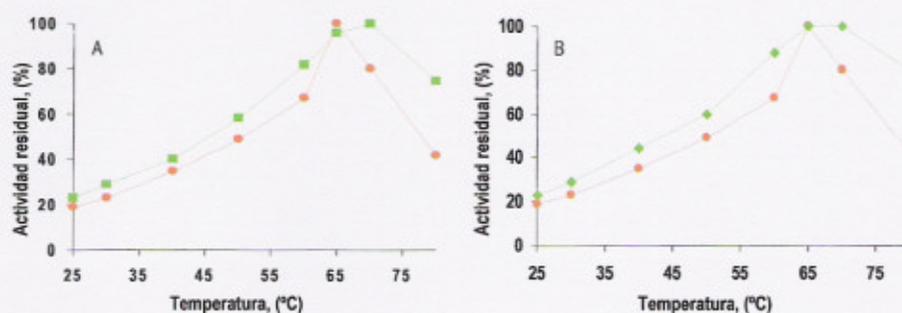


Figura 32 (AyB).- Análisis del efecto de la temperatura en la actividad de la enzima inmovilizada en soportes covalentes comparada con la enzima soluble. (●) Enzima soluble (■) Derivado glicoxil-agarosa (◆) Derivado glutaraldehído-agarosa.

4.6.4. Optimización de la inmovilización irreversible de la alfa-galactosidasa sobre MANAE-agarosa: entrecruzamiento con glutaraldehído

Tras haber logrado la adsorción de la alfa-galactosidasa sobre soportes de tipo MANAE-agarosa (máximo grado de activación: 40 μ moles / g de soporte), se realizó el diseño de un nuevo tipo de derivado en el que se combinará tanto la adsorción de la proteína al soporte junto con la unión covalente, con el objeto de observar el efecto en la estabilidad de la proteína. Fue seleccionado el soporte MANAE-agarosa, ya que hasta este momento, había sido el soporte que mejores resultados había ofrecido, tanto en rendimiento como en estabilidad. Paralelamente, se varió el grado de activación del soporte MANAE-agarosa para estudiar la influencia que podría tener el uso de soportes con distintos niveles de activación en las principales propiedades del biocatalizador.

GRADO DE ACTIVACIÓN DEL SOPORTE	5 μ moles	20 μ moles	40 μ moles
ACTIVIDAD RECUPERADA (%) GLUTARALDEHÍDO 1%	64	82	96
ACTIVIDAD RECUPERADA (%) GLUTARALDEHÍDO 5%	56	77	88

Tabla 6.- Efecto de la concentración de la solución entrecruzante de glutaraldehído en la actividad de la enzima inmovilizada en soportes aminados con diferentes grados de activación.

Una vez adsorbida la enzima sobre los soportes MANAE-agarosa (activados con 5; 20 y 40 μ moles de grupos amino/g de soporte), se incubaron los derivados en presencia de una solución de glutaraldehído al 1% y 5% (reactivo bifuncional que permite entrecruzar los grupos amino del soporte y los grupos amino primarios de la enzima). Atendiendo a la mayor actividad recuperada en relación a la solución entrecruzante al 5%, realizamos ensayos para comparar la estabilidad de los dos derivados entrecruzados. Como se ve en la Figura 33, se comprobó que la enzima inmovilizada y entrecruzada con las dos soluciones de glutaraldehído fue mucho más estable que la enzima soluble, sin embargo el derivado incubado con la solución al 5% presentó menos actividad y fue menos estable a 70 °C.

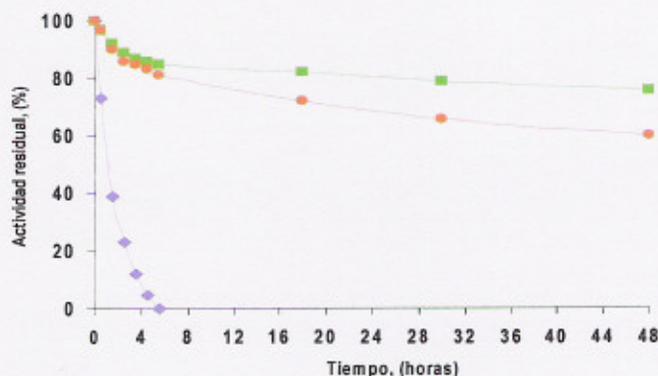


Figura 33.- Efecto de la concentración de glutaraldehído en la estabilidad/actividad de los derivados MANAE optimizados a 70 °C. (◆) Enzima soluble (■) Derivado MANAE-glutaraldehído 1% (●) Derivado MANAE-glutaraldehído 5%.

Conocida la concentración ideal para optimizar los derivados MANAE-agarosa y observándose que el máximo de actividad enzimática se logró utilizando una solución de 1% (v/v) de glutaraldehído, comparamos la estabilidad térmica entre el derivado MANAE-agarosa con el grado

de activación más estable y que mejor adsorbió la enzima, el derivado optimizado con glutaraldehído 1% más estable y el derivado glutaraldehído-agarosa, como se puede apreciar en la figura 35, todos presentan mayor estabilidad que la enzima soluble.

El principal objetivo de este experimento, era estudiar el efecto del grado de activación del soporte, en las principales propiedades de la enzima y poder comparar este hecho con los derivados enzimáticos no entrecruzados.

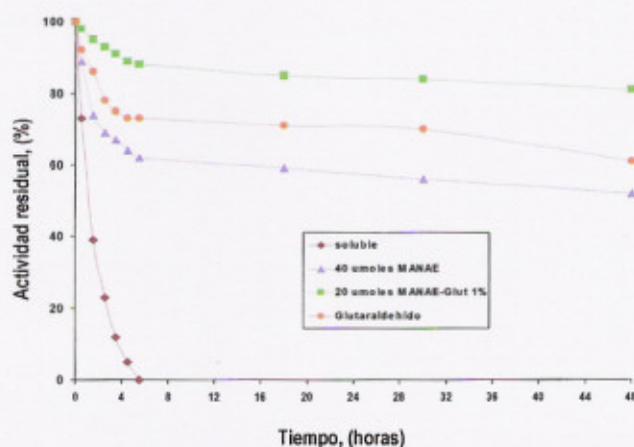


Figura 35.- Curso de inactivación térmica a 70 °C de diferentes derivados preparados a partir de diversas estrategias de inmovilización. (◆) Enzima soluble (■) 20 μmoles de MANAE-Glutaraldehído 1% (●) glutaraldehído (▲) 40 μmoles de MANAE-agarosa

4.6.5. Estabilidad térmica de los derivados preparados sobre soportes MANAE-agarosa

De los derivados MANAE-agarosa de diferentes grados de activación, optimizados con glutaraldehído 1%, resultaron ser muy estables los preparados a partir de soportes muy activados. El estudio mostró que tras 48 horas de incubación térmica a 70 °C, lograron conservar una actividad en torno a 80%.

En la Figura 36 podemos observar que tanto el derivado activado con 20 como el activado con 40 μmoles, son mejores que el menos activado.

Comparando las curvas de estabilidad en las Figuras 35 y 36, observamos que el grado de estabilización se ve incrementado, pasando de una actividad residual de 60% a 80%, tras 2 días de incubación, en un baño de agua termostatzado a 70°C en las mismas condiciones de análisis tras el entrecruzamiento de los mismos con glutaraldehído. Finalmente, en la Figura 36, comparamos los mejores derivados obtenidos por entrecruzamiento con glutaraldehído contra el derivado menos activado (5 μ moles).

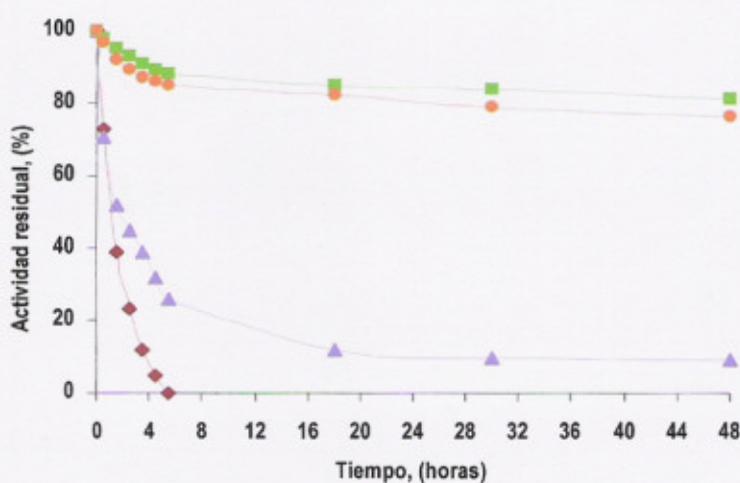


Figura 36.- Efecto del grado de activación del soporte en la estabilidad del derivado entrecruzado con glutaraldehído al 1%. \blacklozenge soluble, \blacktriangle 5 μ moles, \blacksquare 20 μ moles, \bullet 40 μ moles

En este experimento pudimos comprobar que efectivamente, a medida que aumenta el número de residuos amino en el soporte, mejora enormemente el grado de estabilización de la enzima. Curiosamente, parece ser que el aumento de grupos amino en el soporte no conlleva proporcionalmente un aumento significativo en la estabilización de la enzima, ya que se puede observar que los derivados con 20 μ moles presentaron mejores índices de estabilidad de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2.

4.7. Optimización de derivados de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 inmovilizada sobre soportes BrCN-agarosa por entrecruzamiento con dextrano-aldehído

En el experimento anterior, observamos que los mejores derivados, en cuanto a estabilidad térmica, eran los preparados sobre MANAE-agarosa, seguidos del derivado glutaraldehído. En la Figura 31 se observó que el derivado sobre BrCN fue el cuarto en cuanto a estabilidad se refiere, entre todos los analizados. Dado que fue un derivado con baja estabilidad, en el que tan solo se retenía el 45-50% de la actividad, se realizaron estudios de optimización con objeto de estabilizar la estructura hexamérica de la alfa-galactosidasa, realizando entrecruzamientos con dextrano aldehído para ver si sería posible aumentar el grado de estabilización del derivado y estabilizar la estructura cuaternaria de la enzima.

En la Figura 37 se presentan, por un lado, la electroforesis en geles de poliacrilamida del derivado BrCN-agarosa tras su entrecruzamiento con dextrano-aldehído, y por otro el estudio de la estabilidad térmica del nuevo derivado obtenido comparado con el respectivo derivado sin entrecruzamiento y la enzima soluble. En la electroforesis observamos que antes del entrecruzamiento, después de hervir el derivado con SDS y mercaptoetanol, apareció una banda de la enzima en el medio de reacción, lo que estaba indicando que, la estructura tridimensional de la alfa-galactosidasa no se había estabilizado por el mero hecho de su inmovilización, (calle 4). En cambio, cuando se procedió al entrecruzamiento del mismo derivado con dextrano-aldehído, ya no aparecían bandas de la enzima en el medio de reacción (calle 5).

También se puede ver el resultado de la estabilidad térmica del nuevo derivado entrecruzado, comparado con el derivado BrCN normal y en relación con la enzima soluble. Como se puede observar, además de conferir una mayor estabilización de la estructura cuaternaria de la enzima, este tratamiento, conllevó una mayor estabilidad del derivado con relación al derivado sin entrecruzar y mucho mayor aun que la enzima soluble.

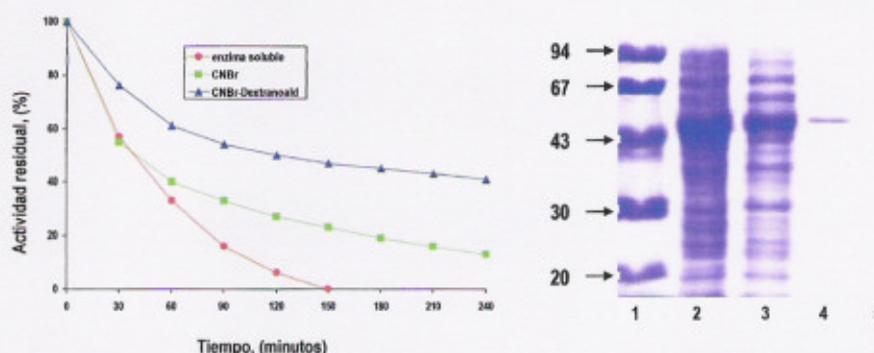


Figura 37.- Estabilidad térmica a 75 °C pH 7, del derivado CNBr, CNBr-dextrano aldehído y la disolución de la enzima y su respectiva electroforesis.

Gel en SDS-PAGE de proteínas desorbidas de soportes aminados con 1; 2,5; y 5 μ moles/g de soporte después de hervir en presencia de SDS como está descrito en materiales y métodos. Carril 1: patrón de peso molecular. Carril 2: extracto crudo de α -galactosidasa de *Thermus* sp. T2. Carril 3: extracto crudo de α -galactosidasa de *Thermus* sp. T2. después de la precipitación térmica. Carril 4: proteínas (sueltas) del soporte aminado 1 μ mol. Carril 5: proteínas desorbidas del soporte aminado con 2,5 μ moles. Carril 6: proteínas desorbidas del soporte aminado con 5 μ moles. (●) Enzima soluble, (■) CNBr, (▲) CNBr dextranoal dehidro

4.7.1. Efecto de la dilución del derivado BrCN en la estabilidad frente al pH y frente a temperatura

Una vez estudiado el efecto promovido por el entrecruzamiento con dextrano aldehído en la estabilización de la estructura tridimensional de la enzima, y en la estabilidad térmica, en el derivado BrCN estándar, nos propusimos estudiar el efecto que pudiera tener la dilución en la estabilidad de la α -galactosidasa. De este modo, analizamos tanto el derivado estándar BrCN-agarosa, como el derivado BrCN-agarosa entrecruzado con dextrano-aldehído a diferentes valores de pH. Así, estudiamos ese efecto a pH 5, 7 y 9.

En todos los casos de pH se obtuvieron análogos niveles de estabilidad. En la Figura 38, está representado el efecto de la dilución en la actividad del derivado CNBr a pH 9,0. Se analizaron derivados con 0,52 mg de proteína/ml de suspensión y derivados con 0,052 mg/ml de suspensión. Como puede verse en la Figura 38, la actividad enzimática permaneció presente en los derivados de

BrCN-agarosa a mayor concentración en el medio durante más tiempo que para el caso en que los derivados estaban diluidos 10 x en un orden de magnitud.

Por el contrario, en el caso de los derivados de BrCN entrecruzados con el dextrano aldehído, no se observó diferencia alguna, en cuanto al nivel de actividad de la suspensión, entre suspensiones del derivado con distinta concentración de derivado.

Además, los niveles de actividad de la suspensión fue superior en el caso de los derivados entrecruzados con el dextrano aldehído que en los que no lo están.

Estas diferencias podrían explicarse por un efecto de disociación de, al menos, alguno de los componentes del hexámero enzimático.

En los derivados entrecruzados con el polímero de aldehído, es razonable pensar que la totalidad del hexámero estará entrecruzado con el polímero impidiendo su disociación. Por el contrario, en el caso de los derivados de BrCN, solo los componentes del complejo enzimático que estén unidos mediante los grupos CN- del soporte permanecerán unidos a él.

La dilución en la concentración de proteínas es uno de los motivos más conocidos en los procesos de disociación-desnaturalización de las proteínas.

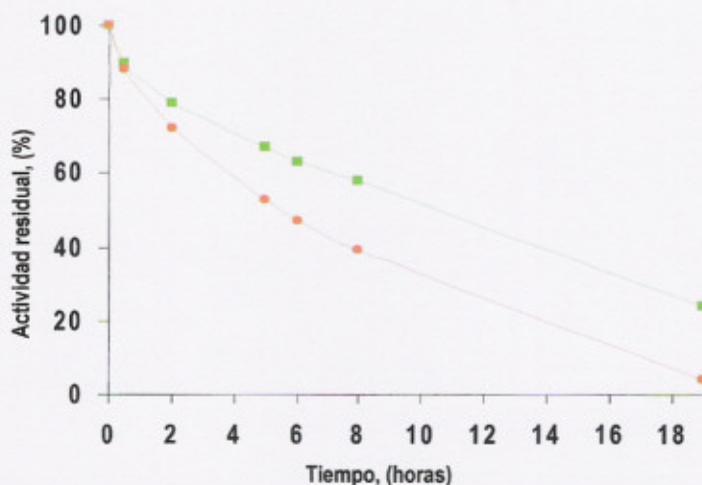


Figura 38.- Efecto de dilución en la actividad del derivado CNBr a 70°C pH 9. (●) Derivado CNBr 0,56 mg/ml (■) Derivado CNBr 5,2 mg/ml.

4.8.- Reacciones de interés con alfa-galactosidasa y sus derivados

4.8.1. Estudio de las cinéticas de inhibición de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 soluble y de los derivados MANAE-glutaraldehído y PEI-glutaraldehído por los productos de las reacciones de mayor interés en Tecnología de Alimentos

En los estudios cinéticos para la determinación de todas las constantes se utilizó pNPG como sustrato, atendiendo a la facilidad de su manipulación durante los experimentos y de la especificidad de la enzima de estudio. En las Tablas 7, 8 y 9 se presentan los resultados obtenidos cuando se calcularon las constantes cinéticas (K_m , $V_{m\acute{a}x}$ y K_i), tanto para la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2 soluble, como para los mejores derivados obtenidos: PEI-Glutaraldehído y MANAE-glutaraldehído.

INHIBIDOR	C(I) mM	ENZIMA SOLUBLE		K _i	INHIBICION
		V _{máx} (min/ μ mol)	K _m (mM)		
Blanco	0	33,9	3,3	0	
Galactosa	50	25,1	4,4	192,6	NO COMPETITIVA
Galactosa	100	22	4	184,8	
Galactosa	200	14,2	4	144,1	
Glucosa	50	27,7	4,6	223,3	NO COMPETITIVA
Glucosa	100	24,8	6,6	272,5	
Glucosa	200	19,5	6,4	270,8	
Galactosa +glucosa	50	29,7	4	353,5	NO COMPETITIVA
Galactosa +glucosa	100		3,7	264,5	
Galactosa +glucosa	200	14,9	3,3	156,8	

Tabla 7.- Constantes cinéticas de las reacciones de inhibición catalizadas por la enzima en disolución, empleando como inhibidores soluciones de glucosa y galactosa.

INHIBIDOR	C(I) mM	DERIVADO PEI-GLUT 1%		Ki	TIPO DE INHIBICION
		V _{máx} (min/μmol)	K _m (mM)		
Blanco	0	30,3	4		NO COMPETITIVA
Galactosa	50	26,7	4,7	370,8	
Galactosa	100	21,6	4,8	248,2	
Galactosa	200	15,8	5,4	217,9	
Glucosa	50	28	4,9	608,6	NO COMPETITIVA
Glucosa	100	24,1	4,8	388,7	
Glucosa	200	18,8	4,5	326,9	
Galactosa + glucosa	50	24,9	2	230,5	NO COMPETITIVA
Galactosa + glucosa	100	19,4	5	102,5	
Galactosa + glucosa	200	15	4,5	212,2	

Tabla 8.- Constantes cinéticas de las reacciones de inhibición catalizadas por el derivado PEI-glutaraldehído, empleando como inhibidores disoluciones de glucosa y galactosa.

INHIBIDOR	C(I) mM	DERIVADO MANAE-GLUT 1%		Ki	INHIBICION
		V _{máx} (min/μmol)	K _m (mM)		
Blanco	0	46,3	3,8	0	
Galactosa	50	27,8	4,7	75	NO COMPETITIVA
Galactosa	100	22,3	6,5	92,9	
Galactosa	200	16,8	6,9	113,8	
Glucosa	50	30,3	4,8	94,6	NO COMPETITIVA
Glucosa	100	24,2	4,5	109	
Glucosa	200	15,3	3,7	98,7	
Galactosa +glucosa	50	37,3	5,5	207,2	NO COMPETITIVA
Galactosa +glucosa	100	28,2	5,9	155,8	
Galactosa +glucosa	200	18,1	3,9	128,3	

Tabla 9.- Constantes cinéticas de las reacciones de inhibición catalizadas por el derivado MANAE-glutaraldehído, empleando como inhibidores disoluciones de glucosa y galactosa.

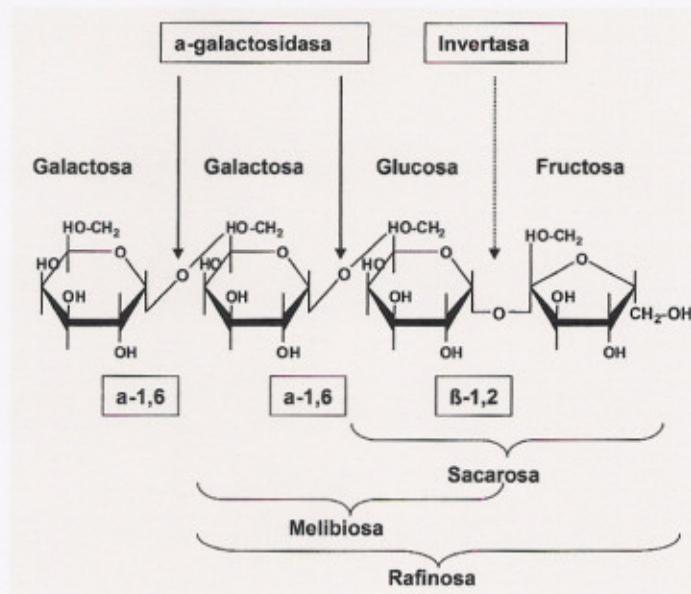
Los valores de la K_m hallados para la enzima soluble se situaron dentro de los límites descritos en la bibliografía para otras enzimas (Ishiguro y col., 2001), para la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2, determinados con pNPG como sustrato, (4 - 6 mM) y glucosa, galactosa y sacarosa como inhibidores, en concentraciones desde 50 hasta 200 mM de cada uno de ellos.

La gran estabilidad del biocatalizador asociada a la baja inhibición verificada en los experimentos donde se emplearon los productos de la reacción como sacarosa, glucosa, galactosa y la combinación de la glucosa con la galactosa, sugieren su aplicabilidad en el proceso industrial. Con la sacarosa no se detectó ningún tipo de inhibición con las mismas concentraciones empleadas y a distintos pH.

De acuerdo a las inhibiciones realizadas con glucosa y galactosa son del tipo no competitivo, por los resultados encontrados.

4.8.2. Hidrólisis de rafinosa y melibiosa

La actividad alfa-galactosidasa se ha determinado usando oligosacáridos como sustratos (disacárido melibiosa y el trisacárido rafinosa). En esta Tesis estudiamos la hidrólisis de azúcares como la melibiosa y la rafinosa, normalmente usadas en el procesamiento de soja, alimentos para animales a base de soja y suplementos dietéticos.



Las alfa-galactosidasas catalizan la hidrólisis de enlaces 1-6 de residuos alfa-galactósidos de oligosacáridos tipo melibiosa (galactosa-1,6-alfa-glucosa), rafinosa (galactosa-1,6-alfa-sacarosa) y estaquiosa (galactosa-alfa-rafinosa) Margolles-Clark y col., (1998).

Esquema 1.- Hidrólisis de los oligosacáridos de estudio: Melibiosa (galactosa y glucosa); rafinosa (sacarosa y galactosa).

4.8.3.- Síntesis de galactooligosacáridos (GOS)

Como se ha comentado en la Introducción y en los Objetivos de esta Tesis Doctoral, las alfa-galactosidasas tienen un especial interés en Tecnología de Alimentos, ya sea para la producción de hidrolizados de alfa-galactósidos, como por ejemplo, rafinosa, melibiosa y otros, en alimentos de origen vegetal, como también en reacciones de síntesis de compuestos con gran valor añadido, como son los galacto-oligosacáridos (GOS), como se ilustra en la Figura 39.

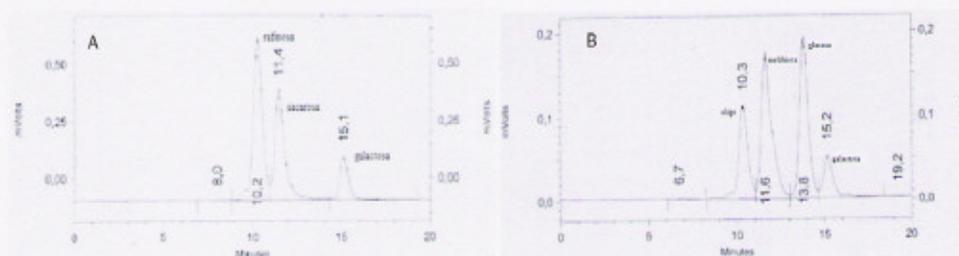


Figura 39.- Cromatogramas del análisis por HPLC: (A) Reacción de hidrólisis de rafinosa catalizada por el derivado MANAE-glutaraldehído 1%. (B) Reacción de hidrólisis de melibiosa catalizada por el derivado PEI-glutaraldehído.

Se compararon los rendimientos tanto de síntesis como de hidrólisis, usando como sustratos rafinosa y melibiosa variando la temperatura de reacción con el pH 5 y 7. A pH 7 y 50 °C los mejores rendimientos de hidrólisis fueron obtenidos cuando se utilizó la enzima en forma soluble, y en cambio en estas mismas condiciones, los mayores rendimientos de hidrólisis se consiguieron con el derivado MANAE-agarosa entrecruzado con glutaraldehído al 1%.

Este comportamiento fue observado cuando la reacción tuvo lugar a pH 5 y 50 °C, aunque los valores porcentuales de síntesis fueron mucho menores en estas condiciones (un 40 % menos en el rendimiento de GOS). En cambio se estudió que el derivado PEI-glutaraldehído, comparado con la enzima soluble. Se obtuvieron casi los mismos rendimientos de síntesis para el derivado que

para la enzima soluble, así como los valores porcentuales de hidrólisis que fueron muy parecidos, como se pueden ver en las figuras siguientes:

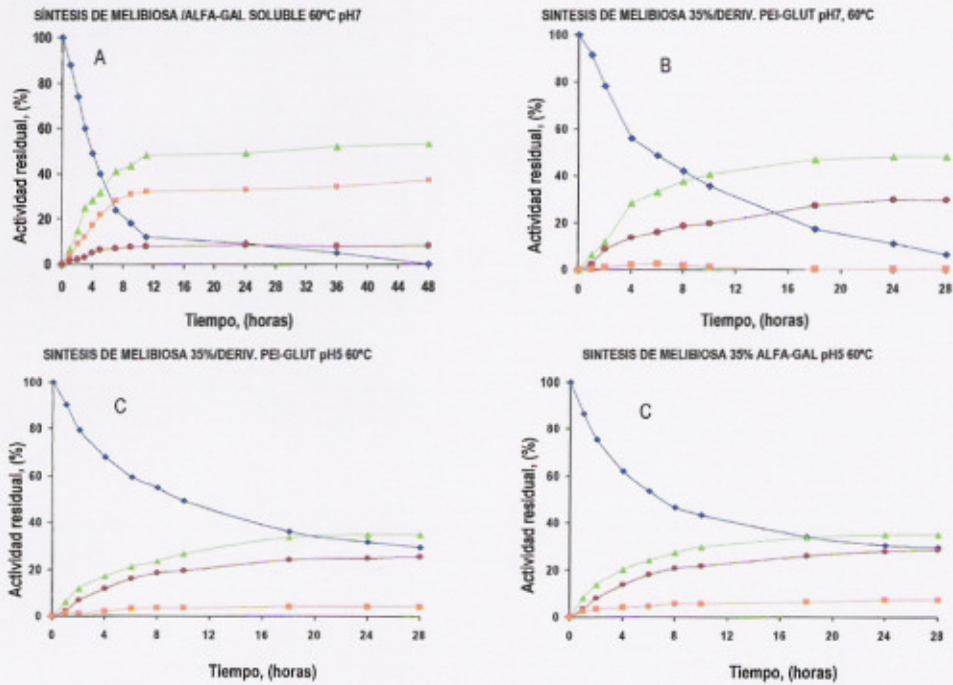


Figura 40 (A, B, C y D).- Cursos de las reacciones de hidrólisis de rafinosa y melibiosa catalizadas por la enzima soluble, derivados MANAE-glutaraldehído y PEI-glutaraldehído, en condiciones diversas de temperatura y pH. (◆) melibiososa, (■) galactosa, (▲) glucosa, (■) oligo

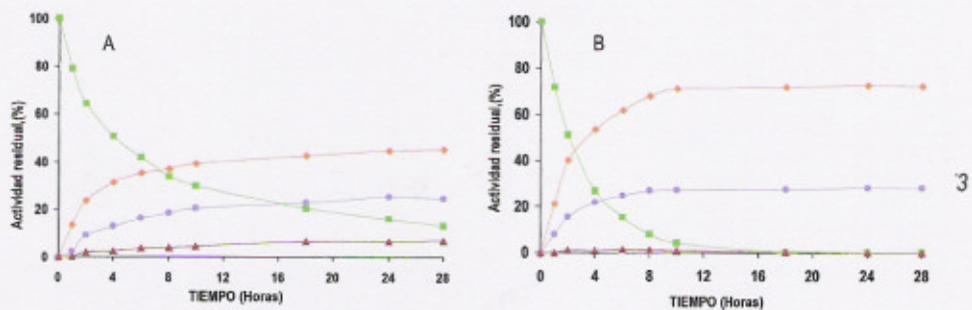


Figura 41 (A, B).- Cursos de las reacciones de hidrólisis de rafinosa y melibiosa catalizadas por la enzima soluble, y derivados MANAE-glutaraldehído y PEI-glutaraldehído. pH 7, 60°C (■) rafinosa, (■) galactosa, (◆) sacarosa, (▲)oligo

Se han estudiado reacciones de hidrólisis de rafinosa y melibiosa tanto con la enzima en disolución y las correspondientes preparaciones inmovilizadas. La enzima es preferentemente sensible a las reacciones de hidrólisis cuando se ha usado rafinosa como sustrato, mientras que los mayores rendimientos de síntesis se han obtenido cuando usamos melibiosa como sustrato.

5. DISCUSIÓN

1.- Producción de la enzima recombinante

La estrategia para el clonaje e hiper-expresión del gen que codificaba para la enzima alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 en *Escherichia coli* M2508 ha sido un éxito, lográndose la producción de más de 300 U de actividad por L de cultivo frente a las 85 U/L obtenidos con la cepa control pOS105. La proteína se expresaba sin formar cuerpos de inclusión y llegaba a nivel de sobreproducción que permitían que más del 4% del total de proteínas del hospedador fuera la enzima deseada, manteniendo la actividad y estabilidad de la enzima nativa.

2.- Purificación de la alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2.

El primer elemento diferenciador entre la alfa-galactosidasa y la mayoría de las proteínas del hospedador (*E.coli* MC2805) era su resistencia al calor y por ello un primer paso de purificación consistió en un tratamiento térmico que mantenía inalterada nuestra enzima recombinante termorresistente y provocaba la agregación de un porcentaje considerable de proteínas del hospedador (y prácticamente eliminaba todas las proteínas de *E.coli* de muy elevado peso molecular, fundamentalmente proteínas multiméricas). Como resultado de este primer paso obteníamos una mezcla de proteínas (factor de purificación alrededor de 3) donde la única proteína de elevado peso molecular era la proteína recombinante termorresistente.

En estas condiciones el segundo elemento diferenciador entre nuestra alfa-galactosidasa y el resto de las proteínas del extracto era su elevado peso molecular. La alfa-galactosidasa de *Thermus sp.* T2 tiene un peso molecular superior a 53.000 dalton y probablemente se podría adsorber selectivamente sobre soportes de intercambio aniónico con muy baja densidad de grupos intercambiadores. Efectivamente encontramos que únicamente la proteína recombinante se adsorbía a soportes conteniendo 2 μ moles de aminos ionizados por ml de gel y de este modo podíamos purificar la proteína recombinante totalmente (aparición de una única banda en electroforesis SDS-PAGE) con un rendimiento del más del 80%, con una actividad específica unas 25 veces mayor que en el estrato crudo y según unos protocolos de purificación fácilmente escalables a nivel industrial.

3.- Caracterización previa de la alfa-galactosidasa de *Thermus* sp. T2

Una vez obtenida la enzima pura, estudiamos su actividad hacia derivados de muchos azúcares. Las mejores actividades (más de 500 veces mayores que todas las demás) las obtuvimos con el p-nitrofeil derivado de alfa-D-galactopiranosido. De este modo parece que efectivamente esta enzima es una alfa-galactosidasa muy específica. También estudiamos las curvas actividad pH (la enzima tenía un máximo alrededor de 7.0 pero era muy activa en el intervalo de pH 5-9) y las inactivaciones térmicas a diferentes pHs y temperaturas (pH 5, 7 y 9) y temperaturas comprendidas entre 50 y 70°C. La enzima era térmicamente muy estable (p.e., tenía una vida media de 1 hora cuando se inactivaba a 70 °C y pH 7).

4.- Inmovilización reversible.

Dado que la enzima soluble era muy estable evaluamos las posibilidades de inmovilización reversible ya que ahora no sería estrictamente necesario que estas técnicas de inmovilización fueran muy estabilizantes. Estos derivados si que podrían ser útiles sobre todo para reacciones de síntesis de aditivos alimentarios (sin estar las enzimas no estabilizadas en contacto directo con los alimentos).

Utilizando geles de agarosa recubiertos de PEI (polímero policatiónico) logramos inmovilizar la enzima muy rápidamente (recubrimiento total del soporte con enzima en menos de 1 hora) y además conservando el 100% de la actividad catalítica correspondiente a la enzima soluble. Además la adsorción de la enzima era muy intensa (más del 40 % de la enzima continuaba adsorbida al soporte cuando se incubaba en presencia de 800 mM de NaCl). Los derivados inmovilizados resultaron ser 100 veces más estables que la enzima soluble en experimentos de inactivación térmica a pH 7.0. En principio el método de inmovilización puede considerarse casi ideal: el soporte activado es muy estable, la inmovilización es muy rápida, la recuperación de actividad es máxima y además de partir de una enzima muy estable lográbamos aumentar todavía más su estabilidad. Incluso, una vez inactivada la enzima esta se puede desorber del soporte y el soporte se puede reutilizar adsorbiendo una nueva cantidad de enzima activa. Es decir hemos desarrollado un método de inmovilización-estabilización de una enzima termorresistente que resulta muy sencillo, muy barato y muy eficiente. Lógicamente la interacción iónica multipuntual entre la

película polimérica de PEI y una proteína de muy elevado peso molecular debe provocar unas adsorciones realmente intensísimas y así no precisamos la inmovilización covalente para lograr una inmovilización realmente muy estable. Desde luego el método parece ser el ideal para procesos de química sintética (síntesis de oligosacaridos que se purifican posteriormente) y tenemos aun la duda de su utilidad en química de alimentos ya que tendremos que estudiar la posible alergenicidad de las subunidades de la enzima (que al no estar fijadas covalentemente) podrían liberarse aunque fuera en cantidades mínimas al alimento que estamos modificando.

5.- Inmovilización covalente multipuntual

A pesar de los buenos resultados obtenidos para la inmovilización reversible estudiamos también la unión covalente sobre soportes altamente activados para ver si conseguíamos estabilizaciones adicionales por inmovilización covalente multipuntual. Utilizamos diferentes soportes para inmovilizar la enzimas: soportes activados con bromocianógeno que inmovilizaban la enzima a través de sus grupos amino más reactivos, soportes activados con grupos glioxil que inmovilizaban la enzima por las regiones más ricas en residuos lisina y soportes glutaraldehido que inmovilizaban en primer lugar la enzima por adsorción iónica (sobre los grupos amino secundarios a los que se ha unido el glutaraldehido) a través de las regiones de la enzima con mayor densidad en cargas negativas (residuos Asp y GLu) y posteriormente fijaban covalentemente la enzima por reacción de los grupos aldehido del soporte y los grupos amino presentes en la región de la enzima que había participado en el proceso de adsorción. En todos los casos se observaron inmovilizaciones muy rápidas, elevada recuperaciones de actividad y los derivados resultantes eran más estables que la enzima soluble. Los mejores derivados (más estables incluso que los obtenidos por inmovilización reversible) eran los derivados obtenidos sobre soportes activados con glutaraldehido. Por ellos intentamos optimizar esta inmovilización estudiando diferentes estrategias previamente desarrolladas en nuestro laboratorio (pe., adición de glutaraldehido soluble sobre enzimas previamente adsorbidas sobre soportes amino). También evaluamos la influencia de la concentración de los grupos amino del soporte sobre la actividad-estabilidad final de los derivados. La adsorción de la enzima a geles amino muy activados y el posterior tratamiento con una disolución 1% de glutaraldehido nos permite preparar derivados que conservan el 80% de la actividad catalítica y son más de 500 veces más estables que la enzima soluble. Además las curvas de inactivación son

claramente bifásicas y finalmente obtenemos un 50-60% de la actividad enzimática que resulta extraordinariamente estable. Estos resultados sugieren que estamos consiguiendo una intensa inmovilización covalente multipuntual (los derivados más estables se conseguían con los soportes más activados). Comparados con los métodos glutaraldehído convencionales, la adición posterior del glutaraldehído puede favorecer la inmovilización multipuntual (entrecruzamiento entre grupos amino de la enzima y los grupos amino del soporte) pero provoca también la modificación química de todos los grupos amino de la enzima y esto podría tener efectos desfavorables.

6.- Estabilización de la estructura cuaternaria

Para optimizar la estrategia de estabilización de la estructura multimérica de la enzima elegimos el entrecruzamiento de la enzima inmovilizada con dextrano aldehído. Para ponerlos a punto, elegimos el método de inmovilización menos estabilizante (agarosa-BrCN), que se incubaba con dextrano aldehído de 71 KDa. Las electroforesis muestran la enzima pura, la enzima inmovilizada en agarosa-BrCN sin tratar (libera algunas subunidades como se aprecia por la presencia de una banda de proteína que coincide con el monómero de la alfa-galactosidasa) y el derivado BrCN tratado con dextrano aldehído. Este último derivado ya no libera ninguna proteína tras el tratamiento a 100°C en presencia de SDS, lo que sugiere que todas las subunidades están unidas a soportes o entrecruzadas con una que sí lo está.

Estudiamos la estabilidad de los derivados a diferentes valores de pH y observamos que a pH 5 y 7 la estabilidad apenas variaba con la concentración de la enzima inmovilizada o diluida. Sin embargo, a pH 9 la inactivación térmica tanto de la enzima libre como de la enzima inmovilizada sobre agarosa-BrCN depende de la concentración de la enzima. Los derivados entrecruzados ya no dependen de la dilución incluso a pH 9. De esta forma, a este pH y cuando están muy diluidos (muy parecido a las condiciones industriales) son todavía mucho más estables que la enzima soluble. Además de estos efectos estabilizantes, la estabilización completa de la estructura hexamérica de la enzima impide la liberación incluso de pequeñas trazas de proteína al alimento, con lo que estos derivados resultan especialmente útiles para tecnología de alimentos: enzimas recombinantes poco o nada alergénicas expresadas en hospedadores GRAS y estabilizadas completamente (unión covalente sobre el soporte más el entrecruzamiento covalente de subunidades) modifican el alimento

como nosotros deseamos sin contaminarlo con ningún componente de la enzima empleada. De esta forma, podríamos conseguir una química completamente limpia del alimento.

7.- Purificación, inmovilización y estabilización de la alfa-galactosidasa en un solo paso

Las reacciones de química de alimentos deben ser muy sencillas, ya que implica grandes volúmenes de productos muy útiles pero no de gran valor añadido. Por ello si se desarrollan estrategias que permitan en un solo paso purificar, inmovilizar y estabilizar la enzima de interés en un solo paso habremos simplificado enormemente el proceso de preparación del biocatalizador, abaratando precios y acercándolo a los requerimientos industriales.

Para conseguir esto, utilizamos un método de inmovilización que tan solo fije la proteína al soporte cuando se formen múltiples uniones. Utilizando soportes muy activados (para que la fuerza de adsorción final sea muy fuerte) que presenten grandes superficies, y realizando la adsorción en condiciones poco favorables intentamos conseguir la purificación-inmovilización y estabilización de enzimas de gran tamaño, por su capacidad de establecer una gran número de enlaces con el soporte frente a proteínas pequeñas que no tuvieran esta posibilidad. Como soporte elegimos soportes activados con quelatos metálicos, ya que muy pocas proteínas naturales presentarían zonas con elevada densidad de His (otra posibilidad de que estas adsorciones se produzcan incluso en condiciones desfavorables) realizando la inmovilización a elevadas concentraciones de imidazol para dificultar la adsorción. Elegimos la concentración de imidazol más elevada que permitía la adsorción de nuestra proteína modelo, y extractos de nuestra proteína sometidos a un tratamiento térmico, donde nuestra enzima era la mayor proteína soluble. De esta forma conseguimos, la purificación por adsorción (inmovilización reversible selectiva) de proteínas grandes. Los derivados obtenidos resultaron más estables que la enzima soluble.

Esta estrategia se revela como un método casi ideal de inmovilizar enzimas grandes de termófilos clonadas en un mesófilo, ya que en una sola etapa podemos purificar-inmovilizar y estabilizar la enzima utilizando un método reversible, que permite que tras la inactivación de la enzima se pueda reutilizar el soporte para inmovilizar una nueva carga de enzima.

8.- Reacciones de hidrólisis y de transglucosilación

Uno de los usos principales de estos derivados sería la hidrólisis de leche de soja para eliminar restos de rafinosa y melibiosa que pudieran tener efectos negativos. Al ser un alimento líquido, es posible utilizar en este tipo de reacciones derivados de enzimas inmovilizadas sobre soportes porosos como los desarrollados en esta Tesis Doctoral. Ni la enzima soluble ni los derivados inmovilizados mostraban una inhibición significativa por los posibles productos de la reacción, como la alfa-galactosa, sacarosa o glucosa, con constantes de inhibición del orden de molar. Esto permitía cursos de reacción muy lineales que permitían la hidrólisis total de los compuestos diana.

En la hidrólisis de melibiosa se apreciaba la aparición de productos resultados de reacciones de transglucosilación, en el caso de la enzima soluble estos picos eran muy minoritarios mientras que utilizando algunos derivados inmovilizados se llegaba a unos rendimientos de producción mucho mayores (en torno al 40%). Estos oligosacáridos forman parte de un 40 % de posibles aditivos funcionales de alimentos según aparece descrito en la literatura de patentes.

De esta forma, esta tesis ha realizado un abordaje sumamente pluri y multidisciplinar que ha permitido el diseño de catalizadores de enzimas complejas (hexaméricas de elevado peso molecular) con una gran actividad y estabilidad que podrían ser útiles para las reacciones de hidrólisis o síntesis de alfa-galactósidos en derivados de leguminosas, cada día más relevantes para una buena nutrición humana.

6. CONCLUSIONES

A modo de resumen de la presente Tesis Doctoral quisiéramos resaltar las siguientes conclusiones:

- 1.- La alfa-galactosidasa de *Thermus sp. T2* fue super-expresada en el hospedador *E.coli MC2508* obteniéndose la forma activa de la enzima constituyendo un 10% del total de a proteína producida por el hospedador recombinante.
- 2.- La enzima era específica hacia alfa-D-galactopiranosidos, era muy estable a temperaturas comprendidas entre 50 y 70°C y era muy activa y estable en un amplio rango de pHs (entre 5 y 9).
- 3.- Se diseñó un protocolo original y muy sencillo de purificación de la enzima recombinante termoestable y de muy gran tamaño (6 subunidades de 53.500 dalton). Por un lado la enzima era resistente al tratamiento por calor y por otro la enzima se adsorbía selectivamente sobre soportes de intercambio aniónico muy poco activados. Entre los dos procesos lográbamos una enzima homogéneamente pura (electroforesis SDS-PAGE) con un rendimiento del 80% de la actividad catalítica.
- 4.- La enzima se podía inmovilizar reversiblemente por adsorción sobre intercambiadores aniónicos y catiónicos. Los mejores resultados se obtuvieron con intercambiadores aniónicos poliméricos (geles de agarosa recubiertos de polietilenimina). La enzima se inmovilizaba muy rápidamente (en menos de una hora), conservaba el 100% de actividad catalítica y no se desorbía completamente del soporte ni siquiera a 800 mM de NaCl. Estos derivados eran además mucho más estables que la enzima soluble (100 veces más estables en experimentos de inactivación térmica a pH 7.0)
- 5.- La enzima se inmovilizó covalentemente sobre diferentes soportes altamente activados. Los mejores resultados de actividad y estabilidad se obtuvieron con soportes activados con glutaraldehído. Mejores resultados se obtuvieron todavía cuando la enzima se adsorbía iónicamente sobre soportes conteniendo una alta concentración de grupos amino primarios y posteriormente se trataba con una disolución al 1% en glutaraldehído. Estos derivados eran 500 veces más estables que la enzima soluble termostable.
- 6.- Los derivados de la enzima unidos covalentemente a diferentes soportes (p.e., agarosa activada con BrCN) liberaban parte de sus 6 subunidades cuando se incubaban con SDS. En principio es muy difícil estabilizar una enzima hexamérica sobre la superficie plana de un soporte. Sin embargo el tratamiento de la enzima inmovilizada con dextrano aldehído estabilizaba completamente la estructura cuaternaria de los derivados impidiendo la liberación de cualquier subunidad de la enzima cuando se utiliza en tecnología de alimentos.
- 7.- Se desarrollo una estrategia original de purificación, inmovilización reversible y estabilización de la enzima. La enzima de gran tamaño molecular se adsorbía sobre soportes altamente activados con grupos quelato en presencia de altas concentraciones de imidazol. Posteriormente se eliminaba el imidazol y el derivado resultante era mucho más estable que la enzima soluble.

Conclusiones

8.- La enzima soluble y los mejores derivados apenas se inhibían por alfa-D-galactosa y por los demás productos de los reacciones de hidrólisis (glucosa o sacarosa). . Por ello podíamos hidrolizar completamente (sin inhibiciones) altas concentraciones de rafinosa y melibiosa

9.- Los mejores derivados inmovilizados eran capaces de catalizar reacciones de transglucosilación utilizando melibiosa como sustrato. Llegamos a obtener hasta un 40 % de productos de síntesis.

BIBLIOGRAFIA

- Ajisaka, K.; Fujimoto, H. y Nishida, H. (1988): Enzymic sintesis of disaccharides by use of the reversed hydrolysis activity of beta-D-galactosidasas. *Carbohyd. Res.* 180, 35-42
- Alvarez-macarie, E.; Augier-Magro, V. y Baratti, J. (1999): Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1865-1870.
- Andersson, M. M. y Hatti-Kaul, R. (1999): Protein stabilising effect of polyethylenimine. *J. Biotechnol.* 72, 21-31.
- Anspach, F.B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G. y Deckwer, W-D. (1999): Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *J. Chromatogr. A.* 865, 129-144.
- Armisen, P. (1997): Nuevos métodos de caracterización y activación de geles agarosa como soporte para la inmovilización de proteínas de interés industrial. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Attwood, P. V. y Geeves, M. A. (2002): Changes in catalytic activity and association state of pyruvate carboxylase wich are dependent on enzyme concentration. *Arch. Biochem. Biophys.* 401, 63-72.
- Bailon, M-L; Tzortzis, G.; Rastal, R. y Gibson G. R. (2004): Food product and process for their preparation by enzymatic galactosyltransfer with lactobacillus alpha-galactosidase. Patente europea: WO2004GB00627 20040218
- Battaner, E. (1998): *Biomacromoléculas*. Ediciones de la Universidad de Salamanca. Salamanca.
- Bauer, M.; Driskil, L.; Callen, W.; Snead, M.; Mathur, E. y Kelly, R. (1999): An endoglucanase EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes a-1,4 bonds in mixed linkage (1-3), (1-4)- β -D-glucans and cellulose. *J. Bacteriol.* 181, 284-290.
- Baumeister, A.; Vogelmann, S. y Fischer, L. (2003): Concentration and purification of orotic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system. *J. Chromatogr. A.* 1006, 261-265.
- Beitle, R.R.; Atai, M.M. (1997): Use of divalentmetal ions chelated to agarose derivatives for reversible immobilization of proteins. En: *immobilization of enzymes and cells. Methods in Biotechnologies 1.* (Ed Bickerstaff, G.F.) Humana Press (Torowa): 339-343.
- Berger, J.L. y Lacroix, C. (1995): Identification of new enzyme activities of several strains of *thermus* species *Appl. Microbiol. Biot.* 45, 81-87.
- Bertoldo, C.; Duffner, F.; Jorgensen, P. y Antrakianin, G. (1999): Pullulanase type I from *Ferividobacterium pennavorans* Ven5: cloning, sequencing, expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2084-2091.
- Bibel, M.; Bretel, C.; Gossler, U.; Kriegshauser, G. y Liebl, W. (1998): Isolation and analysis of genes for amylolyticenzymes of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiol. Lett.* 158, 9-15.

Bibliografía

- Bilkova, Z.; Mazurova, J.; Churacek, J.; Horak, D. y Turkova, J. (1999): Oriented immobilization of chymotrypsin by use of suitable antibodies coupled to a nonporous solid support. *J. Chromatogr. A.* 852, 141-149.
- Blanco, R. M. y Guisán, J. M. (1989): Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohidride reduction of trypsin derivatives. *Enzyme Microb. Tech.* 11, 360-366.
- Blattner, F.R. y Plunket III, G. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brena, B. M.; Ryden, L. G. y Porath, J. (1994): Immobilization of galactosidase on metal-chelate substituted gels. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19, 217-231.
- BRENDA. The comprehensive enzyme information system.
http://www.brenda.unikoeln.de/php/result_flat.php4?ecno=1.1.3.4
- Bruins, M. E.; Janssen, A. E. y Boom, R. M. (2001): Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl. Biochem. Biotech.* 90, 155-186.
- Blöchl, A.; Peterbauer, T.; Richter A. (2007): Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *Journ. of Plant Physiol.* **In Press**.
- Bryak, J. (1995): Storage stabilization of enzyme activity by poly (ethylene-imine). *Bioproc. Eng.* 1, 177-181.
- Caballe, D. Y Combes, D. (1995): Characterization of β -galactosidases from *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Biochem.* 22, 55-64.
- Chen, J.; Annie B.; Lapadat-Tapolsky, M.; Blanquet, S. y Plateau, P. (1994): Properties of the Lysyl-Trna synthetase gene and product from the extreme thermophile. *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 176, 2699-2705.
- Chibata, I. Y. y Tosa, T. (1976): Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells* en: *Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol 1. Immobilized Enzyme Principles.*(ED) Wingard, Katchalski-Katzir and Goldstein. Acad. Press, London, 239-360.
- Chong, S. R.; Merscha, F. B.; Comb, D. G.; Scott, M. E.; Landry, D.; Vence, L. M.; Perler, F. B.; Benner, J.; Kucera, R. B.; Hirvonen, C. A.; Pelletier, J. J.; Paulus, H.; y Xu, M. Q. (1997): Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene.* 192, 271-281.
- Chu, F.K.; Watorek, W. y Maley, F. (1983): Factors affecting the oligomeric structure of yeast external invertase. *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 543-555.
- Clemmit, Rh. y Chase, H. (2000): Immobilised metal affinity chromatography of beta-galactosidase from unclarified *Escherichia coli* homogenates using expanded bed adsorption. *J. Chromatogr. A.* 874, 27-43.
- Coolbear, T.; Daniel, R.M. y Morgan, H.W. (1992): The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources,

- thermostabilities and industrial relevance. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 45: 57-98.
- Coon, C.N.; Leske, K.L.; Akavanichan, O. y Cheng, T.K. (1990): Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. *Poultry sc.* 69, 787-793
- Curda, L.; Rudolfová, J.; Stetina, J. y Dryák, B. (2006): Dried buttermilk containing galactooligosaccharides—process layout and its verification. *Jour. of Food Engin.* 77, 468-471.
- Dabrowski, S.; Sobiewska, G.; Macińska, J.; Synowiecki, J. y Kur, J. (2000): Cloning, Expression, and Purification of the His₆-Tagged Thermostable beta-galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Protein Express. Purific.* 19, 107-112.
- Dey, P.M.; Patel, S. y Brownleader, M.D. (1993): Induction of alpha-galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) gum. *Appl. Biochem. Biotech.* 17, 361-371.
- Dong, G.; Vieille, C.; Savachenko, A. y Zeikus, G. (1997): Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3569-3576.
- Donkor, O. N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T. y Shah, N. P. (2007): α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chem.*, 104, 10-20.
- Everly, C. y Alberto, J. (2000): Stressors, stress and survival: overview. *Front. Biosci.* 5, 780-786.
- Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J. M. (1998): Enzyme and protein engineering via immobilization and post-immobilization techniques. *Recent Res. Devel. Biotech. Bioeng.* 1, 299-309.
- Fernández-Lafuente, R.; Hernández-Jústiz, O.; Mateo, C.; Terreni, M.; Fernández-Lorente, G.; Moreno, M. A.; Alonso, J.; García-López, J. L. y Guisán, J. M. (2001): Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin sintesis under dissociation conditions. *Biomacrom.* 2, 95-104.
- Fernández-Lafuente, R.; Rodríguez, V.; Mateo, C.; Penzol, G.; Hernández-Justiz, O.; Irazoqui, G.; Villarino, A.; Ovsejevi, K.; Batista, F. y Guisán, J.M. (1999): Stabilization of multimeric enzyme via immobilization and post-immobilization techniques. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 7, 181-189.
- Fitter, J.; Herrmann, R.; Hauss, T.; Lechner, R.E. y Dencher, N.A. (2001): Dynamical properties of alpha-amylase in the folded and unfolded state: the role of thermal equilibrium fluctuations for conformational entropy and protein stabilization. *Physica B: Condens. Matter.* 301, 1-7.
- Flamm, E.L. (1991): How FDA approved chymosin: a case history. *Bio/Technology* 9, 349-351.
- Fournier, C.; Leonard, M.; Le Coq-Leonard, I. y Dellacherie, E. (1995): Coating polystyrene particles by adsorption of hydrophobically modified dextran. *Langmuir.* 11, 2344-2347.

Bibliografía

- Frazier, R.A.; Matthijs, G.; Davies, M.C.; Roberts, C.J.; Schacht, E. y Tandler, S.J.B. (2000): Characterization of protein-resistant dextran monolayers. *Biomat.* 21, 957-966.
- Fridjonsson, O.; Watzlawick, H.; Gehweiler, A.; Rohrhirsch, T. y Mattes, R. (1999A): Cloning of the gene encoding a novel thermostable alpha-galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. *Appl. Environ. Microb.* 65, 3955-3963.
- Fridjonsson, O.; Watzlawick, H.; Gehweiler, A y Mattes, R. (1999B): Thermostable alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB 3621: Cloning, sequencing and characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 147-153.
- Fuentes, M.; Mateo, C.; García, L.; Tercero, J. C.; Guisán, J. M. y Fernández-Lafuente, R. (2004): Directed covalent immobilization of aminated DNA probes on aminated plates. *Biomacrom.* 5, 883-888.
- Fujimoto, Z.; Kaneko, S.; Momma, M.; Kobayashi H. y Mizuno, H. (2003): Crystal Structure of Rice α -Galactosidase Complexed with D-Galactose. *J. of Biol. Chem.* 22, 20313-20318.
- Gaur, R.; Pant, H.; Jain, R. y Khare, S.K. (2006): Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chem.* 97, 426-430
- Gdala, J., J.; Bach Knudsen, H.N.; Knap, K. E. y Wagner, I.H. (1997): The digestibility of carbohydrates, protein and fat in the small and large intestine of piglets fed non-supplemented and enzyme supplemented diets. *Animal Feed Sc. Techn.* 65,15-33
- Georgiou, G.; Valax, P. (2002): Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr.Opin. Biotechnol.* 7, 190-197.
- Ghazi, I.; Gómez De Segura, A.; Fernández-Arrojo, L.; Alcalde, M.; Yates, M.; Rojas-Cervantes, M. L.; Plou, F. J. y Ballesteros, A. (2005): Immobilization of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. *J. Molec. Catal. B: Enzym.* 35, 19-27.
- Gianfreda, L. y Scarfi, M. R., (1991): Enzyme stabilization: State of the art. *Mol. Cell. Biochem.* 109, 97-128.
- Gill, I. y Ballesteros, A. (1998): Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid gel sol polymers: An efficient and generic approach. *Journ. of Amer. Chem. Soc.* 120, 8587-8598.
- Golubev, A. M.; Nagem, R. A. P.; Brandão Neto, J. R.; Neustroev, K. N.; Eneyskaya, E. V.; Kulminkaya, A. A.; Shabalin, K. A.; Savelév, A. N. y Polikarpov I. (2004): Crystal Structure of α -Galactosidase from *Trichoderma reesei* and Its Complex with Galactose: Implications for Catalytic Mechanism. *J. Mol. Biol.* 339, 413-422
- Goulas, A.; Tzortzis, G. y Gibson, G. R. (2007): Development of a process for the production and purification of α and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Intern. Dairy Jour.* 17, 648-656

- Gote, M.M.; Khan, M.I.; Gokhale, D.V.; Bastawde, K.B. y Khire, J.M. (2006): Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). *Proc. Bioch.* 41, 1311-1317.
- Gote, M.M.; Umalkar, H.; Khan, I. y Khire, J. (2004): Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. *Process Biochem.* 39, 1723-1729.
- Guisán, J. M. (1988): Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enz. Microb. Technol.*, 10, 375-382.
- Guisán, J. M.; Alvaro, G.; Fernández-Lafuente, R.; Rossel, C. M.; García, J. L. y Tagliatti, A. (1993A): Stabilization of heterodimeric enzyme by multi-point covalent immobilization: penicilin G acylase from *Kluyvera cytophila*. *Biotechn. Bioeng.* 42, 455-464.
- Guisán, J. M.; Bastida, A.; Blanco, R. M.; y Fernández-Lafuente, R. (1997A): Immobilization of enzymes on glioxil-agarose: Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment. En: *Immobilization of enzymes and cells*, 1, 277-287. (Ed: Gordon, F.) Editorial: Bickerstaff. Humana. Press Inc. New Jersey.
- Guisán, J. M.; Blanco, R. M.; Fernández-Lafuente, R.; Rossel, C. M.; Álvaro, G. y Bastida, A. (1993): Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment on activated pre-existing supports. En: *protein Stability and Stabilization*. Ed. V:J:J: van den Tweel et al. Elsevier Sc. Publ., Ámsterdam. 55-62.
- Guisán, J. M.; Penzol, G.; Armisén, P.; Bastida, A.; Blanco, R. M.; Fernández-Lafuente, R.; y García-Junceda, E. (1997): Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates: reduction of steric problems. En: *Bickerstaff, G. F.(ED). Methods in Biotechnology 1, immobilization of enzymes and cells*. Humana press, Totowa, N.J. 261-276.
- Grazú, V.; Abián, O.; Mateo, C.; Batista-Viera, F.; Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J. M. (2003): Novel bifunctional epoxy-thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacrom.* 4, 1495-1501.
- Gupta, M.N. (1991): Thermostabilization of proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14, 1-11.
- Haki, G.D. y S.K. Rakshit (2003): Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Biores. Techn.* 89, 17-34.
- Hannibal-Friedrich, O.; Chun, M. y Semertz, M. (1980): Immobilization of galactosidase, albumin and globulin on epoxy-activated acrylic beads. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 157-75.
- Hartmeier, W. (1985): Immobilized biocatalysts-from simple to complex systems. *Trends in Biotechn.* 3, 149-153.
- Herbert, R. y Sharp, R. (1992): *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Chapman and Hall, NY.
- Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Dobeli, H.; Gentz, R.; y Stuber, D. (1988): Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnol.* 6, 1321-1325.
- Hochuli, E.; Döbeli, H.; y Schacher, A. (1987): New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing

- thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1883-1892.
- Kumar, A.; Galaev, I.; Y. y Mattiasson, B. (2000): Polymer displacement/shielding in protein chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 741, 103-113.
- Kumar, S.; Nussinov, R.; (2001): How do thermophilic proteins deal with heat? A review. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1216-1233
- Ladero, M.; Ruiz, G.; Pessela, B.C.C.; Vian A.; Santos, A. y Garcia-Ochoa, F. (2006): Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. *Biochem. Engin. J.* 31, 14-24
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lasa, Y. y Berenguer, J. (1993): Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microb.* 9, 77-89.
- Lasch, J. y Koelsch, R. (1978): Enzyme leakage and multipoint attachment of agarose-bound enzyme preparations. *Eur. J. Biochem.* 82, 181-6.
- Lehninger, A. L. (1982): *Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. Bioquímica. Segunda Edición. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
- Leske, K.L.; Jevne, C.J. y Coon, C.N. (1993): Effect of oligosaccharide additions on nitrogen-corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. *Poultry sc.* 72, 664-668.
- Lijeström, P. y Lijeström, P. (1987): Nucleotide sequence of the *melA* gene coding for alpha-galactosidase in *Escherichia coli* K-12. *Nucl. Ac. Res.* 15, 2213-2220.
- Li, Y.-M.; Liao, J.-L.; Zhang, R., Henriksson, H. y Hjertén, S. (1999): Continuous beds for microchromatography. Chromatofocusing and anion exchange chromatography. *Anal. Biochem.* 267, 121-124.
- López-Gallego, F.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Mateo, C.; Guisán, J. M. y Fernández-Lafuente, R. (2004): Optimization of an industrial biocatalysts of glutaryl acylase: Stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads. *J. Biotechnol.* 111, 219-227.
- Lucas, D.; Rabiller-Baudry, M.; Millesime, L.; Chaufer, B. y Daufin, G. (1998): Extraction of α -lactalbumin from whey protein concentrate with modified inorganic membranes. *J. Memb. Sci.* 148, 1-12.
- Luk, Y. Y.; Tingey, M. L.; Dickson, K. A.; Raines, R. T. y Abbott, N. L. (2004): Imaging the binding ability of proteins immobilized on surfaces with different orientations by using liquid crystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 9024-9032.
- Luonteri, E.; Tenkanen, M. y Vikari, L. (1998): Substrate specificities of *Penicillium simplicissimum* α -galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 192-198.
- Lyddiatt, A. (2002): Process chromatography: current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 95-103.
- Malmsten, M.; Lindman, B.; Holmberg, K. y Brink, C. (1991): Hydrophilization of polystyrene surfaces with

Bibliografía

ethy(hydroxyethyl)cellulose. *Langmuir*. 7, 2412-2414.

Marchant, R.E.; Yuan, S.; y Szakalas-Gratzl, G. (1994): Interaction of plasma proteins with a novel polysaccharide surfactant physisorbed to polyethylene. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 6, 549-564.

Margolles-Clark, E.; Tenkanen, M.; Luonteri, E. y Penttilä, M. (1996): Three alpha-galactosidases genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 240, 104-111.

Marshall, T. (1984): Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal. Biochem.* 136, 340-346.

Martinez-Villaluenga, C. y Gómez, R. (2007): Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *Intern. Dairy Jour.* 17, 116-122

Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Tam, A. y Daminati, M. (2002): Epoxy sephabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Progr.* 18, 629-634.

Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J. M. (2000A): Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Tech.* 26, 509-515.

Mateo, C.; Abián, O.; Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J. M. (2000B): Reversible enzyme immobilization via very strong and nondistorting ionic adsorption on support-

polyethyleneimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* 8, 98-105.

Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Benevides C.C. Pessela; Vián, A.; Carrascosa, AV.; García, J. L.; Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J. M. (2001): Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes. New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions. *J. Chromatogr. A.* 595, 97-106.

Matthews, B. W. (2005): The structure of *E. coli* β -galactosidase. *C. R. Biologies* 328, 549-556.

Melander, W. R.; Corradini, D. y Horvath, C. (1984): Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography. Application of solvophobic theory. *J. Chromatogr. A.* 137, 67-85.

Mi, S.; Meng, K.; Wang, Y.; Bai, Y.; Yuan, T.; Luo, H. y Yao, B. (2007): Molecular cloning and characterization of a novel α -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 1373-1380

Miller, J.H. (1972): *Experiment in Molecular Genetics*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Monsan, P. (1978): Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *J. Mol. Cat.* 3, 371-384.

Naczki, M.; Amarowicz, R. y Shahidi, F. (1997): Alpha-galactosides of sucrose in foods: Composition, flatulence-causing effects, and removal. *ACS Symp Ser.* 662 127-151

- Ó'Fágáin, C. (2003): Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme Microb. Tech.* 33, 137-149.
- Olempska-Beer, Z. S.; Merker, R. I.; Ditto, M. D. y DiNovi, M. J. (2006): Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory Toxic. Pharmac.* 45, 144-158.
- Osterberg, E.; Bergstrom, K. y Holmberg, K. (1993): Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces. *Colloids. Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 77, 159-169.
- Osterberg, E.; Bergstrom, K. y Holmberg, K. (1995): Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: comparison to PEG. *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 741-747.
- Paborski, L. R.; Dunn, K. E.; Gibbs C. S.; y Dougherty, J. P. (1996): A nichel chelate microtiter plate assay for six-Histidine-containing proteins. *Anal. Biochem.* 234, 60-65.
- Pennissi, E. (1997): In industry, extremophiles begin to make their mark. *Sc.* 27, 705-706.
- Pessela, B.C. C.; Fernández-Lafuente, R.; Fuentes, M.; Vián, A.; García, J. L.; Carrascosa, A. V.; Mateo, C. y Guisán, J. M. (2003): Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzyme Microb. Tech.* 32, 369-374.
- Pessela, B.C.C.; Mateo, C.; Filho, M.; Carrascosa, A. V.; Fernández-Lafuente, R. y Guisán, J.M. (2007): Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic α - and β -galactosidases. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 242-248.
- Pessela, B.C.C.; Fernández-Lafuente, R.; Torres, R.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Pessela, B.C.C.; Torres, R.; Fuentes, M.; Mateo, C.; Miguel Filho; Carrascosa, A.V.; Vian, A.; Guisán, J. M. y Fernandez-Lafuente, R. (2004): A simple strategy for the purification of large thermophilic proteins over-expressed in mesophilic microorganisms: Application to multimeric enzymes from *Thermus* sp. strain. T2. *Biotechn. Prog.* 20, 1507-1511.
- Piller, K.; Daniel, R.M. y Petach, H.H. (1996): Properties and stabilization of an extracellular alpha-galactosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermosoccus* strain AN1: enzyme activity at 130°C. *Bioch. Bioph. Acta*, 1292, 197-205.
- Poltorak, O.M.; Chukhary, E.S. y Torshin, I. Y. (1998): Dissociative thermal inactivation, stability and activity of oligomeric enzymes. *Biochem.-Moscow.* 63, 360-369.
- Poltorak, O.M.; Chukhary, E.S.; Atyaksheva, T.; Trevon, M. D. y Chaplin, M. F. (1999): Catalytic properties, stability and the structure of the conformational lock in the alkaline phosphatase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 7, 165-172.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, Y. y Belgrafe, G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598-599.

Bibliografía

- Rao, C. S. (2001): Purification of large proteins using ion-exchange membranes. *Process Biochem.* 37, 247-256.
- Reddy, A. V.; MacColl, R. y Maley, F. (1990): Effect of oligosaccharides on oligomeric structures of external, internal and deglycosylated invertase. *Biochem.* 29, 2482-2487.
- Regnier, F. E. (1984): High-performance ion-exchange chromatography. *Meth. Enzymol.* 104, 170-189.
- Rezessy-Szabó, J. M.; Nguyen, Q. D.; Hoschke, Á.; Braet, C.; Hajós, G. y Claeysens, M. (2007): A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. *Biochim. Bioph.* 1770, 55-62.
- Roberfroid, MB. (1999): Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *British J. Nutr.* 129, 1398-1410.
- Robinson, R.K. (1986): *Modern Dairy technology*. Vol. 1, *Advances in Milk processing*. Second edition. Editorial: CHAPMAN AND HALL.
- Rosevear, A. (1984): Immobilized biocatalysts – a critical review. *J. of Chem. Techn. Biotechn.* 34B, 127-150.
- Royer, G.P. (1980): Immobilized enzymes as catalyst. *Catal. Rev.* 22, 29-73.
- Saboto, D.; Nucci, R.; Rossi, M.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z. y Lakowicz, J. (1999): The β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 °C. *Biophys. Chem.* 81, 23-31.
- Saini, H. S. (1988): Extractability and evaluation of α -galactosides of sucrose in leguminous seeds. *Food Chem.* 28, 149-157.
- Saleemmeddin, M. (1999): Bioaffinity based immobilization of enzymes. *Adv. of Biochem. Engin. and Biotechn.* 64, 203-226.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold. Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sarikaya, E.; Higassa, T.; Adachi, M. y Mikami, B. (2000): Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Proc. Biochem.* 35, 711-715.
- Satosi, H.; Seigo, O.; Kenji, T.; Kazuhisa, K.; Tetsuo, K.; Toshiaki, K. y Hitosi, K. (2001): Chemo-enzymatic synthesis of 3-(2-naphthyl)-L-alanine by an amino transferase from the extreme thermophiles *Thermococcus profundus*. *Biotechnol. Lett.* 23, 589-591.
- Schaffer, A.; Hashmonaim, I.; Zhifang; G. (2003): Plant-derived alkaline α -galactosidas. *Patente EEUU.* 6,607,901
- Schmidt, C.; Sztajer, H.; Stocklein, W.; Menge, U. y Schmid, R. (1994): Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatelnulatus*. *Biochem. Biophys. Acta* 1214, 43-53.
- Schmitt, R. (1968): Analysis of melibiose mutants deficient in α -galactosidase and thiomethylgalactoside permease II in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 96, 462-71.

- Scopes, R. K. (1987): *Protein Purification: Principales and Prattice*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.
- Scouten, W.H. (1983): *Immobilized enzymes, solid phase biochemistry*. John Wiley and Sons, New York.
- Shankar, S.K. y Mulimani, V.H.(2007): α -galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Biores. Techn.* 98,958-961
- Shibuya, H.; Kobayashi, H.; Sato, T.; Kim, W-S.; Yoshida, W.; Kaneko, S.; Kasamo, K.; Kusakabe, I. (1997): Purification, characterization and cDNA cloning of a novel α -galactosidase from *Mortirella vinacea*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 61, 592-598.
- Smalla, K.; Turkova, J.; Coupek, J. y Hermann, P. (1988): Influence of salts on the covalent immobilization of proteins to modified copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with ethylene dimethacrylate. *Biotechn. Appl. Bioc.* 10, 21-31.
- Shankar, S.K. y Mulimani, V.H. (2007): α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Biores. Techn.* 98, 958–961.
- Shijun, M.; Kun, M.; Yaru, W.; Yingguo, B.; Tiezheng, Y.; Huiying L. y Bin, Y. (2007): Molecular cloning and characterization of a novel α -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Techn.* 40,1373-1380
- Simerská, P.; Kuzma, M.; Monti, D.; Riva, S.; Macková, M. y K'ren, V. (2006): Unique transglycosylation potential of extracellular α -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 39, 128–134
- Søndergaard, H. A.; Grunert, K. G. y Scholderer, J. (2005): Consumer attitudes to enzymes in food production. *Trends in Food Sc. Techn.* 16, 466–474.
- Sun, S.; Yue, Y.; Huang, X. y Meng, D. (2003): Protein adsorption on blood-contact membranes. *J. Memb. Sci.* 222, 3-18.
- Swank, R.T. y Munkres, K. D. (1971): Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* 39, 462-477.
- Takahashi, S.; Nishino, T. y Koyama, T. (2003): Isolation and expression of *Paracoccus denitrificans* decaprenyl diphosphate synthase gene for purification of ubiquinone-10 in *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* 16, 183-190.
- Taylor, R. (1991): *Protein Immobilization. Fundamentals and Applications*. Marcel Dekker, New York.
- Thippeswamy, S. y Mulimani, V.M. (2002): Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochem.* 38, 635-640.
- Tischer, W. y Kasche, V. (1999): Immobilized Enzymes: crystals or carriers? *Trends in Biotechn.* 17, 26-335.
- Treviño, J.; Centeno, C.; Brenes, A.; Yuste, P. y Rubio, L. (1990): Effect of dietary oligosaccharides on the digestion of pea starch by growing chicks. *Animal Feed Sc. Techn.* 30, 313-319
- Van Alstine, J.M.; Burns, N.I.; Riggs, J.A.; Holmberg, K. y Harris, J.M. (1993): Electrokinetic characterization of hydrophilic

Bibliografía

polymer coating of biotechnical significance. Colloids surfaces A: Physicochem. Eng. 77, 149-158.

Van Beilen, J. B. y Li, Z. (2002): Enzyme technology: an overview. Curr. Opin. Biotech. 13, 338-344.

Velikodvorskaya, T.; Volkov, I.; Vasilenko, V.; Zverlov, V. y Pirusian, E. (1997): Purification and some properties of *Thermotoga neapolitana* thermostable xylanase B expressed in *E. coli* cells. Biochem. 62, 66-70.

Vián, A.; Carrascosa, A. V. y García-López, J. L. (2001): Un procedimiento para producción de alfa-galactosidasa recombinante de *Thermus* sp. T2 en células hospedantes. Patente española (ES 2 172380).

Viana, P. A.; Rezende, S. T.; Marques, V.M.; Trevizano, L.M.; Passos, F. M.L.; Oliveira, M. G. A.; Bemquerer, M. P.; Oliveira, J. S.; Guimarães, V. M. (2006): Extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. Agric. And food chemi., 54, 2385-2391

Viana, P. A.; Rezende, S. T.; Falkoski, D. L.; Leite, T. A.; José I. C.; Moreira, M. A. y Guimarães, V. M. (2007): Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidasas. Food Chem. 103, 331-337.

Vieira, J. y Messing, J. (1982): The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 9, 259-268.

Volkl, P.; Stetter, K.; Miller, J. (1995): The sequence of a subtilin-type protease (aerolysin) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* reveals sites important to thermostability. Protein Sci. 3, 1329-1340.

Weaver, L. E. y Carta, G. (1996): Protein adsorption on cation exchangers: Comparison of macroporous and gel-composite media. Biotechnol. Progr. 12, 342-355.

Wheatley, J. B. y Schmidt, D. E. (1999): Salt induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. J. Chromatogr. A. 849, 1-12.

Wilchek, M. y Miron, T. (2003): Oriented versus random protein immobilization. J. Biochem. Biophys. Methods. 55, 67-70.

Yamamoto, S. Nakanishi, K. and Matsuno, R. (1988): Ion-exchange Chromatography of proteins near the isoelectric points. J. Chromatogr. A. 852, 31-36.

Yamane, T. (1971): Decomposition of raffinose by α -galactosidase. An enzymatic reaction applied in the factory-process in Japanese beet sugar factories. Sucr. Belge/Sugar Ind. Abstr. 90, 345-361.

Zaks, A. (2000): Industrial biocatalysis. Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 130-136.