



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

TESIS DE DOCTORADO

**“Desarrollo de metodologías alternativas de
purificación y concentración de alfa-
amilasa desde diversas fuentes naturales”**

Presentada por: *María Cecilia Porfiri*

Rosario, Argentina

Año 2.012

“Desarrollo de metodologías alternativas de purificación y concentración de alfa-amilasa desde diversas fuentes naturales”

María Cecilia Porfiri
Licenciada en Biotecnología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Fisicoquímica Aplicada a Bioseparación, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01 de Abril de 2.008 y 07 de noviembre de 2.012, bajo la dirección de la Dra. Diana Romanini y co-dirección de la Dra. Beatriz Farruggia.

Directora: Dra. Diana Romanini.....

Co-Directora: Dra. Beatriz Farruggia.....

Jurado.....

Jurado.....

Jurado.....

Defendida:

Porque con sus vidas nos enseñan a vivir

A mis abuelos...

AGRADECIMIENTOS

Cada final implica una experiencia vivida y un futuro que se hace presente.

Aunque de cada etapa en mi vida me llevo un aprendizaje nuevo, todas están marcadas por personas que dejaron huellas e hicieron que hoy sea la persona que soy. Es por esto que en estos breves párrafos trato de plasmar mi gratitud hacia ellas y lo más importante que me dejaron estos años.

Revisando los archivos de mi Tesis y no creyendo finalizar esta tarea tan dura... no puedo dejar de agradecer a Diana, por confiar en mí y demostrarme que delante de la profesional que me guió desde mi Tesina en las tareas científicas, hay una persona que me brindó amistad y contención. Gracias por recordarme en todo momento que los logros no son personales sino grupales. Siempre lo voy a tener presente. También a Bery, a quien debo mis agradecimientos por tenerme paciencia y ayudarme en la escritura; además de apoyarme en las tareas como co-directora, demostraste ser una persona comprensiva. Las dos hicieron posible este trabajo.

A mi familia, mamá, papá, Caro y Nico. Les dedico también este logro, sin ustedes no sería posible llegar hasta acá. A mis abuelas Ilda y Ñata, que con tanto amor y ternura me acompañaron desde mi más temprana edad. Porque son de quienes aprendí las cosas más importantes de la vida, los valores, la solidaridad. Me marcaron con su ejemplo. Los amo.

A Evelyn y Eliana "*brillantinas de la vida*", no alcanzan las palabras. Sol y Romi, gracias por la amistad y estar siempre presentes. Como ya sabemos, lo más importantes que nos llevamos de la Facu, mis amigas. Y a mis amistades de la vida, que a pesar de seguir distintos rumbos me alegran cada momento y están en mi corazón.

A mis amigos del Lab., en especial a Maru que tan reflejadas nos hemos sentido estos últimos años. Gracias por la amistad y el aguante.

A los integrantes del área Fisicoquímica, por hacer más amena la tarea diaria, el compañerismo y la buena predisposición cada vez que los necesité. Además de todas las personas que estuvieron presentes, quiero agradecer a Bibi, por ayudarme desde mis comienzos en docencia hasta la escritura final de Tesis. A Guillermo Picó, por brindarme su profesionalismo y permitirme crecer en mi carrera.

En especial... quiero decirte Fer que sos la persona que amo. Gracias por confiar en mí, entenderme, quererme, bancarme y proyectar un futuro juntos. Sin tu apoyo esta alegría que hoy siento no sería la misma. Me hacés muy feliz, *te amo!*

PRESENTACIONES A CONGRESOS, BECAS, PASANTÍAS Y PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos en revistas científicas:

- MARÍA C. PORFIRI; Beatriz Farruggia; Diana Romanini. “*Bioseparation of alpha-amylase by forming insoluble complexes with polyacrylate from a culture of Aspergillus oryzae grown in agricultural wastes*”. Separation and Purification Technology. Elsevier Science BV, (2.012), **92**, 11 - 16.
- MARÍA C. PORFIRI; Guillermo Picó; Diana Romanini; Beatriz Farruggia. “*Aspergillus oryzae alpha-amylase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems*”. International Journal of Biological Macromolecules, Elsevier Science BV, (2.011), **40**, 7 - 13.
- MARÍA C. PORFIRI; Guillermo Picó; Beatriz Farruggia; Diana Romanini. “*Insoluble complex formation between alpha-amylase from Aspergillus oryzae and polyacrylic acid of different molecular weight*”. Process Biochemistry, Elsevier Sci. Ltd., (2.010), **45**, 1753 - 1756.
- MARÍA C. PORFIRI; Mauricio J Braia; Beatriz M Farruggia, Guillermo A Picó, Diana Romanini. “*Precipitation with poly acrylic acid as a trypsin bioseparation strategy*”. Process Biochemistry, Elsevier, (2.009), **44**, 1046 - 1049.
- Mauricio Braia, MARÍA CECILIA PORFIRI, Beatriz Farruggia, Guillermo Picó y Diana Romanini. “*Complex formation between protein and poly vinyl sulfonate as a strategy of protein isolation*”. Journal of Chromatography B, (2.008), **873**, 139 - 143.

Capítulos de libro:

- Romaniani, Diana; Braia, Mauricio Javier y PORFIRI, MARÍA CECILIA. “*Applications of calorimetric techniques in the formation of protein-polyelectrolytes complexes*”. InTech, ISBN 980-953-307-111-9. En prensa.

PRESENTACIONES A CONGRESOS, BECAS, PASANTÍAS Y PUBLICACIONES

También se han presentados en los siguientes eventos Nacionales e Internacionales:

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Farruggia, Beatriz M.; Romanini, Diana. “*Obtención de alfa-amilasa por precipitación con poliacrilato a partir de un cultivo en batch de *Aspergillus oryzae**”. II Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. La Plata, 10 y 11 de mayo de 2.012.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Braia, Mauricio, Loureiro, Dana, Farruggia, Beatriz; Romanini, Diana. “*Bioseparation of Alpha-Amylase by Forming Insoluble Complexes with Polyacrylate From a Culture of *Aspergillus oryzae* Grown in Agricultural Wastes*”. 16th International Conference on BioPartitioning and Purification. Puerto Vallarta, Jalisco, MX, 18 al 22 de septiembre de 2.011.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; César Brinatti Antonio, Beatriz Farruggia, Watson Loh, Diana Romanini. “*Aspectos estructurales y funcionales de la interacción alfa-amilasa con el polielectrolito aniónico poliacrilato (PAA)*”. XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Córdoba, 3 al 6 de mayo de 2.011.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Picó, Guillermo; Farruggia, Beatriz M.; Romanini, Diana. “*Comparación de la eficiencia entre dos metodologías bioseparativas en el aislamiento de α -amilasa fúngica*”. I Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO). Noviembre de 2.010.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Farruggia, Beatriz; Romanini, Diana. “*Aislamiento de α -amilasa pancreática por medio de precipitación selectiva con poliacrilato. Efectos sobre la estabilidad de la enzima*”. XII Congreso y XXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2 y 3 de diciembre de 2.010. Libro de Resúmenes 2.010 de la Sociedad de Biología de Rosario. UNR Editora.

- Imelio, N., Marini, A., PORFIRI, M.C., Romanini, D. y Farruggia, B. “*Producción de lipasa y alfa-amilasa de origen fúngico en medios sólidos y su aislamiento con sistemas bifásicos acuosos*”. IV Jornada de Ciencia y Tecnología. Foro permanente de discusión de Ciencia y Tecnología. Secretaría de Ciencia y Técnica. UNR. Rosario, 16 de noviembre de 2.010.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Picó, Guillermo; Romanini, Diana y Farruggia, Beatriz. “*Proceso bioseparativo de alfa-amilasa fúngica utilizando sistemas bifásicos acuosos*”. XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 3

PRESENTACIONES A CONGRESOS, BECAS, PASANTÍAS Y PUBLICACIONES

y 4 de diciembre de 2.009. Libro de Resúmenes 2.009 de la Sociedad de Biología de Rosario. UNR Editora.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Picó, Guillermo A.; Farruggia, Beatriz M. y Romanini, Diana. “*Comparación de la eficiencia entre dos metodologías bioseparativas en el aislamiento de α -amilasa fúngica*”. I Congreso Latinoamericano, XII Congreso Argentino y X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. Buenos Aires, año 2.009.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Braia, Mauricio M.; Picó, Guillermo A.; Farruggia, Beatriz M. y Romanini, Diana. “*Diseño de una estrategia bioseparativa de alfa-amilasa fúngica por precipitación con poliacrilatos de diferentes pesos moleculares*”. XVII Congreso Argentino de Bioingeniería, VI Jornadas de Ingeniería Clínica. Rosario, 14 al 16 de octubre de 2.009.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Marini, Analía; Picó Guillermo; Farruggia, Beatriz y Romanini, Diana. “*Formación de complejos entre la alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y poliacrilatos de diferentes pesos moleculares*”. XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Salta, 18 al 21 de mayo de 2.009.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Farruggia, Beatriz M. y Romanini, Diana. “*Desarrollo de metodologías alternativas de purificación de alfa-amilasa a partir de *Aspergillus oryzae**”. XVII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Concordia, Entre Ríos, 27 al 29 de octubre de 2.009.

- PORFIRI, MARÍA CECILIA; Farruggia, Beatriz; Romanini, Diana. “*Desarrollo de metodologías alternativas de purificación de alfa-amilasa a partir de *Aspergillus oryzae**”. II Jornada de Ciencia y Tecnología. Foro permanente de discusión de Ciencia y Tecnología. Secretaría de Ciencia y Técnica. UNR. Rosario, 19 y 20 de noviembre de 2.008.

Este proyecto de Tesis Doctoral ha recibido los siguientes subsidios y becas por parte de entidades públicas y privadas:

- Beca Interna de Postgrado Tipo II (2 años), CONICET. A partir del 1° de Abril de 2.011. Directora: Dra. Romanini, Diana; Codirectora: Dra. Farruggia, Beatriz.

- Beca Interna de Postgrado Tipo I (3 años), CONICET. A partir del 1° de Abril de 2.008. Directora: Dra. Farruggia, Beatriz; Codirectora: Dra. Romanini, Diana.

PRESENTACIONES A CONGRESOS, BECAS, PASANTÍAS Y PUBLICACIONES

- Programa de Becas Regionales de Innovación Tecnológica, Fundación Nuevo Banco de Santa Fe (1 año). Año 2.008. Directora: Dra. Farruggia, Beatriz; Codirectora: Dra. Romanini, Diana.

Pasantías en el exterior:

- Los resultados de Calorimetría de Titulación Isotérmica y Calorimetría Diferencial de Barrido presentados en este trabajo de Tesis han sido obtenidos en el marco de una pasantía laboral realizada en el Instituto de Química de la Universidad de Campinas, UNICAMP, San Pablo, Brasil. Año 2.009.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	x
LENGUAJE ESPECIAL	xiii
RESUMEN	xiv
CAPÍTULO 1: Introducción	1
1. <i>Procesos bioseparativos. Obtención de enzimas</i>	1
2. <i>Técnicas que emplean polímeros de cadena flexible</i>	2
2.1. Polímeros de cadena flexible (PCF)	3
2.2. Precipitación con polielectrolitos	3
2.2.1. Polielectrolito empleado en esta Tesis: Ácido poliacrílico (PAA)	6
2.3. Sistemas bifásicos acuosos (SBAs)	7
2.3.1. Diagramas de fase	8
2.3.2. Teoría del volumen excluido	10
2.3.3. Reparto en sistemas bifásicos acuosos. Factores que gobiernan la partición	11
2.3.4. PCF empleado en esta Tesis: Polietilenglicol (PEG)	14
3. <i>Proteína en estudio: Alfa-amilasa</i>	15
3.1. Estructura tridimensional	16
3.2. Unión al sustrato y mecanismo de catálisis	17
3.3. Aplicaciones industriales	18

4.	<i>Interacción proteína-PCF</i>	19
4.1.	Técnicas empleadas para estudiar la interacción proteína-PCF	19
4.1.1.	Turbidimetría	19
4.1.2.	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	20
4.1.3.	Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis)	24
4.1.4.	Espectroscopía de fluorescencia (F)	25
4.1.5.	Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)	28
4.1.6.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	29
5.	<i>Fuentes naturales de alfa-amilasa: páncreas bovino y Aspergillus oryzae</i>	37
5.1.	El páncreas bovino	37
5.2.	Producción de alfa-amilasa fúngica. Cultivos sumergidos de <i>Aspergillus oryzae</i>	38
6.	<i>Objetivos</i>	41
6.1.	Objetivo general	41
6.2.	Objetivos particulares	41
	<i>CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos</i>	43
2.1.	<i>Materiales</i>	43
2.2.	<i>Métodos</i>	46
	<i>SECCIÓN I: Precipitación con PEs</i>	46
1.	<i>Análisis de pureza de la enzima comercial: alfa-amilasa (<i>Aspergillus oryzae</i>). Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes</i>	46
2.	<i>Determinación de las condiciones de precipitación y disolución de los</i>	46

	<i>complejos PAA/alfa-amilasa</i>	
2.1.	Ensayos turbidimétricos	46
2.2.	Efecto de la concentración de PAA en la formación de los complejos	46
2.3.	Efecto del pH en la formación de los complejos	48
2.4.	Efecto de la fuerza iónica en la formación de los complejos	48
3.	<i>Caracterización de la interacción PAA/alfa-amilasa</i>	48
3.1.	Naturaleza de la interacción PAA/alfa-amilasa y efecto de la fuerza iónica: Calorimetría de titulación isotérmica	48
3.2.	Cinética de formación de los complejos PAA/alfa-amilasa	49
4.	<i>Efecto sobre la estructura proteica de la interacción PAA/alfa-amilasa</i>	50
4.1.	Espectroscopía de absorción UV-visible	50
4.2.	Espectroscopía de emisión de fluorescencia	51
4.3.	Espectroscopía de dicroísmo circular	52
5.	<i>Efecto sobre la actividad enzimática de la interacción PAA/alfa-amilasa</i>	52
5.1.	Determinación de la actividad enzimática de la alfa-amilasa	52
6.	<i>Efecto de la interacción con PAA sobre la estabilidad de la alfa-amilasa</i>	53
6.1.	Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa	53
6.1.1.	Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa a pH 6,00. Efecto del PAA	53
6.1.2.	Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa a pH 3,00. Efecto del PAA	53
6.2.	Estabilidad estructural de la alfa-amilasa	54
6.2.1.	Estabilidad de la estructura secundaria de la alfa-amilasa a pH 6,00 y 3,00 medida por espectroscopía de DC. Efecto del PAA	54

6.3.	Calorimetría diferencial de barrido	54
6.3.1.	Efecto del pH y PAA en el proceso de desnaturalización térmica de la alfa-amilasa	55
6.3.2.	Análisis de reversibilidad en la desnaturalización térmica de la α-Amy: Barridos consecutivos de temperatura	55
6.3.3.	Efecto de la velocidad de barrido en los termogramas de DSC de la α-Amy	56
6.3.4.	Efecto de la concentración en los termogramas de DSC de la α-Amy	56
7.	<i>Diseño del método de precipitación de la alfa-amilasa con los polielectrolitos</i>	56
7.1.	Precipitación de la alfa-amilasa con PAA	56
7.2.	Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa en los precipitados	57
8.	<i>Análisis funcional de la alfa-amilasa luego de aplicar el método de precipitación</i>	57
	<i>SECCIÓN II: Reparto en SBAs</i>	58
1.	<i>Reparto de alfa-amilasa en SBAs PEG-fosfato de potasio, pH 7,00</i>	58
1.1.	Preparación de los sistemas bifásicos acuosos	58
1.2.	Determinación de los coeficientes de reparto de actividad enzimática (K_e). Dependencia con la composición de las fases, temperatura, concentración y peso molecular del PEG	59
1.3.	Determinación de las funciones termodinámicas de reparto	60
1.4.	Caracterización de la extracción líquido-líquido	60
1.5.	Efecto de la presencia de NaCl en el reparto	61
1.6.	Efecto de la variación en la relación de volúmenes entre las fases	61

2.	<i>Caracterización de la interacción PEG-alfa-amilasa</i>	62
2.1.	Naturaleza de la interacción alfa-amilasa/PEG. Calorimetría de titulación isotérmica	62
3.	<i>Análisis conformacional de la alfa-amilasa en los SBAs seleccionados</i>	63
3.1.	Espectroscopía de emisión de fluorescencia	63
3.2.	Extinción de la fluorescencia nativa de la alfa-amilasa con acrilamida	63
3.3.	Espectroscopía de dicroísmo circular	63
4.	<i>Análisis funcional de la alfa-amilasa en las fases de los SBAs</i>	64
5.	<i>Estabilidad térmica de alfa-amilasa. Calorimetría diferencial de barrido</i>	64
5.1.	Efecto del PEG en el proceso de desnaturalización térmica de la alfa-amilasa	64
	<i>SECCIÓN III: Aplicación a fuentes naturales</i>	65
1.	<i>Determinación de proteínas totales</i>	65
1.1.	Método de Warburg	65
1.2.	Método del ácido bicinconínico (BCA)	65
2.	<i>Preparación del tejido homogeneizado de páncreas bovino (HPB)</i>	66
3.	<i>Producción de alfa-amilasa fúngica: Cultivo líquido en lote de <i>Aspergillus oryzae</i></i>	67
3.1.	Optimización de variables experimentales de cultivo	67
3.1.1.	Composición del medio mínimo	67
3.1.2.	Concentración de sustrato (almidón)	68
3.1.3.	Tiempo de incubación en el medio mínimo	68
3.2.	Empleo de fuentes alternativas de almidón para la producción de alfa-	69

	amilasa a partir de cultivos de <i>Aspergillus oryzae</i>	
3.3.	SDS-PAGE de los filtrados de los medios de cultivo	70
3.4.	Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa fúngica a pH 7,00 y 3,00	70
4.	<i>Aplicación de la metodología de precipitación con polielectrolitos sobre fuentes naturales de alfa-amilasa</i>	70
4.1.	Precipitación de alfa-amilasa con PAA a partir del HPB	70
4.2.	Precipitación de alfa-amilasa con PAA a partir de cultivos líquidos de <i>Aspergillus oryzae</i>	71
5.	<i>Aplicación de la metodología de reparto en SBAs sobre fuentes naturales de alfa-amilasa</i>	72
5.1.	Reparto del HPB en los SBAs seleccionados	72
5.2.	Reparto en SBAs de la alfa-amilasa proveniente de cultivos líquidos de <i>Aspergillus oryzae</i>	73
6.	<i>Procesamiento de los datos experimentales</i>	73
	<i>CAPÍTULO 3: Resultados y discusión</i>	74
	<i>SECCIÓN I: Precipitación con PEs</i>	74
1.	<i>SDS-PAGE del liofilizado comercial de alfa-amilasa (<i>Aspergillus oryzae</i>)</i>	74
2.	<i>Determinación de las condiciones de precipitación y disolución de los complejos PAA/alfa-amilasa</i>	74
2.1.	Efecto de la concentración de PAA. Curvas de titulación turbidimétrica α-Amy/PAA	74
2.2.	Efecto del pH. Diagramas de fase α-Amy/PAA	78
2.3.	Efecto de la fuerza iónica. Curvas de titulación turbidimétrica en presencia de NaCl	80

3.	<i>Caracterización de la interacción PAA/alfa-amilasa</i>	82
3.1.	Naturaleza de la interacción PAA/alfa-amilasa. ITC	82
3.2.	ITC PAA/alfa-amilasa. Efecto de la fuerza iónica	85
3.3.	Cinética de formación de los complejos PAA/alfa-amilasa	88
4.	<i>Efecto de la interacción con PAA sobre la estructura de la alfa-amilasa</i>	90
4.1.	Espectros de absorción UV-Vis de la alfa-amilasa con y sin PAA	90
4.2.	Espectros de emisión de F de la alfa-amilasa con y sin PAA	91
4.3.	Espectros de DC de la alfa-amilasa con y sin PAA	95
5.	<i>Estabilidad de la alfa-amilasa</i>	97
5.1.	Estabilidad catalítica	97
5.1.1.	Estabilidad catalítica a pH 6,00 con y sin PAA	97
5.1.2.	Estabilidad catalítica a pH 3,00 con y sin PAA. Cinética de inactivación	98
5.2.	Estabilidad estructural de la alfa-amilasa	100
5.2.1.	Espectros de DC de la α -Amy en el tiempo a pH 6,00 y 3,00 con y sin PAA	100
5.3.	Estabilidad térmica de la alfa-amilasa	103
5.3.1.	DSC de la α -Amy a pH 3,00 y 6,00, con y sin PAA	103
5.3.2.	Reversibilidad en el proceso de desnaturalización térmica de la α -Amy. Efecto del segundo ciclo de calentamiento en los termogramas de DSC	105
5.3.3.	Dependencia de los termogramas de DSC con la velocidad de barrido	107
5.3.4.	Influencia de la concentración de α -Amy en los termogramas de DSC	109
6.	<i>Diseño del método de precipitación</i>	111

6.1.	Precipitación de alfa-amilasa con PAA	111
6.2.	Estabilidad catalítica de los complejos α-Amy/PAA precipitados	113
7.	<i>Análisis funcional de la alfa-amilasa luego de la precipitación</i>	114
	SECCIÓN II: Reparto en SBAs	116
1.	<i>Reparto de la alfa-amilasa en SBAs PEG-fosfato de potasio, pH 7,00</i>	116
1.1.	Efecto de la composición de las fases, temperatura, peso molecular y concentración del PEG en los valores de K_e	116
1.2.	Funciones termodinámicas del proceso de reparto	119
1.3.	Rendimientos porcentuales teóricos de la α-Amy en las fases de los SBAs	122
1.4.	Efecto del agregado de NaCl en el proceso de reparto de la α-Amy	123
1.5.	Efecto de la variación en la relación de los volúmenes de fase (R) en el proceso de reparto de la α-Amy	125
2.	<i>Naturaleza de la interacción PEG/α-Amy. Calorimetría de titulación isotérmica</i>	127
3.	<i>Análisis conformacional de la alfa-amilasa en los SBAs seleccionados</i>	129
3.1.	Espectros de emisión de fluorescencia de la alfa-amilasa con y sin PEG	129
3.2.	<i>Quenching con acrilamida de la F nativa de la alfa-amilasa. Efecto de las fases de los SBAs</i>	131
3.3.	Espectros de dicroísmo circular de la alfa-amilasa con y sin PEG	133
4.	<i>Actividad de la alfa-amilasa en las fases de los SBAs</i>	134
5.	<i>Calorimetría diferencial de barrido</i>	135
5.1.	Efecto del PEG en la desnaturalización térmica de la alfa-amilasa	135

<i>SECCIÓN III: Aplicación a fuentes naturales</i>	137
<i>1. Cultivo en lote de Aspergillus oryzae</i>	137
1.1. Optimización de variables experimentales de cultivo	137
1.1.1. Composición del medio	137
1.1.2. Concentración de almidón en el medio optimizado	137
1.1.3. Productividad en el medio mínimo optimizado	138
1.2. Empleo de fuentes alternativas de almidón en el medio mínimo optimizado	139
1.3. Análisis de pureza de la alfa-amilasa fúngica por SDS-PAGE	140
1.4. Análisis de la estabilidad catalítica de la alfa-amilasa fúngica	141
<i>2. Precipitación con PAA de la alfa-amilasa de distintas fuentes naturales</i>	143
2.1. Precipitación con PAA de la alfa-amilasa pancreática bovina	143
2.2. Precipitación con PAA de la alfa-amilasa fúngica (<i>Aspergillus oryzae</i>)	144
<i>3. Reparto en SBAs de la alfa-amilasa de distintas fuentes naturales</i>	145
3.1. Reparto en SBAs de la alfa-amilasa pancreática bovina	145
3.2. Reparto en SBAs de la alfa-amilasa de origen fúngico (<i>Aspergillus oryzae</i>)	147
CAPÍTULO 4: Conclusiones	150
CAPITULO 5: Bibliografía	165

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abs.	Absorbancia
Act.	Actividad enzimática
Act. esp.	Actividad específica
AN	Ácidos nucleicos
BCA	Ácido bicinconínico
C _p	Capacidad calorífica
DC	Dicroísmo circular
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
<i>e</i>	Estequiometría del complejo
E _A	Energía de activación
F	Fluorescencia
FP	Factor de purificación
HPB	Tejido homogeneizado de páncreas bovino
If	Intensidad de fluorescencia
If ₀	Intensidad de fluorescencia inicial
Inf.	inferior
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
<i>k</i>	Constante cinética de inactivación
<i>k</i>	Constante de velocidad de desnaturalización
<i>K</i>	Constante de afinidad o constante microscópica aparente del

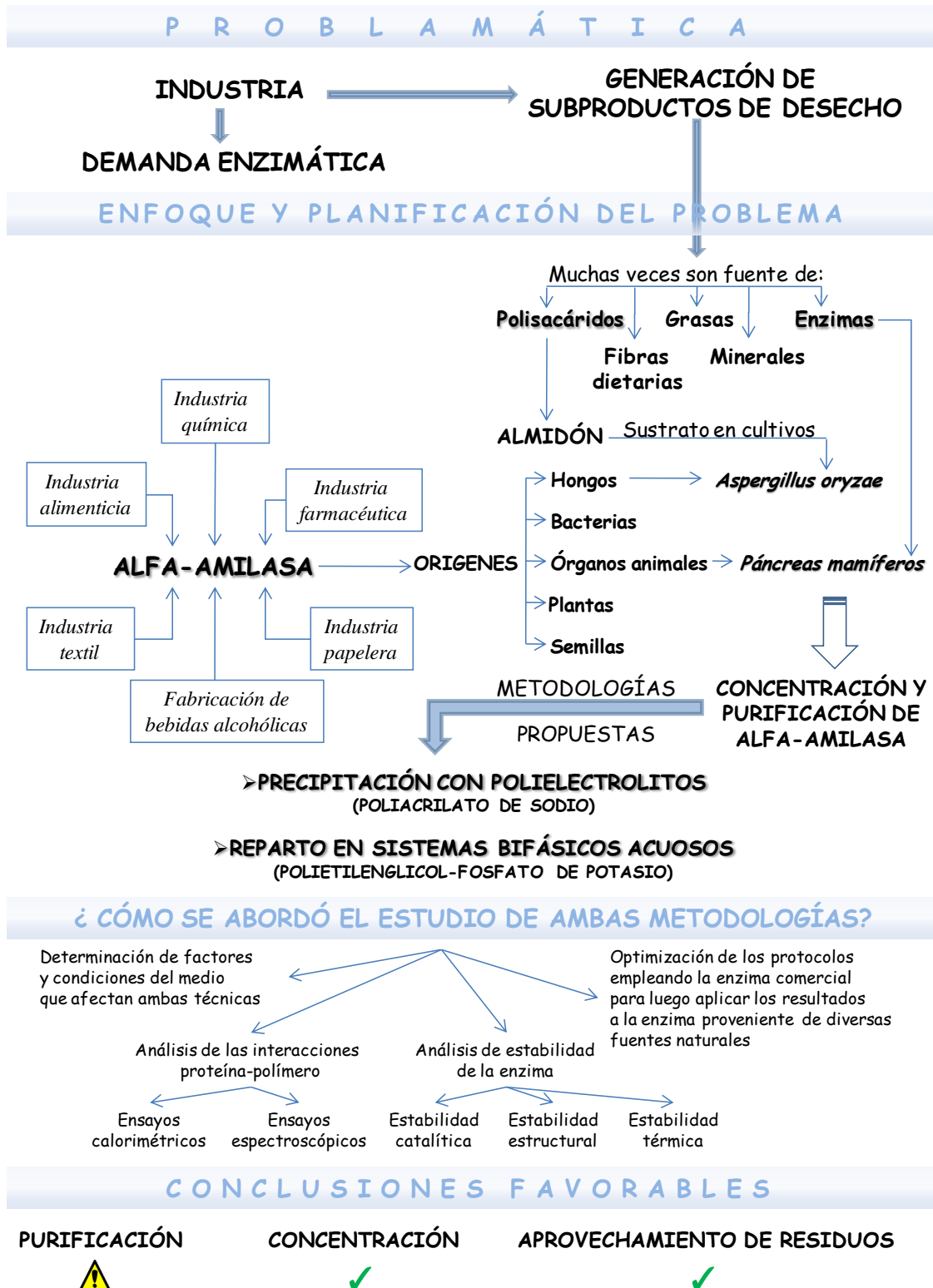
	equilibrio de unión
K_D	Constante de Stern-Volmer para el <i>quenching</i> colisional y modelo de esfera de acción
K_e	Coeficiente de reparto de actividad enzimática
K_p	Coeficiente de reparto de proteínas totales
K_s	Constante de asociación <i>quencher</i> -fluoróforo
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
n	Moles
n	Número de sitios de fijación de una macromolécula al ligando
PAA	Poliacrilato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCF	Polímero de cadena flexible
PE	Polielectrolito
PEG	Polietilenglicol
Pi	Fosfato
PM	Peso molecular
PP	Precipitado
PT	Proteínas totales
Q	calor
R	Relación de volúmenes
R	Constante de los gases
r	Radio de la esfera de acción

R %	Rendimiento
R y D	Resultados y Discusión
SBA	Sistema bifásico acuoso
SDS	Dodecil sulfato de sódico
SN	Sobrenadante
Sup.	Superior
T	Temperatura
T.L.	Tie line
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
Trp	Triptófano
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Velocidad de barrido
Y %	Rendimiento teórico porcentual
ΔG°	Cambio de energía libre estándar
ΔH°	Cambio de entalpía estándar
$\Delta H^\circ_{\text{cal}}$	Entalpía calorimétrica
ΔH^{VH}	Entalpía de Van't Hoff
ΔS°	Cambio de entropía estándar
α -Amy	Alfa-amilasa
ϵ	Absortividad molar
v	Volumen de la esfera de acción
λ	Longitud de onda

LENGUAJE ESPECIAL

<i>Binding</i>	Fijación
<i>Buffer</i>	Solución tampón
<i>Delivery</i>	Entrega
<i>Feedback</i>	Retroalimentación
<i>Melting</i>	Fusión
<i>Plateau</i>	Meseta
<i>Quencher</i>	Extintor de fluorescencia
<i>Quenching</i>	Extinción de fluorescencia
<i>Software</i>	Programa
<i>Tie line</i>	Línea de unión

Notación numérica: en las gráficas se empleó punto para la separación de decimal.

RESUMEN**Esquema general del trabajo propuesto:**

La demanda enzimática en actividades de la industria química, alimenticia, textil, farmacéutica, etc. genera la necesidad de desarrollar técnicas de obtención y purificación de biocatalizadores que sean económicas, rápidas, que no dañen el medio ambiente y otorguen beneficios sostenidos a largo plazo. Estos diseños deberían permitir el uso de productos de desecho, materias primas renovables o materiales que puedan ser reciclados.

En biotecnología se emplean microorganismos presentes en la naturaleza en fermentaciones, panificación, fabricación de bebidas alcohólicas, quesos, etc. o a través de la ingeniería genética se producen microorganismos modificados para la producción de proteínas con importantes rendimiento y eficiencia. Esto hace que la tecnología enzimática se encuentre fuertemente ligada a los progresos en el desarrollo de biorreactores para fermentación a gran escala y cultivos celulares.

En el presente trabajo se diseñaron dos metodologías de concentración y purificación de la enzima alfa-amilasa: ***precipitación con polielectrolitos*** (PEs) y ***reparto en sistemas bifásicos acuosos*** (SBAs), con el fin de evaluar su posible aplicación a partir de diversas fuentes naturales de la alfa-amilasa, como lo son el páncreas bovino y el hongo filamentoso *Aspergillus oryzae*. Como fuente de polisacáridos para los cultivos del microorganismo se trabajó en el aprovechamiento de desperdicios generados por la industria agrícola, contribuyendo a la reducción y tratamiento de grandes cantidades de desechos que se acumulan y muchas veces son una fuente valiosa de productos de importancia industrial.

La enzima ***alfa-amilasa*** es una glicoproteína que hidroliza los enlaces internos α (1,4) del almidón. Tradicionalmente fue utilizada en la industria alimenticia, en el procesamiento de alimentos, en la fabricación de cerveza, etc. y actualmente su espectro de aplicación se ha ampliado a la industria de productos químicos como detergentes, jabones, textiles, papel y productos farmacéuticos. Este es el motivo del interés en el desarrollo de tecnologías limpias, sencillas, rápidas y de bajos costos para la producción, recuperación, concentración y purificación de alfa-amilasa.

La primera metodología ensayada en este trabajo emplea polímeros de cadena flexible con carga eléctrica neta, llamados polielectrolitos. Estos tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas los cuales pueden ser insolubilizados de manera reversible en función de diversas variables experimentales y condiciones del medio (peso molecular, densidad de carga y concentración del PE, pH, fuerza iónica, etc.). Así, los complejos pueden volverse insolubles y separarse del resto del medio por simple

decantación. Para que el proceso sea efectivo debe lograrse que la proteína pueda ser recuperada del complejo insoluble, lo cual demanda hallar las condiciones para que el complejo se disocie, recuperando la proteína con su actividad catalítica conservada, y reciclar el PE para un nuevo proceso bioseparativo. Se emplearon como polielectrolitos, poliacrilatos de sodio de diferentes pesos moleculares promedio.

La segunda metodología se basa en el principio de reparto de macromoléculas en SBAs formados por un polímero de cadena flexible (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares promedio) y una sal (fosfato de potasio). Estos sistemas forman espontáneamente dos fases inmiscibles por encima de una concentración crítica de sus componentes: una fase enriquecida en el polímero y la otra en la sal. Macromoléculas tales como proteínas se repartirán entre las fases de estos sistemas de acuerdo a un coeficiente de reparto (Kr) que es el cociente entre las concentraciones de dicha macromolécula entre las fases superior e inferior del SBA y depende de variables inherentes al sistema, de factores del medio y de las características de la molécula que se reparte. De esta forma, para aislar una molécula desde una muestra compleja se deberán hallar las condiciones para que la misma se reparta de manera mayoritaria hacia una de las fases y los contaminantes hacia la fase contraria.

Ambas metodologías son sencillas, rápidas, económicas, no requieren de instrumental complicado, son aplicables a gran escala y utilizan polímeros de bajo costo que pueden ser reciclados para un subsiguiente paso separativo.

En este trabajo se abordó el estudio de los factores que afectan a dichas metodologías, así como también la naturaleza de las interacciones en las que participa la enzima y los efectos en su integridad funcional y estructural.

Para la metodología de precipitación con poliacrilato, en primer lugar se obtuvieron los diagramas de fase para los complejos formados con alfa-amilasa, los cuales permitieron evaluar el rango de pH y concentraciones dentro de los cuales los complejos son solubles o insolubles y seleccionar los pHs óptimos para la precipitación y redisolución de los complejos. Tratándose de polielectrolitos aniónicos, el pH de mayor interacción entre los componentes resultó ser ácido (cerca a 3,00) y por encima de 6,00 se redisolieron por completo, con una cinética rápida que también fue determinada. Los ensayos de calorimetría de titulación isotérmica evidenciaron una interacción con efectos exotérmicos y de naturaleza mixta, que no es afectada en forma importante por un aumento en la fuerza iónica del medio, mostraron gran afinidad entre los componentes y una estequiometría que sugiere que un gran número de moléculas de

enzima se unen por molécula de polímero. Su estabilidad catalítica tampoco se vio disminuida ante la presencia de los polielectrolitos dentro de su rango óptimo de pH, pero sí aumentó a pH ácido revelando cierto efecto protector de los poliacrilatos en el proceso de inactivación ácida de la enzima. Este mismo efecto protector a pHs ácidos se observó a nivel de la estructura secundaria de la proteína por espectroscopía de dicroísmo circular. Esto nos permitió verificar que el mecanismo molecular de inactivación ácida está asociado con la pérdida de estructuración de la enzima y el efecto protector de los poliacrilatos estaría vinculado con los niveles de estructuración secundaria de la misma. La estructura secundaria o terciaria de la enzima no se vio significativamente afectada ante la interacción con cantidades crecientes de los polímeros, tal como lo demuestran los estudios de espectroscopía de fluorescencia, dicroísmo circular y UV-visible. La estabilidad térmica de la enzima, analizada por calorimetría diferencial de barrido, tampoco se vio modificada de manera sustancial en presencia de los polielectrolitos, evidenciándose un modelo de desnaturalización térmica con dos transiciones (correspondientes a dominios independientes de la enzima) y de carácter parcialmente reversible. Finalmente, la precipitación de la enzima comercial (de origen *Aspergillus oryzae*) con los poliacrilatos arrojó rendimientos elevados, con resultados promisorios para la implementación de esta técnica sobre extractos naturales.

El reparto de la alfa-amilasa fue estudiado en SBAs con polietilenglicoles (PEGs) de distintos pesos moleculares (2.000, 3.350, 6.000 y 8.000), a pH 7,00, cuatro composiciones de fases diferentes y relaciones de volúmenes de fase unitarias. Luego de alcanzado el equilibrio de reparto, la enzima se concentró mayoritariamente en la fase inferior enriquecida en sal, excepto para los sistemas formados con PEG 2.000 donde se repartió principalmente hacia la fase polimérica. Al aumentar la masa molar del PEG el equilibrio se desplazó mayoritariamente hacia la fase inferior, indicando que el volumen excluido por el polímero podría ser un factor influyente y determinante en el comportamiento de reparto en estos sistemas. El agregado de una sal inerte a los SBAs no mejoró los resultados de reparto, mientras que el aumento en la relación de volúmenes entre las fases resultó favorable para el sistema con el PEG de menor peso molecular y desfavorable para el PEG de mayor peso molecular. Las funciones termodinámicas del proceso de reparto indicaron que, en general, el pasaje de la enzima desde la fase rica en sal a la fase rica en PEG es un proceso exotérmico que produce ordenamiento del estado final, lo cual indicaría que el proceso está conducido

entálpicamente. Además, el efecto de compensación entrópico-entálpico observado también es indicio de que el agua juega un rol importante en el mecanismo de partición. Resulta de interés destacar que, a pesar de que el pasaje de la enzima de la fase inferior a la superior es un proceso principalmente exotérmico, la interacción alfa-amilasa/PEG 2.000 (analizada por calorimetría de titulación isotérmica) es de naturaleza endotérmica y de afinidad débil. Los ensayos espectroscópicos de fluorescencia y dicroísmo circular, realizados para evaluar el estado conformacional de la enzima, mostraron que las fases superiores lo afectan de manera poco significativa, mientras que las inferiores producen consecuencias algo más marcadas. Lo mismo se observó para la actividad catalítica de la enzima la cual resultó, en líneas generales, más afectada en las fases inferiores respecto de las superiores. La estabilidad térmica de la enzima no se vio alterada de manera relevante ante la presencia de PEG, según demuestran los ensayos de calorimetría diferencial de barrido.

Al aplicar los resultados obtenidos con la enzima comercial, de origen fúngico, sobre el páncreas bovino se observó que para algunos SBAs ensayados el reparto difiere entre ambas fuentes en su comportamiento y los resultados de purificación no fueron satisfactorios. Otros SBAs, en cambio, permitieron obtener elevados rendimientos con escasa purificación. La precipitación con poliacrilato también arrojó rendimientos porcentuales elevados aunque un bajo factor de purificación. Esto sugiere que estas técnicas podrían ser eficaces para concentrar la enzima pancreática pero no para purificarla.

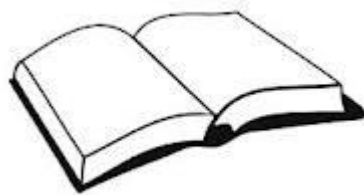
Al trabajar sobre cultivos de *Aspergillus oryzae*, los resultados del reparto en todos los SBAs ensayados siguieron la misma tendencia que la alfa-amilasa comercial mostrando que algunos sistemas no son eficientes en la purificación de la proteína, pero sí lo son en cuanto a la posibilidad de concentrarla. La precipitación con poliacrilatos arrojó resultados promisorios, tanto en referencia a la purificación como rendimiento total del proceso, ya que se produce poca pérdida enzimática con factores de purificación que son coherentes con los bajos niveles de contaminantes que están presentes en estos cultivos.

En conclusión, podríamos decir que estas metodologías son eficaces como primer paso extractivo de concentración durante un proceso de purificación de alfa-amilasa. La precipitación con poliacrilato también puede presentarse como técnica de purificación primaria, evaluándose la necesidad de implementar metodologías más específicas de acuerdo a los requerimientos de pureza del producto final.

El empleo de materiales de desecho como fuente natural de alfa-amilasa (páncreas bovino) o de almidón para los cultivos de *Aspergillus oryzae* (desechos del procesamiento del trigo) aporta un valor extra a estos resultados tanto desde el punto de vista económico (ya que se trata de productos de partida con escaso valor comercial) pero también medioambiental, ya que contribuye a disminuir las grandes cantidades de subproductos o residuos que se generan en la industria ganadera y agrícola.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO 1: Introducción

1. Procesos bioseparativos. Obtención de enzimas

El uso actual de enzimas en diversas actividades productivas ha impulsado la búsqueda de técnicas para su aislamiento y purificación, que permitan disponer de grandes cantidades de estos catalizadores biológicos y con diferentes grados de pureza (Jagnow y Dawid, 1.991). Las enzimas se emplean, por ejemplo, en catálisis industrial, como productos terapéuticos, en la alimentación, como digestivos, para diagnóstico, en productos de limpieza y cosmética, etc.

En sus fuentes naturales, las proteínas suelen encontrarse en muy bajas concentraciones o formando parte de una mezcla compleja de componentes. Asimismo, frecuentemente contienen grandes cantidad de impurezas, son inestables, termolábiles o muy sensibles a cambios en las variables del medio (pH, presencia de cosolutos, fuerza iónica, etc.). Además, el impacto económico de su obtención puede representar entre un 10 % hasta un 80 % del costo total del proceso biotecnológico, de acuerdo a la pureza requerida. Esto genera la necesidad de disponer de métodos de obtención de enzimas que puedan ser aplicables en macro escala empleando tecnologías sencillas, rápidas y económicas.

El término **bioseparación** hace referencia a la recuperación, aislamiento, purificación y concentración de un producto biológico, por ejemplo, enzimas expresadas por un microorganismo u otras fuentes naturales.

La bioseparación resulta importante durante muchos procesos biotecnológicos para disminuir el volumen en el que está contenida la muestra, concentrar y lograr enriquecimiento en el producto deseado, eliminar impurezas que puedan resultar tóxicas o que den lugar a reacciones secundarias, aumentar la estabilidad y disminuir la degradación del material, etc. (Pessoa y Kilikian, 2.005).

Un proceso de bioseparación exitoso debe combinar alto rendimiento y selectividad en el producto de interés, pero también debe lograr estabilizarlo. Además debe asegurar reproducibilidad, escalado industrial y cumplimiento de las regulaciones de todo proceso industrial. Cabe destacar que la selectividad en la bioseparación dependerá de la aplicación a la que se va a destinar el producto final, la cual determinará la pureza y concentración requeridas y los niveles permitidos de cada una de las impurezas que lo acompañan. En este sentido, las especificaciones comerciales de

pureza para las proteínas de uso medicinal suelen ser mucho más estrictas que las correspondientes a enzimas industriales (Smith, 2.004).

Las técnicas de bioseparación se pueden clasificar en tres categorías:

- De alto rendimiento y alta purificación, como puede ser una cromatografía de afinidad y otras cromatografías.
- De bajo rendimiento y alta purificación, tales como la electroforesis.
- De baja purificación y alto rendimiento, por ejemplo, precipitación, extracción líquido-líquido, ultra filtración, etc.

Estos últimos resultan los más fáciles de escalar y con menores costos de implementación. Otros métodos, en cambio, resultan muy costosos (ciertas cromatografías) o son principalmente técnicas analíticas (técnicas electroforéticas).

En general, un esquema de purificación de enzimas consiste en varios pasos u operaciones unitarias que pueden basarse en diferentes propiedades físicas, químicas o bioquímicas de los componentes que se desean separar: los primeros pasos tienen como objetivo clarificar la muestra (es decir, eliminar la mayor cantidad de impurezas presentes) y concentrar el producto de interés, logrando bajos niveles de pureza pero perdiendo la menor cantidad de proteína posible (elevado rendimiento). Los pasos subsiguientes consisten en la aplicación de técnicas específicas de mayor resolución, que permitan obtener la enzima de interés con el grado de pureza deseada a expensas, en la mayoría de los casos, del rendimiento total del proceso. Finalizando el procedimiento se deben realizar los controles de pureza pertinentes por dosaje de proteínas totales, actividad enzimática y electroforesis, además de controles de estabilidad y estado nativo por distintas técnicas espectroscópicas o calorimétricas.

Entre los primeros pasos de clarificación y concentración en dicho esquema, las técnicas más empleadas son la filtración, centrifugación y precipitación con solventes, polímeros o sales, mientras que los subsiguientes pasos de purificación emplean técnicas más selectivas tales como las cromatográficas, entre otras (Scopes, 1.988; Doran, 1.998).

2. Técnicas que emplean polímeros de cadena flexible

En este trabajo se han analizado y ensayado dos metodologías bioseparativas de obtención enzimática que se fundamentan en diferentes características fisicoquímicas de los sistemas y son empleadas en las primeras etapas durante los procesos biotecnológicos de obtención de proteínas. Estas operaciones unitarias tienen como

objetivo concentrar la enzima de interés, eliminar la mayor cantidad de impurezas y subproductos y, en la medida de lo posible, reducir el volumen en el que se encuentra la muestra.

Las metodologías empleadas en este trabajo fueron: *precipitación con polielectrolitos* (PEs) y *reparto en sistemas bifásicos acuosos* (SBAs).

2.1. Polímeros de cadena flexible (PCF)

Ambas técnicas anteriormente mencionadas emplean polímeros de cadena flexible, con o sin carga eléctrica neta. Estos polímeros pueden contener diferentes grupos funcionales pero todos poseen enlaces simples entre los carbonos que conforman el esqueleto de la molécula, lo cual le confiere flexibilidad y capacidad de adoptar diferentes conformaciones al azar.

De acuerdo a su origen, los PCF pueden ser:

- Naturales: provenientes directamente del reino vegetal o animal. Por ejemplo: celulosa, almidón, proteínas, caucho natural, etc.
- Artificiales: son el resultado de modificaciones, mediante procesos químicos, de ciertos polímeros naturales. Ejemplos: nitrocelulosa, etonita, etc.
- Sintéticos: se obtienen por procesos de polimerización controlados por el hombre a partir de materias primas de bajo peso molecular. Tales como: nylon, polietileno, cloruro de polivinilo, polimetano, etc.

Estos últimos se generan por medio de técnicas de polimerización que dan lugar, generalmente, a muestras con cierto grado de dispersión en sus pesos moleculares, desde valores dentro de un rango estrecho (paucidispersas) hasta muestras con mayor dispersión (polidispersas). Es por esto que lo que se informa son pesos moleculares promedio y no deben considerarse muestras homogéneas en cuanto a este parámetro (Freifelder, 1.935; Paglini, 1.979).

El empleo de PCF en técnicas de aislamiento y purificación de biomoléculas se ha incrementado en los últimos años a partir del desarrollo de nuevas tecnologías de síntesis (Moad y col., 2.008).

2.2. Precipitación con polielectrolitos

Los PCF con carga eléctrica neta son comúnmente llamados polielectrolitos (PEs). Dado que son tanto polímeros como poliiones, representan una clase de material con propiedades interesantes y relevancia práctica. Una particularidad muy importante

es que tienen capacidad de formar complejos interpoliméricos con especies de carga opuesta, polianiones o policationes, como por ejemplo proteínas. Dichas interacciones están dirigidas principalmente por fuerzas Coulómbicas.

Numerosos estudios en formación de complejos proteína/PE han sido motivados por su aplicación no sólo en la precipitación y purificación de proteínas, sino también en otros campos como el *delivery*, microencapsulado, inmovilización y/o estabilización de proteínas, etc. La purificación de proteínas a través de precipitación selectiva es conocida desde hace más de dos décadas, pero ha recobrado importancia en la actualidad gracias al avance en la tecnología de materiales que permiten su exitosa implementación. También se la conoce como precipitación de afinidad, por emplear macroligandos de afinidad, en este caso poliméricos (Hilbrig y Freitag, 2.003; Cooper y col., 2.005; Foreman y col., 2.001; Djabali y col., 2.009; Cong y col., 1.995; Kumar y Gupta, 1.998; Kahraman y col., 2.007; Bayramog̃lu y col, 2.004).

Una descripción completa de estos complejos incluye el conocimiento de:

- el número de moléculas de proteína unidas por molécula de PE o “*estequiometría del complejo, e*”
- la perturbación del estado nativo de la proteína al interactuar con el PE
- la energética de la interacción, es decir, la energía liberada o absorbida por mol de proteína unida al PE
- etc.

Los dos parámetros más importantes que gobiernan la interacción proteína/PE son la hidrofobicidad y la carga eléctrica de cada componente. En términos generales, estos interactúan cuando ambos presentan carga eléctrica neta opuesta, aunque también pueden existir contribuciones hidrofóbicas en la interacción. Sin embargo, no se descarta la participación de otros tipos de fuerzas que puedan tener un rol menor en la asociación y que tal vez sean la causa de diferencias sutiles entre sistemas proteína/PE de características similares, por ejemplo, puentes de hidrógeno.

El estado físico de estos complejos proteína/PE puede variar de acuerdo a su grado de solvatación, siendo solubles cuando están muy hidratados o formar coacervados que finalmente precipitan reversiblemente bajo condiciones de interacción fuerte (alta densidad de carga, pH lejos del punto isoelectrico, baja concentración salina, etc.) o también pueden estar formando multicapas, fibras y geles (Cooper y col., 2.005).

En cuanto al mecanismo de formación de los complejos, se propuso la existencia de complejos solubles previamente a precipitar: a bajas concentraciones, varias moléculas de proteínas se unirían a una única molécula de PE formando estructuras solubles tipo “collar de perlas”. En algunos casos el radio de estos complejos (obtenido por medidas de dispersión dinámica de luz) es menor al del polielectrolito libre de proteína (Tsuboi y col., 1.996; Boeris y col., 2.011). Al aumentar las concentraciones estos complejos se asociarían entre sí formando agregados intercatenarios macroscópicos que finalmente precipitan provocando una separación de fases sólido-líquido. Para un dado PE se requiere una densidad de carga crítica de la proteína para que ocurra la separación de fases. Esto se daría al pH crítico de formación de complejos, es decir, el o los pHs donde comienza a observarse la formación de complejos insolubles, y depende tanto de la densidad de carga del polímero como de la fuerza iónica del medio (Tsetska, 2.001; Cooper y col., 2.005).

En la figura a continuación se muestran esquemáticamente los equilibrios alcanzados por el sistema en la formación de los complejos entre proteínas y PEs:

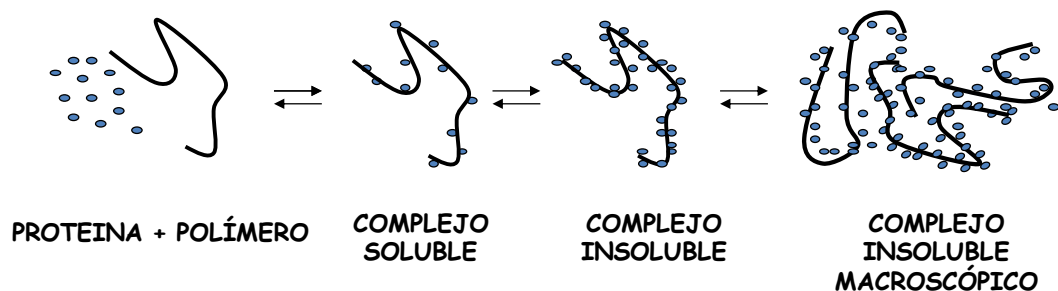


Figura 1.1: Equilibrios de formación de los complejos proteína/polielectrolito

Esta capacidad que tienen los PEs de interactuar con proteínas y formar complejos que pueden volverse insolubles y separarse del resto del medio por simple decantación, es la base de un método de aislamiento y purificación de proteínas por precipitación con PEs. Este proceso depende de una serie de variables experimentales tales como: diferente densidad de carga eléctrica, peso molecular y concentración del PE, pH, fuerza iónica, etc. (Gupta y col., 2.002; Wang y col., 1.999; Arvind y col., 2.000; Patrickios y col., 1.999; Tsuboi y col., 1.996; Nath y col., 1.995). Para que el proceso sea efectivo, debe lograrse que la enzima pueda ser recuperada del complejo insoluble. Esto es posible si se encuentran las condiciones para que el mismo pueda disociarse, recuperando la proteína con su actividad biológica conservada y reciclando

el PE para un nuevo ciclo bioseparativo. Las estrategias que pueden emplearse para la redisolución del complejo insoluble implican: variación del pH, de la fuerza iónica del medio o una combinación de ambos (Arvind y col., 2.000).

A pesar de la baja especificidad de esta técnica por su naturaleza escasamente selectiva, el empleo de precipitación con PEs tiene numerosas ventajas, ya que permite la obtención de una gran variedad de proteínas en un único paso con un elevado rendimiento, es simple, rápida en la separación del complejo proteína/PE, reproducible, de bajo costo (los PEs son económicos), aplicable a gran escala, no requiere de instrumental complicado, permite concentrar la muestra ya que se puede reducir en forma sustancial el volumen de la solución donde se encuentra contenida la proteína de interés, y el proceso se puede llevar a cabo en un fermentador donde un microorganismo esté produciendo la proteína que luego es recuperada como fase sólida (Pessoa y Kilikian, 2.005). Si bien es una técnica de baja selectividad, una acertada elección del PE para una dada muestra compleja de proteínas, puede resultar en un procedimiento extractivo con altos niveles de rendimiento y factores de purificación aceptables para un proceso de precipitación en un único paso.

Una adecuada descripción empírica de estos sistemas permitiría aplicar esta técnica para extractos naturales. El conocimiento de los factores que afectan la precipitación de proteínas en dichos sistemas, podría contribuir al diseño y optimización de esta técnica como proceso extractivo de aplicación a escala industrial.

2.2.1. Polielectrolito empleado en esta Tesis: **Ácido poliacrílico (PAA)**

El *ácido acrílico*, ácido 2-propenoico o etilencarboxílico ($C_3H_4O_2$) y sus ésteres derivados se conocen en conjunto como *acrilatos*. Este ácido carboxílico tiene un pKa de 4,26. Entre sus propiedades fisicoquímicas más importantes se observa que es un líquido incoloro, miscible en agua, posee un punto de ebullición de 141°C y fusión de 14°C, inflamable, volátil y de mediana toxicidad.

De acuerdo a su grado de polimerización (x), da lugar a *ácido poliacrílico* de diferentes pesos moleculares, el cual posee en cada unidad repetitiva un grupo ionizable (carboxilato). Su polimerización es sencilla y se lleva a cabo a través de un proceso denominado *transferencia de grupo* (Moad y col., 2.008). En la figura 1.2 se muestra esquemáticamente la estructura química del PAA:

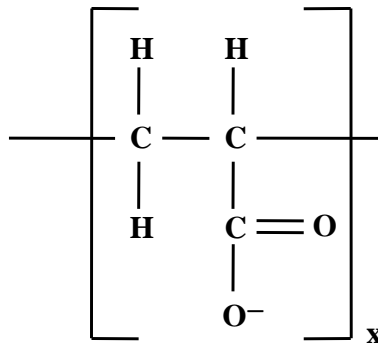


Figura 1.2: Estructura química del poliacrilato

La posibilidad que tiene este ácido de polimerizarse dando lugar a moléculas de alto peso molecular con buena solubilidad ha generado una amplia diversidad de aplicaciones del PAA. Su grado de polimerización es un factor clave que determina su aplicación industrial, como se muestra en la tabla 1.1:

Tabla 1.1: Aplicaciones industriales del PAA

<i>Peso molecular PAA</i>	<i>Aplicación industrial</i>
< 80.000	Agente dispersante de pigmentos, en la fabricación de pinturas
$10^6 - 10^7$	Acabado de telas, en la industria textil Agente de retención en la industria del papel, pañales, etc.
> 10^7	Agente floculante o espesante

A estos polímeros también se los denomina *superabsorbentes* por su capacidad de absorber grandes cantidades de agua. Es por esto que también se han incorporado en la fabricación de pañales, toallas femeninas y productos para la higiene personal en general que requieren de procesos de absorción de agua. Así también en la eliminación de agua de algunos combustibles como los empleados en aviación, absorción de agua en fugas, aislamiento de centrales eléctricas y cables ópticos, acondicionamiento de tierra en jardines para que retengan mayor cantidad de agua, entre otros usos.

2.3. Sistemas bifásicos acuosos (SBAs)

Los sistemas bifásicos acuosos se forman cuando dos polímeros químicamente diferentes o un polímero y una sal se mezclan en determinadas concentraciones en solución acuosa provocando la aparición de dos fases inmiscibles. Una de estas fases estará enriquecida en uno de los polímeros y la otra en el otro polímero o sal. Estos

sistemas que se forman por mezcla directa de los componentes se denominan *sistemas preformados*.

Los SBAs también se pueden obtener por separación de fases en soluciones de un único polímero, cuando es llevada por encima o debajo de cierta temperatura crítica. Esto resulta en una fase muy enriquecida en el polímero respecto de la otra. Estos sistemas se denominan *inducidos por temperatura*.

El tratamiento teórico de separación de fases puede enfocarse desde distintas perspectivas de acuerdo al rol que se le atribuya a los distintos componentes del sistema. De esta forma, se puede interpretar según la Teoría de Flory-Huggins (Flory, 1.953), según el modelo de expansión del virial, según principios de termodinámica de superficies o como resultado de los efectos del polímero en la estructura del agua (Zaslavsky, 1.995).

Dado que, cualquiera sea el sistema, el solvente en ambas fases es agua, los SBAs presentan baja presión osmótica y tensión interfacial y permiten la adición de sales y otros solutos con capacidad *buffer*. Esto hace que se puedan controlar ciertos parámetros como pH y fuerza iónica, brindando un entorno adecuado para macromoléculas biológicas tales como células, virus, proteínas, etc.

2.3.1. Diagramas de fase

La composición de los SBAs se encuentra convenientemente representada en los diagramas de fase, como se ilustra en la figura 1.3:

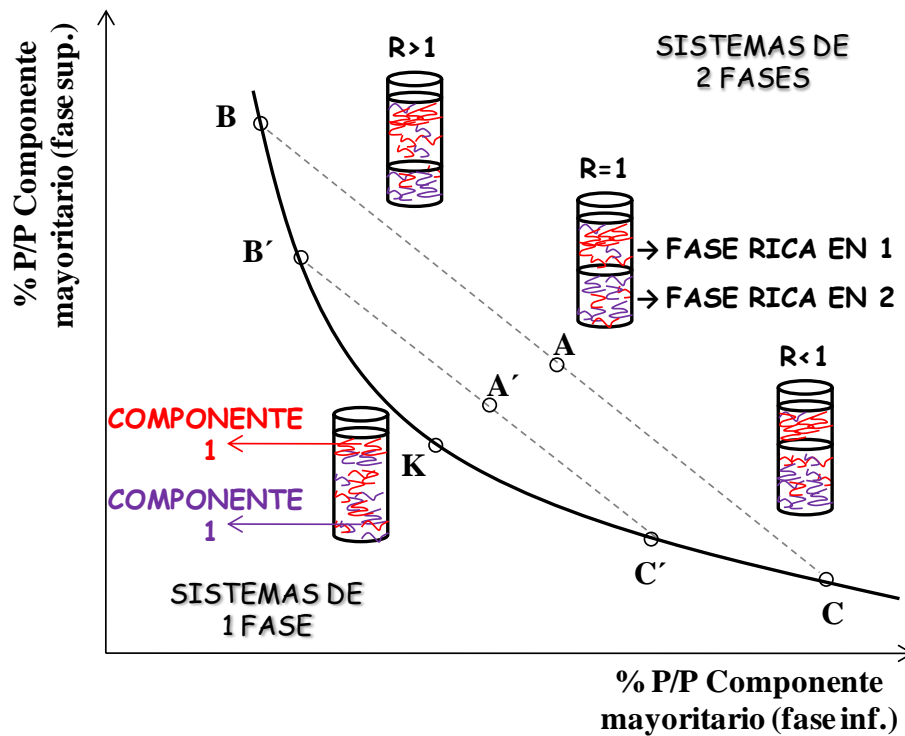


Figura 1.3: Representación esquemática de un diagrama de fase en SBAs

En este diagrama, el eje de las ordenadas generalmente representa el componente (polímero o sal) mayoritario en la fase superior, mientras que el eje de las abscisas el de mayor proporción en la fase inferior. La línea continua en la figura se denomina *curva binodial*.

Cualquier punto dentro de este diagrama representa una composición dada del sistema. Los puntos que se encuentran por encima de la curva binodial representan sistemas bifásicos, mientras que los puntos por debajo de la misma representan sistemas homogéneos de solo una fase. La composición total de una mezcla está representada en el punto A, mientras que los puntos B y C localizados sobre la curva binodial, denominados *nodos*, representan las composiciones de cada una de las fases coexistentes (superior e inferior, respectivamente) para dicho sistema. La línea que une los puntos B y C se denomina *tie line* (T.L.) o *línea de unión*, sobre la cual debe estar posicionado el punto A. Del mismo modo, sobre otra línea de unión, el sistema A' posee una composición de fase superior B' e inferior C'.

De esta manera, todas las mezclas de diferentes composiciones totales representadas por puntos que se encuentran sobre una misma línea de unión darán lugar a sistemas con fases de idéntica composición final aunque diferente relación de volúmenes (**R**) entre ellas.

El punto K se denomina *punto crítico* y corresponde a un sistema teórico en el cual las composiciones y los volúmenes de las fases son iguales.

2.3.2. Teoría del volumen excluido

Una molécula de soluto esférica de radio r excluirá al centro de masa de otra molécula de soluto de un cierto volumen (u), llamado *volumen excluido*, de manera que si se incorporan las moléculas de soluto una a una, la primera dispondrá de un volumen V para moverse, la segunda de un volumen $(V - u)$, la tercera de $(V - 2u)$ y así sucesivamente. Se define el volumen excluido de una molécula como el volumen que no puede ser ocupado por el centro de masa de una segunda molécula, como se ilustra en la figura 1.4:

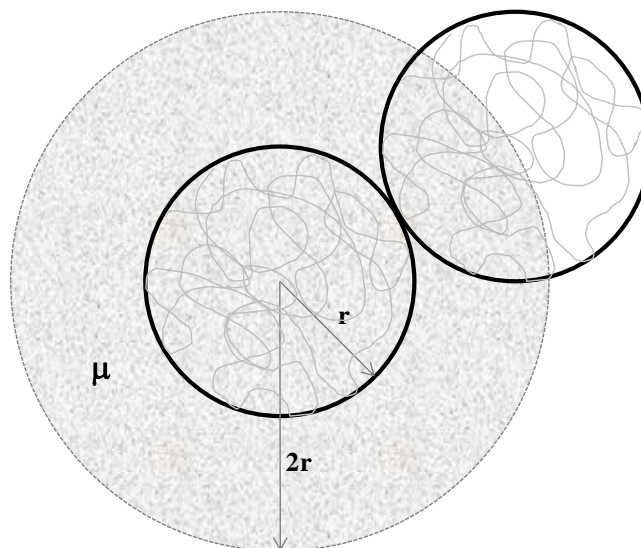


Figura 1.4: Representación esquemática del volumen excluido (u) por una macromolécula esférica de radio r .

En soluciones de macromoléculas, por ejemplo una mezcla de proteína y PCF, esta teoría predice que la probabilidad de encontrar el centro de masa de una molécula de polímero dentro del volumen definido por el radio de giro de otra molécula es esencialmente cero. A medida que la distancia desde el centro de masa se incrementa, aumenta la libertad para ubicar el segundo centro de masa. Cuando la distancia desde el primer centro de masa es el doble del radio de giro, la probabilidad de encontrar al

segundo centro de masa allí es prácticamente igual a la probabilidad de encontrarla en el seno de la solución.

El comportamiento de un PCF con respecto a la exclusión física de otras moléculas poliméricas se aproxima a la de una esfera sólida. Deben tenerse en cuenta otras consideraciones, ya que el volumen del cual un segmento de un polímero excluye a un segmento de otro polímero está íntimamente relacionado con la interacción entre segmentos dentro del mismo polímero. Además, es necesario mencionar que el volumen físico de exclusión no es el único factor en la interacción entre segmentos de distintos polímeros. En un buen solvente habrá una preferencia por las moléculas de solvente alrededor de los segmentos de los polímeros, lo que aumenta el volumen excluido para cada segmento. De la misma manera, en un solvente pobre, hay preferencia por contactos segmento-segmento, de manera que el efecto final es un volumen excluido menor (Tanford, 1.961).

2.3.3. Reparto en sistemas bifásicos acuosos. Factores que gobiernan la partición

Otra metodología de uso común para la obtención y purificación de enzimas, que también emplea PCF, se basa en el principio de reparto o partición en sistemas bifásicos acuosos.

Macromoléculas tales como proteínas se reparten entre las dos fases de un SBA de acuerdo a un coeficiente de reparto, Kr , el cual se define como:

$$Kr = \frac{[M]_{\text{sup}}}{[M]_{\text{inf}}} \quad (1.1)$$

siendo $[M]_{\text{sup}}$ y $[M]_{\text{inf}}$ las concentraciones de la macromolécula en la fase superior e inferior, respectivamente.

Cuando una mezcla de proteínas se agrega en un SBA, cada una de ellas se distribuirá de manera única entre las dos fases. Bajo condiciones óptimas, la proteína que se desea aislar deberá concentrarse en una de las fases mientras que el resto en la fase contraria, tal como ilustra la siguiente figura:

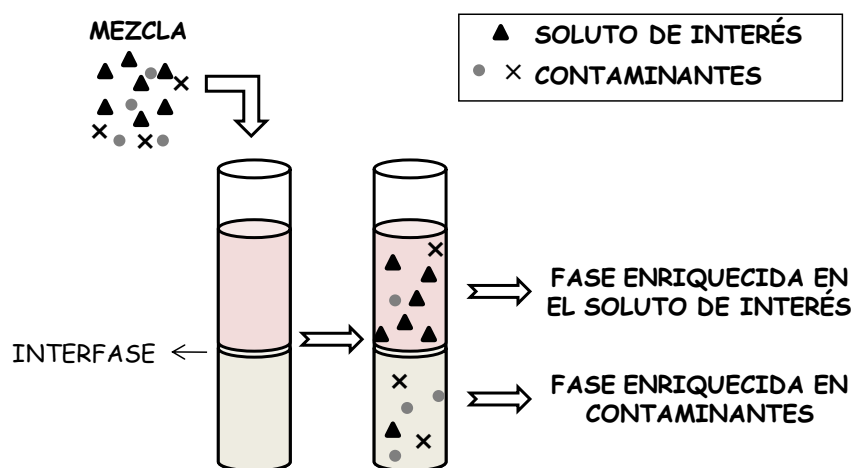


Figura 1.5: Esquema del reparto de solutos en SBAs.

Muchos factores afectan el reparto de un soluto en SBAs. Entre ellos se incluyen el tipo, peso molecular y concentración del PCF, tipo y concentración de cosolutos (por ejemplo sales), pH del medio, temperatura, etc., como así también factores inherentes al soluto que se reparte, como ser su peso molecular, carga, hidrofobicidad superficial, etc. Además, estos factores suelen ser mutuamente dependientes, por ejemplo, resulta casi imposible cambiar la temperatura del sistema sin afectar otros parámetros como la composición de polímero o sal en las fases.

Esto hace que no sea posible predecir el comportamiento de reparto de un soluto en SBAs, aunque existen ciertas generalizaciones informadas en la literatura que consideran el efecto de algunas de estas variables de manera separada (Zaslavsky, 1.995):

- *Composición polimérica de las fases:* Para un sistema cercano al punto crítico, las composiciones de ambas fases son similares y el soluto se distribuirá casi equitativamente entre ambas fases, con un Kr cercano a uno. Cuando la concentración total de polímero aumenta el sistema se aleja del punto crítico y el reparto del soluto será más asimétrico, es decir, Kr aumenta si es mayor a uno o disminuye si es menor a la unidad.

- *Peso molecular del polímero:* Generalmente al aumentar el peso molecular de un polímero que conforma un SBA se observa un efecto de exclusión del soluto hacia la fase donde dicho polímero se encuentra en menor concentración. De hecho, se han informado casos que verifican dicho efecto de exclusión estérica como factor determinante de la interacción entre polietilenglicol con proteínas, dado que al

incrementarse la masa molecular del polímero aumenta el volumen excluido por éste (Arakawa y Timasheff, 1.985; Lee y Lee, 1.981).

- *Agregado de cosolutos de bajo peso molecular:* El agregado de cosolutos iónicos, como sales inorgánicas, o no iónicos afecta fuertemente el reparto de solutos en SBAs fundamentalmente por el efecto que causan en la composición y propiedades de las fases o del soluto. Para este último caso, por ejemplo, si la molécula que se reparte es una proteína podría cambiar su conformación con la fuerza iónica o unirse al cosoluto, alterando las interacciones entre el soluto y el solvente y afectando su comportamiento de reparto. Cualquiera sea el caso, en muchas oportunidades el análisis resulta difícil, dada la imposibilidad de distinguir entre un efecto y otro.

- *Tamaño del soluto a repartirse:* En general, para moléculas de gran tamaño, como proteínas o ácidos nucleicos, cuanto mayor es su peso molecular más asimétrico será el reparto.

El tratamiento teórico del reparto de moléculas en SBAs podría acercarnos a predecir el comportamiento de partición en un dado sistema, a partir de las propiedades fisicoquímicas de los componentes y de las variables que afectan al proceso. Sin embargo, dada la enorme complejidad de estos sistemas, aun no se han logrado teorías que realicen dicha predicción, permitiendo simplemente describir el fenómeno una vez observado. Estos tratamientos pueden enfocarse en base a una extensión de la teoría de Flory-Huggins o en base a la expansión del modelo del virial (Zaslavsky, 1.995).

El reparto de solutos en SBAs es reconocida como una técnica eficiente de separación, versátil dada su capacidad de separar desde células y virus hasta proteínas u otros materiales solubles, como así también escalable para la industria. Es una técnica rápida y simple, con bajos costos de implementación y posibilita la concentración de la molécula de interés a través del control de los volúmenes de las fases. Además, por remoción de una de las fases se puede lograr una extracción continua, como también es posible que una de las fases funcione como medio de incubación de un bio-reactor para un microorganismo donde se expresa y la otra como receptor de la proteína de interés una vez excretada.

El diseño de una metodología óptima de separación requiere del conocimiento de las fuerzas que conducen el comportamiento de reparto de las moléculas entre ambas fases acuosas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, dada la complejidad de las macromoléculas biológicas y la gran cantidad de factores involucrados, dichos mecanismos suelen ser desconocidos en la mayoría de los casos. Esto hace que la

elección de las condiciones óptimas de separación de un producto biológico en particular depende de los resultados empíricos y de “ensayos de prueba y error” (Zaslavsky, 1.995; Albertsson, 1.971; Brooks y col., 1.985).

2.3.4. PCF empleado en esta Tesis: Polietilenglicol (PEG)

El *polietilenglicol* es un poliéter formado por unidades de etilenglicol, el cual se obtiene a través de una reacción catalizada de deshidratación del mismo o a partir de óxido de etileno. Es neutro, lineal o ramificado y no tóxico.

En la figura 1.6 se muestra la estructura química del polietilenglicol:

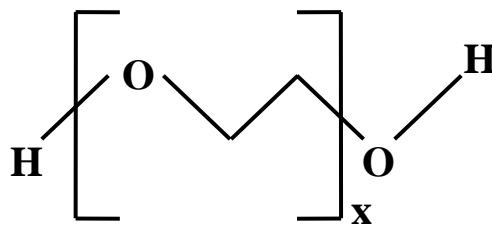


Figura 1.6: Representación esquemática de la estructura química del polietilenglicol

Según su grado de polimerización se obtienen PEGs de distintos pesos moleculares promedio, los cuales poseen características físicas diferentes: los PEGs de pesos moleculares menores a 1.000 son líquidos viscosos casi incoloros, mientras que los de mayor tamaño son sólidos cristalinos a temperatura ambiente, con puntos de fusión proporcionales a sus pesos moleculares.

Es altamente soluble en agua debido a su carácter anfipático, estructurando moléculas de agua alrededor de su cadena etilénica hidrofóbica y formando puentes de hidrógeno con al menos dos o tres moléculas de agua a través del puente oxígeno. Es decir, es una molécula muy hidratada llegando a estructurar alrededor de 16 moléculas de agua por unidad monomérica (Zaslavsky, 1.995).

En solución acuosa muestra una gran movilidad y volumen excluido.

A elevadas temperaturas las soluciones acuosas de PEG pueden separarse en dos fases: una enriquecida y la otra empobrecida en el polímero. Esto podría deberse a la ruptura de la capa de agua estructurada alrededor del PEG, debido a un incremento en la movilidad térmica. A mayores temperaturas aun, cuando la capa de agua estructurada ha desaparecido totalmente, el PEG y el agua podrán volverse miscibles nuevamente.

Sus hidroxilos terminales y grupos éter, levemente ácidos y básicos respectivamente, brindan sitios adecuados para interactuar con restos aminoacídicos laterales de las proteínas, si bien las características de tales interacciones no han sido aún totalmente exploradas.

El PEG es de gran utilidad en biotecnología. Por ejemplo, para la administración de fármacos y modificación de superficies para favorecer su antiadherencia, como en la fabricación de hidrogeles. También puede unirse a moléculas insolubles (por ejemplo, fármacos) haciendo que el producto PEG-molécula sea soluble. Los PEG de bajo pesos molecular son muy empleados como disolventes no volátiles (Harris, 1.992).

3. Proteína en estudio: Alfa-amilasa

La enzima alfa-amilasa se encuentra presente en casi todos los organismos vivos, desde células procariotas (bacterias del género *Bacillus*, *Escherichia*, etc.) y eucariotas (origen fúngico del género *Aspergillus*, *Saccharomyces*, etc.), hasta plantas superiores (maíz, trigo, cebada, etc.) artrópodos (*Drosophila*) y mamíferos (cerdos, ratones, humanos, etc.).

La enzima alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* (α -1,4-glican 4-glicanohidrolasa; EC 3.2.1.1), también llamada Taka amilasa A (α -Amy), pertenece a la familia 13 en la clasificación de glicosilhidrolasas, según Henrissat (Henrissat, 1.991).

Esta enzima es una glicoproteína que cataliza la hidrólisis de la cadena de amilosa y amilopectina del almidón, rompiendo enlaces α (1,4) interiores (endoamilasa) para dar lugar a una mezcla de dextrinas.

El almidón (principal forma de almacenamiento de hidratos de carbono en plantas) consiste en un polímero de α -glucosa formado por una mezcla de dos polisacáridos muy similares: amilosa y amilopectina. Ambas formas son polímeros de glucosa unidas por enlaces α -D-1,4 que se diferencian por el grado de ramificación, dado que la primera es una cadena casi lineal mientras que la segunda presenta ramificaciones de 20 a 30 subunidades unidas a la cadena lineal por enlaces α -D-1,6 (Kuriki e Imanka, 1.999).

α -Amy es una enzima extremadamente estable dentro del rango de pH entre 5,00 y 8,00, posee un punto isoeléctrico de 4,20 y una temperatura óptima que puede variar entre 35 y 55°C en función de la cepa que la produce. Su peso molecular es aproximadamente 50 kDa, requiere Ca^{2+} y Cl^- como estabilizadores y éste último

además como activador, ya que se ha informado un sitio de unión a este anión el cual provocaría un cambio conformacional que enriquece su actividad. El ion Ca^{2+} se une a un sitio principal en el centro activo que estabiliza estructuralmente a la enzima y favorece el mantenimiento de su actividad catalítica. Esta unión es tan fuerte que en presencia del agente quelante etilén diamino tetraacetato (EDTA) la enzima mantiene prácticamente intacta su actividad hidrolítica. Sin embargo, un exceso de este ion disminuiría su actividad ya que involucra a un sitio de unión con residuos catalíticos de la enzima.

Entre algunos de los inhibidores de α -Amy informados en bibliografía se encuentran el citrato, la urea y otros reactivos amida (Fischer y de Montmolin, 1.951; Muralikrishna y Nirmala, 2.005; Carlsen y col., 1.996; Janecek y Balaz, 1.992; Raviyan y col., 2.003; MacGregor y col., 2.001).

3.1. Estructura tridimensional

La alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica de 478 aminoácidos cuya estructura tridimensional ha sido investigada en profundidad mediante cristalografía de rayos X (Matsura y col., 1.984; Swift y col., 1.991).

La molécula está plegada en dos dominios principales: uno amino terminal (del residuo 1 al 380) a su vez subdividido en dos subdominios A y B. El dominio A (del residuo 1 al 121 y 177 al 380) está plegado en una estructura supersecundaria de barril $(\alpha/\beta)_8$, donde ocho α -hélices rodean a ocho laminas β , en su mayoría paralelas, que conforman el barril. El dominio B (del residuo 122 al 176) se encuentra entre la tercera lámina β y la tercera α -hélice del dominio A y contiene tres hojas β antiparalelas y una región de menor regularidad estructural. Los residuos carboxilo terminales (del residuo 384 al 478) conforman el dominio C, el cual se pliega en ocho láminas β en sándwich antiparalelo y se encuentra unido al dominio amino terminal a través de una cadena polipeptídica compuesta principalmente por residuos hidrofóbicos (Matsura y col., 1.984; Swift y col., 1.991; Kuriki e Imanaka, 1.999).

Hacia el extremo carboxilo terminal del barril $(\alpha/\beta)_8$ paralelo del dominio A se localiza una gran hendidura donde se halla el sitio activo de la enzima. Allí se encuentra el sitio de unión a Ca^{2+} principal que podría ser esencial para la integridad estructural del mismo y el segundo sitio de unión a este metal que implica a un residuo de ácido glutámico en posición 230, perteneciente al centro activo, lo que justifica que un exceso

de Ca^{2+} reduzca la actividad catalítica de la alfa-amilasa por bloqueo del mismo, como ya se mencionó previamente en la Sección 3 de Introducción (Boel y col., 1.990).

La estructura tridimensional de la proteína se halla estabilizada por cuatro uniones disulfuro que ligan los residuos de cisteína 30-38, 150-164, 240-283 y 439-474 (Matsura y col, 1.984).

La cadena de oligosacárido de esta glicoproteína se encuentra covalentemente unida al residuo de asparagina 197 (Matsura y col., 1.984).

En la figura 1.7 se muestra un esquema representativo de la estructura tridimensional de la enzima:

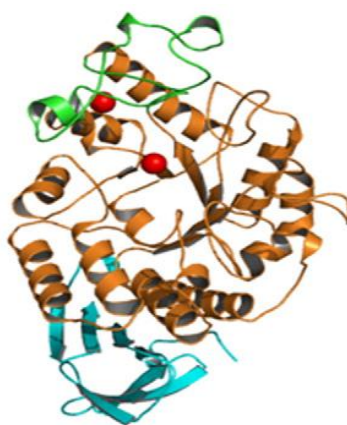


Figura 1.7: Esquema de la estructura tridimensional de la alfa-amilasa de Aspergillus oryzae. Los colores representan los diferentes dominios estructurales de la enzima: A (marrón), B (verde) y C (celeste). Las esferas rojas representan los iones Ca^{2+} unidos en el sitio de unión principal (superior) y secundario (inferior).

(Fuente: Kumari y col., 2.010).

3.2. Unión al sustrato y mecanismo de catálisis

El modelo de unión al sustrato propuesto por Matsura y col. (Matsura y col., 1.984) involucra siete residuos de glucosa contiguos en el almidón, que deben unirse en una configuración curvada para dar lugar a una unión productiva. Esta curvatura puede ser preferida por la cadena de amilosa que tiene tendencia a adoptar una configuración helicoidal.

Las principales fuerzas atractivas entre el sustrato y la molécula de α -Amy son interacciones dipolo-dipolo entre la amilosa y el barril- β paralelo. A su vez, las ocho cadenas de α -hélice que lo rodean se encuentran arregladas antiparalelamente con respecto a las láminas β centrales, provocando un gran campo electrostático debido a los fuertes dipolos de las hélices. De esta forma, todo el campo electrostático formado por

la superestructura $(\alpha/\beta)_8$ serviría como un amplio campo atractivo al sustrato, influenciando no solo la unión a éste sino también la reacción catalítica en su totalidad, incluyendo el estado de transición de la reacción y la liberación de los productos.

Muchos de los residuos de aminoácidos pertenecientes al sitio de unión al sustrato y los que directamente participan en la catálisis se encuentran conservados entre los miembros de la familia de alfa-amilasas, dado que todos comparten el mismo mecanismo de acción (Mc. Gregor y col, 2.001; Kuriki e Imanaka, 1.999). En particular, histidina 296, 122 y 210, aspartato 297 y 206, glutamato 230, valina 231, lisina 209 y tirosina 155 están conservados entre la alfa-amilasa pancreática porcina y de *Aspergillus oryzae* (Matsura y col., 1.984).

Los posibles residuos catalíticos de la α -Amy se encuentran localizados a una distancia de aproximadamente 3 Å del oxígeno glucosídico entre la cuarta y quinta glucosa para romper dicho enlace entre azúcares. Es decir, entre estos residuos se encontraría el sitio de clivaje del sustrato (Matsura y col., 1.984).

La reacción catalítica se lleva a cabo a través de un mecanismo ácido-base, donde el glutamato 230 es el dador de protones y el aspártico 206 actúa de nucleófilo. El rol del segundo aspártico (297) en este mecanismo no ha sido totalmente dilucidado, pero se sugiere que podría estabilizar el estado de transición de la reacción y mantendría al ácido glutámico en el estado de protonación adecuado para la catálisis. Este es un mecanismo de doble desplazamiento, donde el producto mantiene la misma configuración anomérica del sustrato (Mc. Gregor y col., 2.001; Kuriki e Imanaka, 1.999).

3.3. Aplicaciones industriales

El uso de amilasas en la hidrolisis del almidón data del siglo nueve d. C., donde se empleaba malta para convertir el almidón de las raíces en edulcorante. Los extractos de malta precipitados producían azúcar, pero en aquellos tiempos se desconocía el material responsable de esta reacción, denominándolo “*diastasa*” (del término francés “*separación*”), surgiendo, más adelante, el término genérico de “*amilasas*” para las diastasas.

Actualmente, la alfa-amilasa es una enzima de gran importancia económica ya que es utilizada en numerosas aplicaciones industriales y en campos muy diversos.

La despolimerización del almidón llevada a cabo por alfa-amilasa de diferentes fuentes es la base de muchos procesos industriales tales como la preparación de sueros

de glucosa, edulcorantes, cerveza, etanol, bebidas alcohólicas y panificaciones. También se emplea como aditivo en jabones, detergentes y en alimentos balanceados para animales. Es utilizada en la industria farmacéutica (dada su actividad antidiarreica y antiinflamatoria), en la industria papelera y en la textil para eliminar el encolado que recubre a los hilos (Muralikrishna, 2005).

4. Interacción proteína-PCF

Dado que las mismas fuerzas que conducen la interacción de las proteínas con los PCF pueden estar involucradas en la estabilización de la estructura proteica, la misma puede desestabilizarse luego de su asociación al polímero, provocando cambios estructurales.

Estos cambios conformacionales pueden o no afectar la funcionalidad de una enzima, dependiendo de si altera o no la conformación del sitio activo o los sitios de unión al sustrato.

El estudio de las posibles reorganizaciones conformacionales de la proteína y la preservación de su estructura nativa es importante para un buen entendimiento de la estabilidad y viabilidad de los sistemas estudiados en este trabajo de Tesis.

4.1. Técnicas empleadas para estudiar la interacción proteína-PCF

4.1.1. Turbidimetría

En los estudios turbidimétricos, la luz transmitida (T) a través de una cubeta de longitud l que contiene una solución o dispersión está dada por:

$$T = \frac{I}{I_0} = \exp(-\tau l) \quad (1.2)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de luz emitida y τ la turbidez. De acuerdo con la teoría de Rayleigh (Eisenberg y Crothers, 1979), la intensidad de luz dispersada es proporcional al cuadrado de la masa de las partículas. De esta manera, la formación de estructuras supermoleculares o agregados intermoleculares y el aumento en la masa de las partículas está acompañada de un incremento en la dispersión de la luz visible o ultravioleta, comúnmente llamada turbidez.

Las sensibilidad de las medidas de turbidez son adecuadas en esquemas de titulación para determinar, por ejemplo, el pH de precipitación de una mezcla de proteína y polielectrolito, hacer un seguimiento cinético de la precipitación o incluso detectar la formación de complejos solubles a través de pequeños incrementos en la densidad óptica de una solución (Tsetska, 2.001).

Las mediciones de turbidez son simples, no invasivas y pueden dar información preliminar en un modo rápido y bastante certero sobre la formación de complejos entre proteínas y polímeros.

4.1.2. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La caracterización termodinámica en las reacciones de fijación (*binding*) de ligandos a macromoléculas es importante para incrementar nuestros conocimientos en el reconocimiento biomolecular y en la naturaleza de las interacciones y es parte esencial en la profundización de numerosos procesos biológicos (Romanini y col., 2.007).

La calorimetría de titulación isotérmica es un método de elección a la hora de abordar dichos estudios, debido a que permite medir de manera directa el intercambio de calor (a presión constante) involucrado durante la reacción. Entre otras ventajas se pueden destacar: su elevada sensibilidad, rapidez y la realización de medidas directas sin necesidad de modificación química o inmovilización. Además permite, en un mismo experimento, obtener información no sólo sobre la variación entálpica (ΔH°) de la fijación sino también de la afinidad, estequiometría, variación de energía libre (ΔG°) y variación de entropía (ΔS°) del proceso.

El calorímetro de titulación *VP-ITC MicroCal, USA*, funciona por medio de un sistema de *feedback* que censa diferencias de calor entre las celdas de referencia y de muestra. La temperatura entre ambas celdas es monitoreada y mantenida constante a través de un sistema de retroalimentación (o compensación) que da lugar a una potencia que origina la línea de base en ausencia de reacción. Al ocurrir cualquier efecto térmico se producirá un cambio en la temperatura de la celda que contiene la muestra provocando una diferencia de temperatura con la celda de referencia, apartando transitoriamente la potencia de compensación del valor estacionario. Esto es detectado por el calorímetro, el cual ajusta el potencial del sistema de *feedback* para compensarlo. Las reacciones exotérmicas dispararán una disminución temporal en la potencia de retroalimentación, mientras que las endotérmicas originarán un aumento en la misma. El

calor liberado o absorbido por la reacción es obtenido por integración de los picos provocados por estas deflexiones en la línea de base, respecto del tiempo.

En la figura 1.8 se muestra un esquema del calorímetro empleado junto con curvas de ITC representativas para interacciones exotérmicas y endotérmicas:

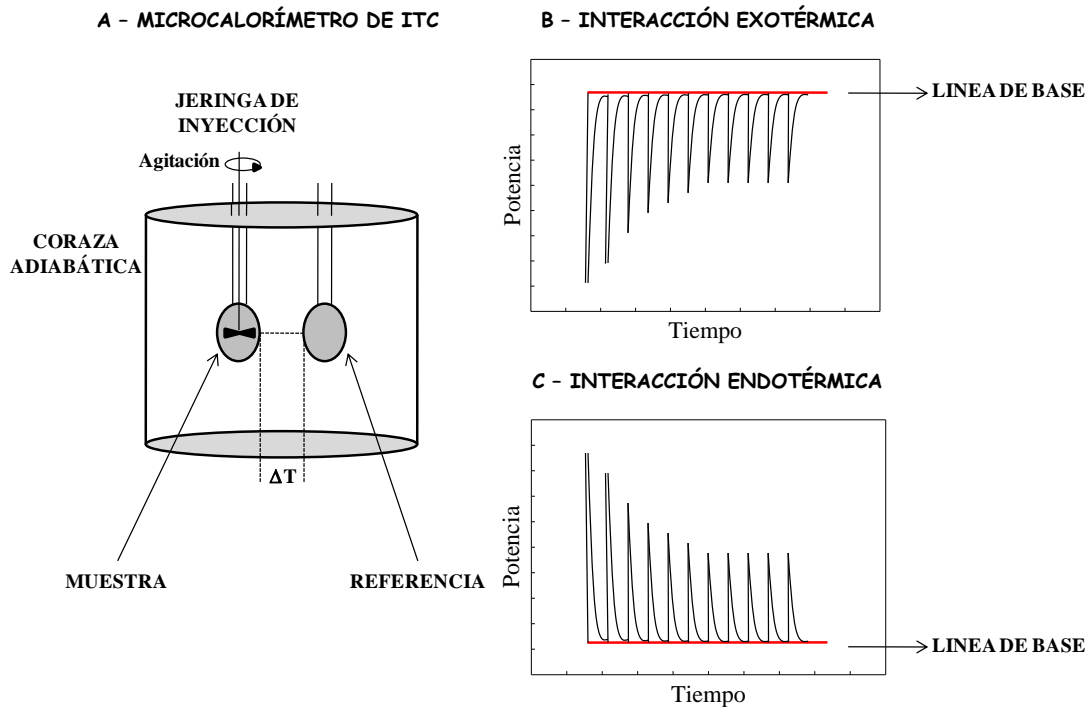


Figura 1.8: A- Esquema del microcalorímetro de ITC. Isotermas representativas obtenidas por ITC para una interacción exotérmica (B) y endotérmica (C).

Un experimento típico de ITC consiste en inyectar el ligando por medio de una jeringa en la celda conteniendo la macromolécula, con ambas soluciones preparadas en el mismo medio *buffer*. El efecto térmico observado será el resultado de numerosas fuentes de calor, tales como: la reacción de *binding*, la dilución de la macromolécula y del ligando y cualquier otro proceso concomitante que pueda contribuir al calor total generado o absorbido. La inespecificidad intrínseca en la detección del efecto térmico y consecuentemente la incapacidad de la titulación calorimétrica para identificar el proceso que origina el calor hace necesario la realización de controles:

$$\Delta H^{\circ}_{\text{int}} = \Delta H^{\circ}_{\text{tot}} - \Delta H^{\circ}_{\text{dil}} - \Delta H^{\circ}_{\text{disol}} \quad (1.3)$$

donde $\Delta H^{\circ}_{\text{int}}$ es calor asociado a la interacción en estudio, $\Delta H^{\circ}_{\text{tot}}$ el calor total medido, $\Delta H^{\circ}_{\text{dil}}$ el calor de dilución de la macromolécula y $\Delta H^{\circ}_{\text{disol}}$ el calor de disolución del ligando.

Finalmente, la obtención de los parámetros de la fijación se logra a través del ajuste no lineal de los datos experimentales al modelo de *binding* que gobierna cada proceso.

En general, las interacciones proteína/ligando que no presentan cooperatividad (ni positiva ni negativa) se describen adecuadamente a través del **modelo de unión de sitios independientes y equivalentes** (Pellegrini Malpiedi y col., 2.010; Zhou y col, 2.004, Velázquez Campoy, 2.006; Jha y Kishore, 2.009; Zakariassen y Sørli, 2.007; El Harrou y Parody-Morreale, 1.997). El término **independientes** implica que la unión a un sitio cualquiera no afecta la afinidad de los restantes y **equivalentes** o **idénticos** significa la misma constante de unión microscópica a cualquiera de los sitios presentes.

El análisis termodinámico estadístico de un proceso de unión con estas características muestra que la función de partición de unión, que describe las poblaciones de los diferentes estados moleculares accesibles del sistema, es:

$$Z = (1 + K[L])^n \quad (1.4)$$

donde K es la **constante microscópica aparente del equilibrio de unión**, $[L]$ la concentración de ligando libre y n es el **número de sitios de unión de la macromolécula para el ligando**.

La razón de la concentración de ligando unido $[L]_b$, a la concentración de macromolécula total, $[M]_T$, conocida como **parámetro de unión**, está relacionada con la función de partición de unión por:

$$\bar{v} = \frac{[L]_b}{[M]_T} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln [L]} \quad (1.5)$$

Por consiguiente, la concentración de ligando unido por mol de macromolécula para un sistema representado por el modelo de n sitios idénticos e independientes será:

$$\bar{v} = \frac{nK[L]}{1 + K[L]} \quad (1.6)$$

Suponiendo, en principio, que no existen otros procesos concomitantes, en una inyección cualquiera de la serie el calor liberado o absorbido será:

$$q_i = \Delta H^\circ \left(\frac{\text{kcal}}{\text{molL}_b} \right) \cdot \Delta(\text{molesL}_b) \quad (1.7)$$

donde L_b representa el ligando unido y ΔH° es el *cambio de entalpía por mol de ligando unido*. Si V_c representa el volumen de la celda que coincide con el volumen inicial de la muestra, la ecuación anterior puede expresarse más explícitamente como:

$$q_i = \Delta H^\circ \cdot V_c ([L]_{b,i} - [L]_{b,i-1}) = \Delta H^\circ \cdot V_c (\bar{v}_i \cdot [M]_i - \bar{v}_{i-1} [M]_{i-1}) \quad (1.8)$$

Considerando, en aproximación, que el volumen efectivo que interviene en la reacción es aquel que llena la celda y por consiguiente las concentraciones de macromolécula y ligando actuales en la celda han de corregirse por las pequeñas cantidades de estos componentes contenidas en el volumen desplazado fuera de la celda, así la concentración actual de M en la celda será:

$$[M]_i = [M]_{i-1} \cdot \frac{V_c - V_{in}}{V_c} \quad (1.9)$$

y la concentración total de ligando en la celda de reacción será:

$$[L]_{T,i} = \frac{(V_c - V_{in})[L]_{T,i-1} + V_{in}[L]_0}{V_c} \quad (1.10)$$

donde V_{in} y $[L]_0$ son el volumen de inyección y la concentración en la jeringa del ligando, respectivamente.

El calor total acumulado después de N inyecciones, Q , será:

$$Q = \sum_{i=1}^N q_i = Vc[M]_N \Delta H^\circ \bar{v}_N = Vc[M]_N \Delta H^\circ \frac{nK[L]}{1 + K[L]} \quad (1.11)$$

En ITC el valor de la variable [L] no es conocida por lo que operativamente conviene expresarla en función de las variables experimentales $[L]_T$ y Q :

$$[L] = [L]_T - [L]_b = [L]_T - \frac{Q}{Vc\Delta H^\circ} \quad (1.12)$$

Sustituyendo [L] en la ecuación (1.11) por la expresión (1.12) se obtiene una ecuación de segundo orden en Q cuya solución es:

$$Q = \frac{Vc\Delta H^\circ}{2K} \left[1 + K[L]_T + nK[M]_T - \sqrt{(1 + K[L]_T + nK[M]_T)^2 - 4nK^2[M]_T[L]_T} \right] \quad (1.13)$$

Esta expresión relaciona el calor total acumulado luego de N inyecciones con las variables experimentales: Vc , $[L]_T$ y $[M]_T$, y permite obtener, a partir del ajuste no lineal de los datos experimentales, los parámetros K , n y ΔH° (Kim y col., 2.006; Gill y col., 1.990).

4.1.3. Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopía de absorción UV-Vis es una técnica que se basa en el cambio de configuración electrónica molecular del estado fundamental a un estado excitado debido a la absorción de radiación electromagnética UV-Vis, empleando como fuente luz no polarizada.

Las transiciones electrónicas en moléculas se presentan en forma de bandas. En moléculas pequeñas en fase gaseosa es posible observar la estructura fina vibracional de las bandas electrónicas. En cambio, en moléculas más complejas la multiplicidad de los niveles vibracionales hace que el gran número de transiciones de similar energía produzca bandas de absorción continuas sin estructura fina vibracional evidente. Esto es también lo usual cuando se registran los espectros de absorción UV-Vis en fases condensadas (soluciones, sólidos).

Las principales características de una banda de absorción son:

- La **posición** de la banda, dada por el máximo de absorción, depende de la energía de la transición y se reporta usualmente como $\lambda_{\text{máx}}$ (longitud de onda de máxima absorción).

- La **intensidad** de una banda de absorción, que puede expresarse como absorptividad molar en el máximo ($\epsilon_{\text{máx}}$) o intensidad integrada. Esta intensidad depende del cuadrado del momento dipolo de la transición (cambio en la distribución de cargas eléctricas durante la transición). Se producen absorciones intensas cuando una transición es acompañada por un gran cambio en la distribución de las cargas.

- El **ancho** de una banda de absorción electrónica, el cual depende del número e intensidad de los componentes vibracionales de la transición correspondiente.

La espectroscopía UV-Vis se emplea habitualmente en la determinación cuantitativa de cromóforos a través de la Ley de Lambert Beer (Castellan, 1.987), como también en análisis descriptivos, por ejemplo, para la identificación de cromóforos. La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos.

Los residuos aromáticos de las proteínas absorben en la región UV del espectro originando una banda principal alrededor de los 280 nm. La orientación relativa y las interacciones entre ellos afectan la energía y la intensidad de la absorción.

La espectroscopía UV-Vis se ha empleado en el campo de la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos desde hace mucho tiempo. Sin embargo el desarrollo de otros métodos más potentes ha reducido su margen de aplicación principalmente en la cuantificación y detección de compuestos, aunque puede emplearse para obtener información sobre conformación de proteínas en solución. (Thomas, 2.008).

4.1.4. Espectroscopía de fluorescencia (F)

La fluorescencia es un proceso de emisión que surge como resultado de la excitación de las moléculas por absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas regresan al estado fundamental liberando su exceso de energía como fotones. El fotón emitido por F tiene menor energía que el absorbido, por lo tanto, posee una frecuencia menor y emite a una longitud de onda mayor.

La fluorescencia nativa de las proteínas se debe a los aminoácidos aromáticos que son fluoróforos naturales presentes en la mayoría de ellas: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp). El rendimiento cuántico de la Phe es muy pequeño, lo que hace que la contribución a la emisión de F de este residuo sea muy pobre y raramente pueda observarse. Al excitar una proteína a 280 nm, la emisión de F será dominada por la del Trp, debido al fenómeno de transferencia de energía entre Tyr y Trp (Lakowicz, 1.983).

La emisión de F del Trp es muy sensible a la polaridad del solvente: la longitud de onda de máxima emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) se desplaza hacia menores valores a medida que la polaridad del solvente disminuye y hacia mayores λ al encontrarse en un entorno más polar. Por lo tanto, esta puede reflejar la polaridad del entorno que rodea a estos residuos. Esto significa que el máximo de emisión de F de las proteínas puede ser dependiente de aquellos factores que afectan la exposición de los Trp al solvente.

La emisión del Trp también es sensible a la unión a sustratos, a reacciones de asociación con ligandos u otras macromoléculas y a procesos de desnaturalización.

Todo proceso que disminuye la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo se denomina “extinción de la fluorescencia o *quenching*” y *quencher* a la sustancia que provoca tal extinción. Por lo tanto, a través de medidas de *quenching* de la fluorescencia es posible determinar la accesibilidad de los fluoróforos.

Existen distintos tipos de *quenching* según la causa que lo origine: encuentros colisionales, *quenching dinámico*, o formación de complejos no fluorescentes, *quenching estático*, entre el fluoróforo y el *quencher*.

La ecuación de Stern-Volmer (1.14) que describe al *quenching* colisional es:

$$\frac{I_{f_0}}{I_f} = 1 + K_D [Q] \quad (1.14)$$

siendo I_{f_0} e I_f las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del *quencher*, respectivamente, $[Q]$ la concentración de *quencher* y K_D la constante de Stern-Volmer, la cual es el producto del tiempo de vida media del fluoróforo y la constante de *quenching* bimolecular. Además, K_D^{-1} es la concentración de *quencher* a la cual $I_{f_0}/I_f = 2$ o bien el 50% de I_f es extinguida, es decir que a mayor K_D se necesita menos

quencher para extinguir la fluorescencia, lo que significa que hay una mayor afinidad entre el *quencher* y el fluoróforo.

Un gráfico lineal I_{f0}/I_f vs $[Q]$ generalmente indica la existencia de una sola población de fluoróforos, todos igualmente accesibles al *quencher*. Si existen dos poblaciones de fluoróforos y una de ellas no es accesible al mismo, la gráfica de Stern-Volmer se desvía de la linealidad hacia el eje de las abscisas. Este último caso ocurre frecuentemente en proteínas para el *quenching* de los residuos de Trp por *quenchers* polares o cargados. Este tipo de *quenchers* no pueden penetrar el interior hidrofóbico de las proteínas y sólo afectará a la población de Trp expuesta en la superficie. Este comportamiento es descrito por la ecuación de Stern-Volmer modificada (1.15):

$$\frac{I_{f0}}{I_{f0} - I_f} = \frac{1}{f} \frac{1}{K_D[Q]} + \frac{1}{f} \quad (1.15)$$

donde f es la fracción de Trp accesibles al *quencher*.

Para el *quenching* estático, la relación entre I_f y $[Q]$ (ecuación 1.16) es idéntica al caso del *quenching* dinámico, excepto que la constante de *quenching* es la constante de asociación entre el *quencher* y el fluoróforo, K_s :

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = 1 + K_S[Q] \quad (1.16)$$

Frecuentemente, cuando el *quenching* es de gran magnitud se observan desviaciones positivas de la ecuación de Stern-Volmer. Este fenómeno se interpreta a través del **modelo de esfera de acción**, el cual indica que existe una esfera de volumen v alrededor del fluoróforo dentro de la cual la probabilidad de *quenching* es unitaria. La ecuación de Stern-Volmer modificada que describe tal situación es la siguiente:

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = (1 + K_D[Q])e^{([Q]vN/1000)} \quad (1.17)$$

N es el número de Avogadro y el término exponencial el número de moléculas de *quencher* en la esfera (Lakowicz, ,1.983).

La acrilamida es un *quencher* que tiene la capacidad de penetrar en el interior de las proteínas, siendo accesible a todos los residuos de Trp (superficiales o no).

4.1.5. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

Cuando se hace incidir luz polarizada en el plano sobre una sustancia quiral, ésta desvía su plano de polarización. Si esta sustancia absorbe, cada uno de los haces de luz polarizada circularmente hacia la derecha o izquierda son absorbidos de diferente manera y esta diferencia de absorción se denomina *dicroísmo circular*. Los espectros de DC generalmente son expresados en términos de *elipticidad* o *elipticidad molar*.

La espectroscopía de dicroísmo circular es una de las técnicas más sensibles para determinar estructuras y monitorear cambios estructurales en biomoléculas.

En proteínas, el DC en el UV-cercano refleja las contribuciones de los residuos aromáticos, puentes disulfuro y grupos protéticos. Dado que estos pueden encontrarse distribuidos por toda la molécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína, es decir, depende del plegamiento de la misma (estructura terciaria).

El DC de proteínas en la región del UV-lejano se debe, en cambio, principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros, etc.). De acuerdo al tipo de estructura secundaria, se obtienen distintos patrones de acoplamiento, distancias y orientaciones características en estos cromóforos que darán lugar a un espectro de DC característico.

Se ha propuesto una clasificación para las proteínas de acuerdo a su estructura secundaria: *todo alfa*, poseen sólo estructuras del tipo α -hélice; *todo beta*, poseen casi exclusivamente hojas β ; $\alpha+\beta$, poseen hélices α y hojas β en dominios separados; α/β , poseen segmentos mixtos que alternan a lo largo de la cadena polipeptídica entre estructuras tipo α -hélice y hojas β ; y por último las proteínas desordenadas o con pocos elementos de estructuración secundaria. En la realidad, las proteínas suelen estar lejos de estos modelos ideales, por lo cual asignar las estructuras secundarias presentes en proteínas suele ser una tarea complicada (Fasman, 1.996).

Existen varios métodos para calcular el contenido de estructura secundaria en proteínas a partir de los resultados de DC, que se basan en diferentes algoritmos matemáticos y emplean proteínas de referencia con estructura conocida por cristalografía. Sin embargo, en muchas oportunidades estos métodos no logran resolver de manera segura la estructura secundaria de proteínas y no son comparables entre sí de acuerdo al set de proteínas de referencia empleado. Además, los supuestos en los que se fundamentan muchas veces no son correctos o pueden ser fuentes de error (Sreerama y Woody, 2.000; Sreerama y col., 2.000; Khrapunov, 2.009).

Aun así, la espectroscopía de DC es una de las técnicas más empleadas para evaluar la conformación de proteínas en solución, debido a sus grandes ventajas en cuanto a sensibilidad, simpleza, rapidez y por permitir un análisis descriptivo de los espectros más allá de obtener o no resultados cuantitativos.

4.1.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica adecuada para estudiar la energética de las transiciones de plegamiento-desplegamiento de las proteínas inducida por temperatura, permitiendo una caracterización termodinámica o cinética de los cambios conformacionales.

El calorímetro mide la capacidad calorífica (C_p) relativa del sistema cuando sufre una transición inducida por un cambio térmico. El mismo contiene una celda de referencia (donde se coloca el *buffer* de trabajo) y una donde se coloca la muestra, ambas fijadas en el interior de una coraza cilíndrica adiabática, y produce un calentamiento simultáneo a una velocidad predeterminada. Cuando se produce la transición nativo (N) \rightarrow desnaturalizado (D) la muestra absorbe parte del calor que se suministra de manera que la temperatura en la celda de muestra será temporalmente menor a la de la celda de referencia. El calorímetro censa esta variación de temperatura y para compensarla suministra una potencia calorífica adicional o en exceso que será proporcional a la variación en la capacidad calorífica entre ambas celdas.

Esto se traduce en un termograma de C_p vs. T, que por lo general consiste en una curva con una transición, en forma de pico endotérmico, que se debe a la absorción de calor asociado con la desnaturalización. En algunos casos, se obtienen varios picos correspondientes a distintas transiciones durante el proceso de desnaturalización. Los parámetros que caracterizan las transiciones son la *entalpía calorimétrica* (ΔH_{cal}), que corresponde al área debajo de la curva de C_p vs. T; la *temperatura de melting* (T_m),

que es la temperatura en el máximo de la transición y el ΔC_p , el cual es la diferencia de C_p entre el estado nativo (C_p^N) y el desnaturalizado (C_p^D).

En la figura 1.9 se muestra un esquema representativo de un calorímetro diferencial de barrido junto con un termograma típico de una única transición:

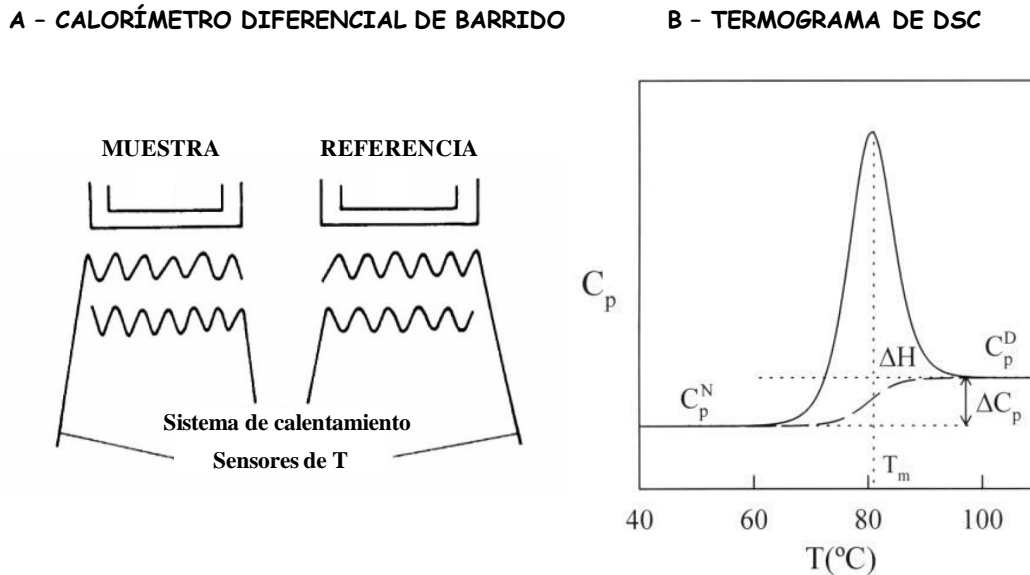


Figura 1.9: A- Esquema de un calorímetro diferencial de barrido. B- Termograma de DSC de una única transición para la desnaturalización térmica de una proteína hipotética. (Fuente: <http://www.ugr.es/~proyecto08173/qbiofisica/APUNTES%20Y%20NOTAS/Tema%205%20-%20Equilibrio%20conformacional/Metodos%20experimentales%20DSC/Fundamentos DSC.pdf>).

En una experiencia de DSC se realizan barridos sucesivos luego de los cuales es posible comprobar la existencia de reversibilidad en la transición, lo que suele expresarse en términos de porcentaje del área bajo la curva que se recupera en el segundo barrido. Esto es de relevancia para un análisis posterior de los datos, dado que no es posible aplicar un análisis basado en la termodinámica de equilibrio si el proceso observado es irreversible y no transcurre en equilibrio termodinámico. Por lo tanto, la información que se puede obtener de un experimento de DSC es diferente cuando el proceso está en equilibrio durante todo el barrido de temperatura o está controlado cinéticamente (Privalov y Khechinashvili, 1.974; Privalov y Potekhin 1.986; Privalov y Filimonov, 1.978; Mabrey y Sturtevant, 1.977; Bach y Chapman, 1.980).

A continuación se resume brevemente los modelos más empleados para el análisis de los termogramas de DSC:

Modelo de equilibrio de dos estados:

Para algunas proteínas pequeñas globulares tales como ribonucleasa A pancreática, lisozima de clara de huevo de gallina, nucleasa estafilocócica, mioglobina y citocromo C (Privalov y col., 1.989; Ladbury y Chowdhry, 1.998) se observa que en el proceso de desplegamiento existen únicamente dos estados significativamente poblados: el estado nativo (N) y el desnaturalizado (D). Desde el punto de vista termodinámico-estadístico estos serán macroestados formados cada uno por una multitud de microestados que difieren muy poco en entalpía.

En este modelo, los estados N y D se encuentran en equilibrio en todo momento y se puede esquematizar como:



De esta forma, la constante de equilibrio de desnaturalización, K_D , quedará representada como:

$$K_D = \frac{[N]}{[D]} \quad (1.19)$$

siendo [N] y [D] las concentraciones de proteína en el estado nativo y desnaturalizado, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, la entalpía calorimétrica, ΔH_{cal} , o entalpía total de la transición es simplemente el área debajo de la curva de C_p vs. T:

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_1}^{T_2} C_p \cdot dT \quad (1.20)$$

donde T_1 y T_2 son las temperaturas antes y después de la transición, respectivamente.

La temperatura de *melting*, T_m , coincide prácticamente con la temperatura a la que se produce la transición justo a la mitad, con poblaciones similares en los estados N y D.

Para este proceso, el calor absorbido a una T determinada es proporcional al avance de la reacción. Por lo tanto, la constante de equilibrio a cada temperatura se

puede obtener fácilmente a partir de la curva de C_p vs. T y a partir de la ecuación de van't Hoff (ecuación 1.21) se puede calcular el cambio de entalpía (ΔH^{VH}) correspondiente del proceso $N \leftrightarrow D$:

$$\left(\frac{d \ln K_D}{dT} \right)_P = \frac{\Delta H^{VH}}{RT^2} \quad (1.21)$$

ΔH^{VH} es la *entalpía de Van't Hoff*.

Si el proceso es, como se ha supuesto, un equilibrio entre dos estados, los valores de ambas entalpías (ΔH_{cal} y ΔH^{VH}) deben ser idénticos.

Conociendo estos parámetros, se pueden obtener la variación en energía de Gibbs estándar (ΔG°) y la variación de entropía estándar (ΔS°) a partir de las ecuaciones termodinámicas:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_D \quad (1.22)$$

$$\Delta S^\circ = - \left(\frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial T} \right) \quad (1.23)$$

De esta forma, cuando $T = T_m$, $K_D = 1$ y por lo tanto $\Delta G^\circ = 0$.

Existe cooperatividad intermolecular cuando $\Delta H^{VH} > \Delta H_{cal}$, aunque el proceso siga siendo de equilibrio.

Modelo de equilibrio entre más de dos estados:

Se han encontrado gran cantidad de proteínas, especialmente las más complejas, para las que el modelo de dos estados no es válido. Esto puede deberse a: **i)** una población apreciable de estados intermedios de plegamiento en equilibrio con los estados N y D (Montgomery y col., 1.993), **ii)** cambios en el grado de asociación de la proteína concomitantes con su desplegamiento o **iii)** ambas situaciones simultáneamente (Azuaga y col., 1.995; Filimonov y Rogov, 1.996).

El hecho de que $\Delta H^{VH} < \Delta H_{cal}$ en el proceso de equilibrio indica que el mismo no es de dos estados y que existen uno o más intermediarios termodinámicamente

estables significativamente poblados. Esta situación corresponde normalmente al caso en que ciertas regiones de la proteína, o dominios cooperativos, se desnaturalizan más o menos independientemente uno del otro.

Se han propuesto varios modelos para explicar estos casos. El más antiguo y frecuentemente empleado es el modelo secuencial, que consiste en varios estados consecutivos durante el proceso de desnaturalización. Los parámetros termodinámicos de cada estado se pueden calcular a partir de la curva experimental $C_p(T)$ por ajuste de mínimos cuadrados no lineales, por el análisis en etapas recursivas en función de la temperatura hasta que se obtengan las constantes de equilibrio, fracción de moléculas en cada estado, cambios de entalpía y cualquiera otra función relacionada con ellos.

Otro modelo es de transiciones independientes, el cual supone que la desnaturalización de cada dominio es independiente uno del otro, es decir, no se influyen entre sí (Privalov y Filimonov, 1.978).

Procesos de no equilibrio. Modelo de Lumry y Eyring:

Los parámetros termodinámicos que se obtienen mediante los modelos anteriormente descritos, excepto la entalpía calorimétrica (que sigue siendo el área debajo del termograma experimental) podrían ser falsos si se comprueba irreversibilidad durante la desnaturalización.

Además de la falta de reproducibilidad en los barridos consecutivos, la dependencia de T_m con la velocidad de barrido es indicio de la presencia de procesos irreversibles controlados cinéticamente. Esta es una regla general, independientemente del modelo que se emplee para explicar los datos de DSC.

La desnaturalización térmica irreversible es atribuida generalmente a alteraciones del estado final, como la autólisis, agregación, alteraciones químicas de la proteína, etc., que impiden que la misma adopte su estructura nativa (Kurganov y col., 1.997; Sanchez-Ruiz, 1.992).

Estas alteraciones irreversibles son fundamentalmente procesos cinéticos que se pueden describir a través de ecuaciones de velocidad. Por lo tanto, se obtiene información de carácter cinético (no termodinámico) del proceso de desnaturalización.

El modelo más aplicable en estos casos es el **modelo de Lumry y Eyring** (Sanchez-Ruiz, 1.992) el cual propone un paso de desnaturalización reversible seguido de alteraciones irreversibles del estado desnaturalizado de la proteína, las cuales originan un estado final (F) incapaz de volver al estado nativo:



k_1 , k_{-1} y k son las constantes de velocidad para la desnaturalización reversible, renaturalización y etapa de desnaturalización irreversible, respectivamente.

Este modelo permite determinar la *constante de velocidad*, k y la *energía de activación*, E_A , relacionadas por la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{(-E_A / RT)} \quad (1.25)$$

donde R es la constante de los gases y A el *factor frecuencia*.

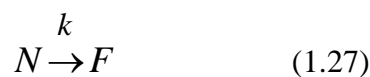
Además, conduce a la relación:

$$\frac{1}{T^*} = \frac{\ln A}{E_A \cdot R} \quad (1.26)$$

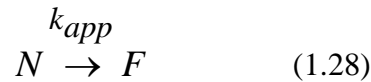
donde T^* es la temperatura a la cual $k = 1 \text{ min}^{-1}$.

Modelo irreversible de dos estados:

Si $k > k_{-1}$ (ecuación 1.24) la mayoría de las moléculas son convertidas al estado F , mientras que D se encuentra en muy baja concentración o no se acumula, es decir, no se establece el equilibrio entre N y D . En este caso, el paso limitante de la velocidad es la formación de F a través de una cinética de primer orden. Este es un caso límite para el modelo de Lumry-Eyring y considera sólo dos estados significativamente poblados (N y F). Dicha transición está gobernada por una constante cinética de primer orden y dependiente de la T :



Otra posibilidad es que $K_D = k_1/k_{-1} < 1$ y $k < k_{-1}$. En este caso, la cantidad de D también será muy baja y la formación de F estará determinada por una constante de velocidad aparente de primer orden $k_{app} = K_D k$:



Ambas situaciones se describen a partir del modelo de dos estados irreversibles, siendo indistinguibles a partir de las transiciones de DSC. La única diferencia entre ellas es el paso limitante de la velocidad (Sanchez-Ruiz, 1.992; Amani y col., 2.007).

Muchos de los casos de desnaturalización térmica irreversible de proteínas fueron correctamente descritos a partir de este modelo simplificado de dos estados (Zamorano y col., 2.004; Amani y col., 2.007; Lyubarev y col., 1.999; Michnik y col., 2.005; Quesada-Soriano y col., 2.006; Žoldák y col., 2.006).

El modelo conduce a una serie de expresiones que permiten calcular los parámetros de la ecuación de Arrhenius y sirven como validación del modelo si conducen a valores coincidentes. Numerosos trabajos describen con detalle estos métodos de validación (Sanchez-Ruiz y col., 1.988; Sanchez-Ruiz, 1.992; Kurganov y col., 1.997).

Métodos de validación:

A) La constante de velocidad de la reacción, k , a una dada temperatura es:

$$k = \frac{V \cdot C_p}{\Delta H_{cal} - \langle \Delta H \rangle} \quad (1.29)$$

donde V es la velocidad de calentamiento, C_p la capacidad calorífica de exceso a la temperatura T y $\langle \Delta H \rangle$ el calor desarrollado hasta la temperatura T .

Teniendo en cuenta esto y la ecuación de Arrhenius (1.25) se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{T^*} - \ln \left[\frac{V \cdot C_p}{\Delta H_{cal} - \langle \Delta H \rangle} \right] / (E_A / R) \quad (1.30)$$

de manera que a partir de un gráfico $1/T$ vs. $\ln \left[\frac{V \cdot C_p}{\Delta H_{cal} - \langle \Delta H \rangle} \right]$ se podrán obtener los parámetros E_A y T^* , a partir de la pendiente y ordenada al origen, respectivamente.

En general, para el modelo de dos estados irreversibles el valor $\ln[V \cdot Cp / (\Delta H_{cal} - \langle \Delta H \rangle)]$ es independiente de la velocidad de barrido y por lo tanto todos los puntos obtenidos a varias V deberán superponerse en una misma función lineal. Cabe destacar que este es uno de los métodos más valiosos para evaluar la validez del modelo.

B) El método predice que la T_m debe cambiar con la velocidad de barrido según la expresión:

$$\ln\left(\frac{V}{T_m^2}\right) = \ln\left(\frac{A \cdot R}{E_A}\right) - \left(\frac{E_A}{R}\right)\left(\frac{1}{T_m}\right) \quad (1.31)$$

de modo que si se representa $\ln(V/T_m^2)$ vs. $1/T_m$ se debe obtener una recta de pendiente $-E_A/R$ y ordenada al origen $\ln(A \cdot R/E_A)$.

C) El calor desarrollado a cada T es:

$$\ln\left(\ln\left(\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{cal} - \langle \Delta H \rangle}\right)\right) = \frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (1.32)$$

por lo que se puede obtener E_A a través de una representación del primer término contra $1/T$. En este caso la pendiente resultará $-E_A/R$ y la ordenada al origen $E_A/(R \cdot T_m)$.

D) También se puede calcular E_A directamente a partir de:

$$E_A = \frac{eRCp^m T_m^2}{\Delta H_{cal}} \quad (1.33)$$

donde Cp^m es la capacidad calorífica de exceso a la temperatura T_m y e es la base del logaritmo natural.

La aplicación de este modelo permite extraer información cinética ya que la termodinámica queda totalmente enmascarada por la presencia de procesos

irreversibles. No obstante, para una velocidad de calentamiento dada, el valor de T_m se puede emplear como parámetro comparativo para evaluar la estabilidad de la biomolécula en estudio en función de las condiciones del medio.

5. Fuentes naturales de alfa-amilasa: páncreas bovino y *Aspergillus oryzae*

Una de las operaciones centrales en un proceso biotecnológico de obtención de enzimas es la transformación o pretratamiento de materias primas económicas o sin valor comercial en productos primarios, más o menos complejos de acuerdo a su naturaleza, a partir de los cuales se pueda aislar o purificar la proteína de interés, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas o características distintivas respecto del resto de los componentes de la mezcla.

Dos fuentes naturales económicas de alfa-amilasa son:

- El páncreas bovino (contiene gran cantidad de enzimas de alto valor comercial)
- Cultivo fúngico de *A. oryzae* (bajo ciertas condiciones experimentales, productor natural de la enzima)

5.1. El páncreas bovino

El páncreas de los bovinos es un órgano del aparato digestivo ubicado transversalmente sobre la pared dorsal del abdomen que puede llegar a pesar aproximadamente entre 350 y 500 g. En los bovinos, consta de un conducto que desemboca en el duodeno donde las enzimas secretadas por el tejido exocrino ayudan a la degradación de carbohidratos, grasas y proteínas.

El páncreas es fuente de numerosas proteínas de importancia industrial. Entre ellas, proenzimas (proelastasa, procarboxipeptidasa, tripsinógeno y quimotripsinógeno) que luego son activadas en el lumen intestinal, también ribonucleasa, desoxiribonucleasa, lipasas, amilasas, colessterolasas y fosfolipasas. La figura 1.10 representa el páncreas bovino y el proceso de activación de proenzimas en el intestino por parte de una proteasa también pancreática (tripsina):

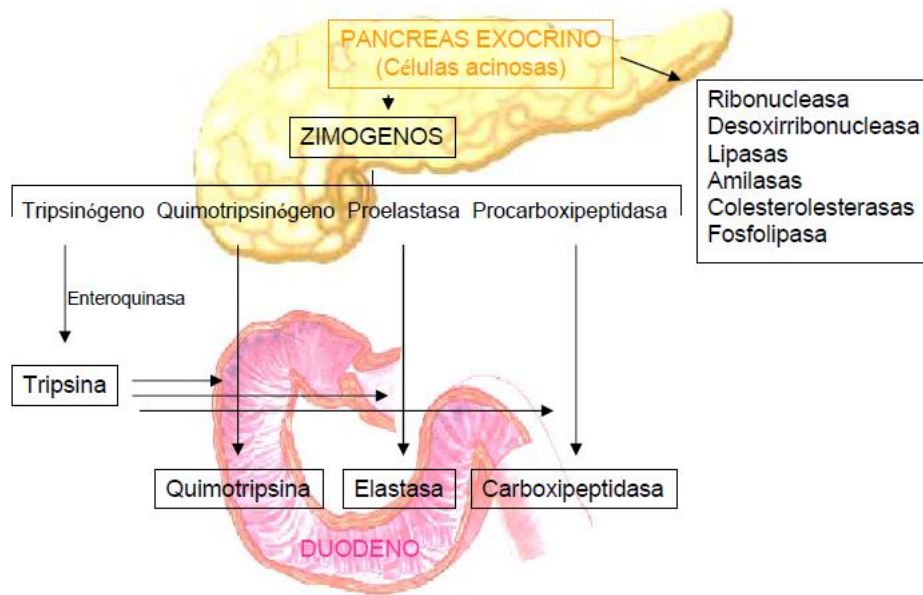


Figura 1.10: Esquema del páncreas bovino y de la secreción y activación de proenzimas desde el páncreas hasta el duodeno.

La producción ganadera es uno de los grandes pilares de la economía argentina, siendo la región pampeana una de las zonas donde más se concentra dicha actividad. El ganado vacuno es una de las principales producciones dentro de esta industria, con lo cual, grandes cantidades de páncreas representan un subproducto de desecho de bajo valor comercial.

5.2. Producción de alfa-amilasa fúngica. Cultivos sumergidos de *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae es un hongo filamentoso de reproducción asexual. La figura 1.11 es una fotografía de un conidio de esta especie:

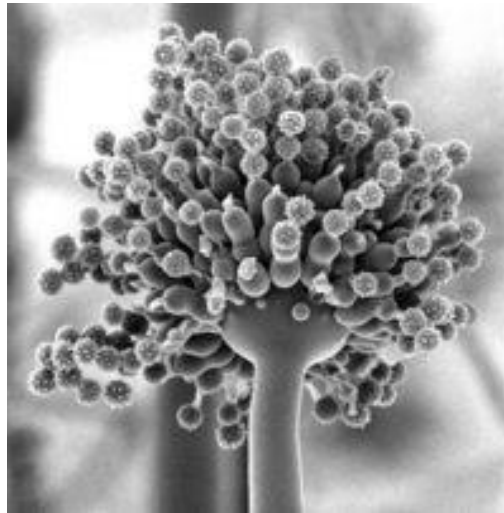


Figura 1.11: Conidio de *Aspergillus oryzae*.

(Fuente: http://protonutrizione.blogosfere.it/images/Aspergillus_oryzae_01-thumb.jpg)

En numerosos trabajos, este microorganismo es utilizado como productor de la exoenzima alfa-amilasa, tanto en fermentaciones en estado sólido (Rahardjo y col., 2.005, Murado y col., 1.997) como líquido (Spohr y col., 1.998).

Los cultivos sumergidos de especies fúngicas presentan ventajas sobre las fermentaciones en estado sólido en cuanto a la facilidad de mantenimiento y control de variables (tales como pH, temperatura, composición del medio, concentración de sustratos, etc.), además de permitir un rápido crecimiento del microorganismo. En particular, la enzima alfa-amilasa producida por *Aspergillus oryzae* es una exoenzima secretada al medio, lo cual tiene la ventaja extra de lograr obtener el producto final a partir del sobrenadante del cultivo líquido.

La optimización de los parámetros químicos y físicos del proceso de fermentación es de gran importancia, tanto desde el punto de vista económico como de la practicidad del proceso. En este sentido, existen numerosos estudios que intentan abordar la influencia de variables experimentales y condiciones del medio en el crecimiento de *Aspergillus oryzae*, producción y secreción de alfa-amilasa (Kammoun y col., 2.008; Francis y col., 2.003).

Grandes cantidades de residuos provenientes de la actividad agrícola y agroindustria son generados en el año debido a diversas prácticas en estas actividades. Estos desechos representan una de las fuentes más ricas de energía existentes en el planeta. De hecho, son el mayor reservorio de carbono fijado en la naturaleza (Francis y col., 2.003). Los avances en biotecnología brindan potenciales oportunidades para el empleo y reciclado de tales desechos. Por ejemplo, la mayoría de productos agrícolas

que contienen almidón pueden ser empleados como sustrato para la producción de biocombustibles, proteínas alimentarias, químicos por procesamiento microbiano o para la producción misma de biomasa, etc. Estos sustratos incluyen desechos provenientes del maíz, trigo, arroz, papa, avena, entre otros. En particular, el grano del trigo está compuesto en un 70% por carbohidratos, dentro de los cuales el almidón constituye un 64 % de la materia seca del grano completo y un 70 % de su endospermo, es decir, que los desechos provenientes de la post-cosecha o procesamiento del trigo son una fuente importante de este polisacárido. Además de representar un sustrato económico, el empleo de estos desechos permite la reducción de grandes cantidades de biomasa acumulada, colaborando con el desarrollo sustentable y uso renovable de materiales (Nigam y Singh, 1.995; Galanakis, 2.012; Pandey y col., 2.000; Shieber y col., 2.001; Jin y col., 1.998).

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue “recuperar la enzima alfa-amilasa a partir de dos fuentes naturales: páncreas bovino y Aspergillus oryzae, por aplicación de las metodologías de formación de complejos insolubles proteína-polielectrolitos y extracción líquido-líquido en sistemas bifásicos acuosos”.

6.2. Objetivos particulares

El objetivo general anteriormente planteado se logró a través de los siguientes objetivos particulares:

I. Metodología de precipitación con polielectrolitos:

- 1- Analizar la influencia de variables experimentales (concentración y peso molecular del polielectrolito, pH, fuerza iónica) sobre el diagrama de solubilidad del complejo alfa-amilasa/polielectrolito.
- 2- Estudiar la interacción alfa-amilasa/polielectrolito: mecanismo molecular, naturaleza, cinética y efectos sobre la funcionalidad, estabilidad y estructura de la enzima.
- 3- Diseñar un modelo de precipitación de la alfa-amilasa con el polielectrolito.
- 4- Analizar el estado funcional y estructural de la alfa-amilasa luego de aplicar el modelo experimental de precipitación diseñado.

II. Metodología de reparto en sistemas bifásicos acuosos:

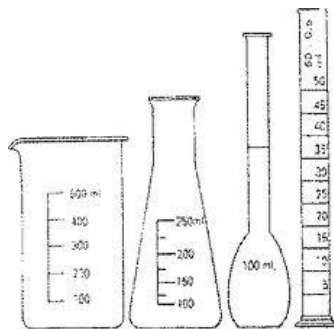
- 1- Establecer los factores que influyen en el proceso de reparto de la alfa-amilasa en sistemas bifásicos acuosos polietilenglicol-fosfato de potasio: composición del sistema bifásico acuoso, peso molecular del polietilenglicol, temperatura, concentración de sales y relación de volumen entre las fases del sistema.
- 2- Evaluar la extracción líquido-líquido a través del porcentaje de rendimiento teórico de la alfa-amilasa en cada fase.
- 3- Estudiar la naturaleza de la interacción alfa-amilasa/polietilenglicol y analizar el estado funcional, estructural y estabilidad de la enzima en las fases del sistema.

III. Obtención de alfa-amilasa a partir de sus fuentes naturales:

- 1- Procesar las materias primas para su posterior uso como fuentes naturales de alfa-amilasa: **páncreas bovino** y **cultivo en lote de *Aspergillus oryzae***.
- 2- Aplicar la información obtenida en los objetivos particulares *I* y *II* para la concentración y purificación de alfa-amilasa a partir de dichas fuentes naturales, aplicando las metodologías de precipitación con polielectrolitos y reparto en sistemas bifásicos acuosos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS



CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos

2.1. Materiales

- **Ácido poliacrílico peso molecular promedio 100.000** (PAA 100.000), solución acuosa 35 % P/P, densidad 1,14 g/cm³, calidad analítica, adquirido en Aldrich (USA).

- **Ácido poliacrílico peso molecular promedio 240.000** (PAA 240.000), solución acuosa 25 % P/P, densidad 1,09 g/cm³, calidad analítica, adquirido en Aldrich (USA).

- **Ácido poliacrílico peso molecular promedio 5.000** (PAA 5.000), solución acuosa 50 % P/P, densidad 1,09g/cm³, calidad analítica, adquirido en Aldrich (USA).

- **Alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* (α -Amy)**: adquirida en Sigma Chem. USA y empleada sin previa purificación. Las soluciones madre de α -Amy se prepararon por pesada directa de la droga sólida y disolución en *buffer* fosfato 50 mM a pH 6,00 y una concentración de 55 mg/mL. Las mismas fueron fraccionadas y congeladas a -18°C, verificando, previo a su empleo, ausencia de turbidez y partículas en suspensión y que no se hallara disminuida su actividad catalítica.

- **Amilasa 405, cinética unitest y AA**: sustrato específico para la determinación de la actividad enzimática de la α -Amy, *2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido* (CNP-G3), disuelto en *buffer* MES, pH 6,00, 100 mmol/L, adquirido en Wiener Lab.

- **Kit de ácido bicinconínico**: para la determinación de proteínas, adquirido en Sigma-Aldrich.

- **Medios de cultivo**: Agar papa glucosado (Britania), almidón sólido, peptona, urea, glicerol (Sigma Chem. USA) y sales: NaCl, KH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄ (Sigma Chem. USA). Los medios de cultivo fueron preparados por pesada directa de las drogas sólidas y disolución en agua destilada, ajustando al pH final con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, según corresponda.

- **Páncreas bovino**: donado por frigorífico “Las Heras”, Capital Federal, Buenos Aires.

- **Polietilenglicoles**: pesos moleculares promedio 2.000 (PEG 2.000), 3.350 (PEG 3.350) y 8.000 (PEG 8.000), drogas sólidas adquiridas en Sigma Chem. USA. Peso molecular promedio 6.000 (PEG 6.000), droga sólida adquirida en Fluka. Todos fueron empleados sin previa purificación.

- **Soluciones buffer fosfato (Pi)**: preparadas con ácido ortofosfórico de calidad analítica (Cicarelli). El pH de la soluciones fue ajustado mediante el agregado de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (según corresponda) y la fuerza iónica por agregado de NaCl sólido en las soluciones reguladoras de pH utilizadas en cada caso y posteriormente reajustadas a pH original.

- **Soluciones, geles y preparación de las muestras para electroforesis:**

- Solución acuosa de acrilamida: acrilamida (30 % P/V) y bis-acrilamida (0,8 % P/V).

- *Buffer* de resolución: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,80.

- *Buffer* de concentración: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,80.

- *Buffer* de corrida: 0,1 % P/V SDS, 0,192 M glicina, 0,025 M Tris, pH 8,30.

- *Buffer* de muestra: 60 mM Tris pH 6,80, 25 % V/V glicerol, 2 % P/V SDS y 0,01 % P/V bromofenol.

- Solución colorante: 0,1 % P/V *Coomassie brilliant blue*, 45 % V/V metanol y 10 % V/V ácido acético glacial.

- Solución decolorante: 12,5 % V/V isopropanol y 10 % V/V ácido acético glacial.

El gel de concentración se preparó al 10 % de acrilamida por agregado de *buffer* de concentración (dilución ¼), SDS 0,1 % P/V y la reacción de polimerización fue iniciada ante el agregado de persulfato de amonio (APS) 0,06 % P/V y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1 % V/V. El gel de resolución se preparó al 13 % de acrilamida por agregado de *buffer* de resolución (dilución ¼), SDS 0,1 % P/V y la reacción de polimerización también se inició por agregado de APS 0,06 % P/V y TEMED 0,05 % V/V.

Las soluciones de proteína se diluyeron en *buffer* de muestra y se calentaron en baño de agua durante 4 min a 96°C, previo a su siembra en el gel.

- **Equipamiento:** Además de los equipos espectroscópicos y calorimétricos (detallados oportunamente en cada sección correspondiente a Métodos), se ha empleado equipamiento de apoyo de laboratorio: ultracentrífuga refrigerada (Sigma 3-18K), pHmetros (BOECO BT 600), campana de flujo laminar vertical (Miniflo Due, pbi-brand), estufa de cultivo (San Jor SLDB), micropipetas (BOECO, Hamilton), microscopio óptico (Olympus CX-31), cámara de Neubauer con retículo de Thoma, baños termostáticos (Vicking Masson D), agitador orbital (BOECO), agitadores magnéticos (VELP Scientifica), equipo para electroforesis (Mini-Protean, Bio-Rad®), fuente de poder estabilizada (Chemar S.A.C.I.F. CHF 1.4).

2.2. Métodos

SECCIÓN I: Precipitación con PEs

1. Análisis de pureza de la enzima comercial: alfa-amilasa (*Aspergillus oryzae*).

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato sódico, SDS-PAGE, de la α -Amy comercial empleada en este trabajo (en adelante, liofilizado comercial o α -Amy).

Se empleó el equipo Mini-Protean (Bio-Rad®) armándose un sistema de geles discontinuos (10% gel de concentración, 13% gel de resolución). La visualización de las bandas proteicas se llevó a cabo a través del protocolo de tinción con el colorante *Coomassie brilliant blue* (Neuhoff y col., 1.988; Neuhoff y col., 1.990). Como marcadores de pesos moleculares se empleó el kit comercial *Sigma Marker Molecular Weight, Low Range*.

2. Determinación de las condiciones de precipitación y disolución de los complejos PAA/alfa-amilasa

2.1. Ensayos turbidimétricos

La densidad óptica o turbidez fue registrada a través de medidas de absorbancia (Abs.) a 400 nm, empleando un espectrofotómetro de doble haz Jasco V-530. Esta longitud de onda fue seleccionada dado que es suficiente para originar una dispersión considerable sin saturación del espectrofotómetro. Las cubetas de medida y de referencia fueron de vidrio de 1 cm de camino óptico y esta última fue cargada con el *buffer* de trabajo correspondiente en cada caso.

2.2. Efecto de la concentración de PAA en la formación de los complejos

Se construyeron curvas de titulación turbidimétrica de la α -Amy con PAA de distintos pesos moleculares (240.000 - 100.000 - 5.000). Estas se obtuvieron registrando la turbidez en función de la relación molar PAA/ α -Amy, a 20°C y diferentes pHs del medio (3,00 - 4,00 - 5,00).

Para ello se adicionaron sucesivas alícuotas de PAA (diluido 1/200 con *buffer* Pi para PAA 240.000 y 100.000 y 1/10 para PAA 5.000) sobre 2,50 mL de una solución de α -Amy 2,2 mg/mL (preparada a cada pH en *buffer* Pi 50 mM) y se midió la turbidez del sistema luego de cada agregado.

El valor de “*e*”, *estequiometría del complejo*, se puede estimar a partir de la mínima relación PAA/ α -Amy con la cual se obtiene el máximo de turbidez. De esta forma, se calculó gráficamente según muestran las figuras 2.1 y 2.2 para el caso de un comportamiento hiperbólico o sigmoideo, respectivamente.

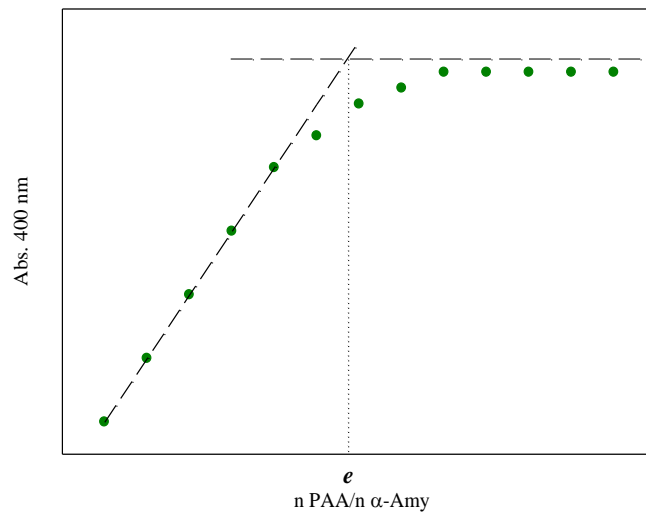


Figura 2.1: Determinación de la estequiometría del complejo en un sistema que sigue un comportamiento hiperbólico.

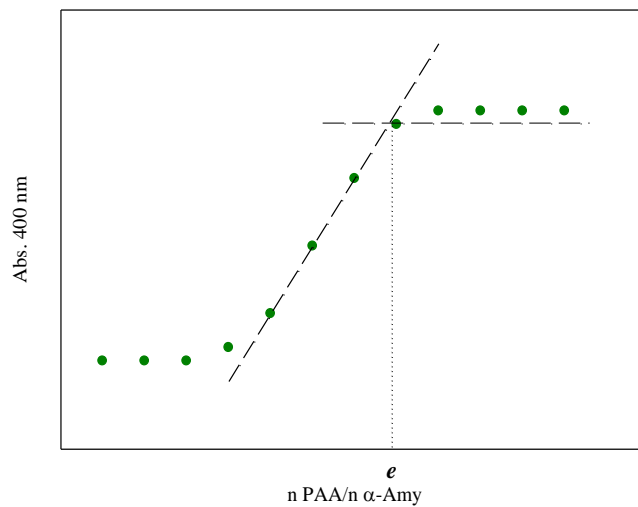


Figura 2.2: Determinación de la estequiometría del complejo en un sistema que sigue un comportamiento sigmoideo.

Las estequiometrías en cada caso se calcularon en función de la relación molar proteína/PE o bien, para independizarnos del peso molecular del PAA, en moles de enzima por mol de monómero, en base a un peso molecular del resto acrilato de 71 g/mol.

2.3. Efecto del pH en la formación de los complejos

Se prepararon mezclas de α -Amy 2,2 mg/mL con PAA hasta alcanzar composiciones finales correspondientes a la “e” y superiores a ella, en un volumen final de 2,5 mL. Sobre éstas se adicionaron sucesivas alícuotas de NaOH o HCl para modificar el pH del medio, registrándose la turbidez del sistema luego de cada agregado.

Las relaciones molares empleadas en cada caso se detallan en la tabla 2.1:

TABLA 2.1: Relaciones molares PAA: α -Amy en los diagramas de fase

<i>PAA 240.000</i>	<i>PAA 100.000</i>
1:135	1:46
1:126	1:42
1:117	1:39

2.4. Efecto de la fuerza iónica en la formación de los complejos

Se construyeron curvas de titulación turbidimétrica de la α -Amy con PAA a diferentes fuerzas iónicas del medio. La metodología empleada y las condiciones experimentales fueron las mismas que en ausencia de sal (Sección I 2.2. Métodos) a través de la adición de NaCl sólido en el *buffer* de trabajo hasta una concentración de 1M. El pH de trabajo fue de 3,00 y en todos los casos se reajustó ese valor luego del agregado de la sal.

3. Caracterización de la interacción PAA/alfa-amilasa

3.1. Naturaleza de la interacción PAA/alfa-amilasa y efecto de la fuerza iónica: Calorimetría de titulación isotérmica

El calorímetro de titulación empleado en este trabajo fue el VP-ITC (MicroCal Inc., USA) del Instituto de Química de la UNICAMP, San Pablo, Brasil.

Las titulaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 20°C, por adición de alícuotas de PAA en la celda con 1,436 mL de α -Amy 22 mg/mL. Para el caso de PAA 240.000, se adicionaron 35 alícuotas de 4 u 8 μ L de una solución 0,31 % P/P de PAA. Para el caso de PAA 100.000, se adicionaron 29 alícuotas de 3 o 10 μ L de una solución 0,58 % P/P de PAA. En todos los casos, en la celda de referencia se colocó agua Milli-Q y las soluciones fueron preparadas en *buffer* Pi 50 mM a pH 3,00.

La energía asociada a la interacción entre α -Amy y PAA se calculó descontando el calor de dilución tanto de la proteína como del polímero, los cuales fueron determinados titulando (en idénticas condiciones que las precedentemente detalladas) *buffer* en solución de proteína y PAA en *buffer*, respectivamente. Los datos fueron ajustados a un modelo de *binding* de sitios independientes y equivalentes (ecuación 1.13).

La variación de energía libre (ΔG°) y la variación de entropía (ΔS°) para la reacción de *binding* fueron calculadas a través de las ecuaciones fundamentales de la termodinámica:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (2.1)$$

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} \quad (2.2)$$

Las titulaciones también se llevaron a cabo a elevada fuerza iónica a través del agregado de NaCl 1M en las soluciones de trabajo, manteniendo constantes todos los parámetros y condiciones experimentales, tal como en ausencia de sal.

3.2. Cinética de formación de los complejos PAA/alfa-amilasa

La cinética de interacción entre α -Amy y PAA se siguió a través de un ensayo turbidimétrico sobre mezclas PAA/ α -Amy a pH 3,00, con una composición en exceso de PAA respecto de la “e”: relación PAA: α -Amy 1:135 (PAA 240.000) y 1:39 (PAA 100.000). El volumen final de los sistemas fue de 2,5 mL.

Se midió el tiempo en el cual el sistema alcanza un valor máximo de turbidez (Tiempo máx.) registrando la Abs. a 400 nm vs. tiempo inmediatamente luego de realizada la mezcla, tal como muestra la figura 2.3:

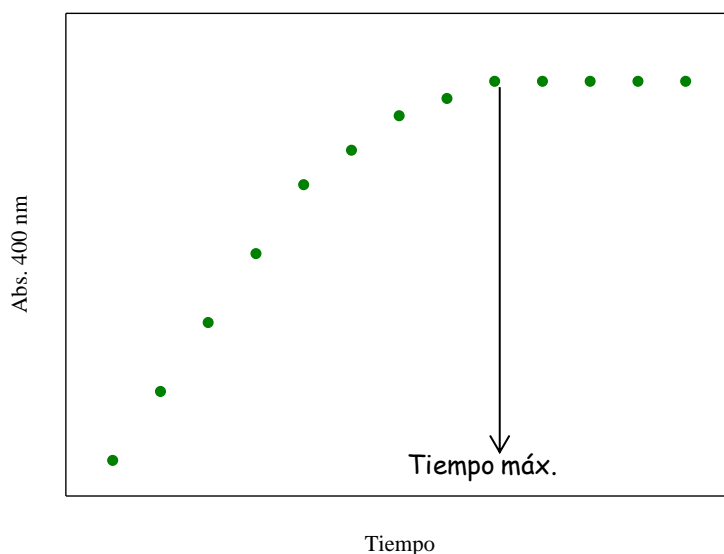


Figura 2.3: Esquema de la determinación del Tiempo máx.

Se consideró que dicho tiempo es el necesario para lograr la máxima interacción entre la enzima y el polielectrolito.

4. Efecto sobre la estructura proteica de la interacción PAA/alfa-amilasa

4.1. Espectroscopía de absorción UV-visible

Se obtuvieron espectros de absorción de la α -Amy en el rango de longitudes de onda (λ) entre 250 - 350 nm, en medio *buffer* Pi 50 mM, pH 3,00 y 20°C. Los mismos se obtuvieron en ausencia y presencia de PAA en relaciones molares PAA/ α -Amy cercanas a la “e” y en presencia de un exceso de PE respecto de la misma, tal como se detalla en la tabla a continuación:

TABLA 2.2: Relaciones molares PAA: α -Amy en los espectros de absorción UV-Vis

<i>PAA 240.000</i>	<i>PAA 100.000</i>
1:135	1:46
1:126	1:42
1:117	1:39
1:88	1:25

Los espectros fueron realizados a una concentración final de α -Amy 0,55 mg/mL, en un espectrofotómetro Jasco V-530, con un ancho de banda de 2 nm,

velocidad de barrido 400 nm min⁻¹, 1 cm de paso óptico y realizando tres ciclos repetitivos.

Dado el carácter insoluble de los complejos, se realizó una corrección de los espectros debido a la presencia de turbidez, para lo cual se graficó log Abs. vs. log λ para la porción del espectro correspondiente a altas λ. Estos datos se ajustaron a una función lineal:

$$\log Abs. = m \cdot \log \lambda + h \quad (2.3)$$

y despejando el valor de Abs. a partir de esta ecuación para el rango completo de λ, se procedió a recalcular la absorbancia final por sustracción respecto del valor inicial, como muestra la figura 2.4 (Camerini-Otero y Day, 1978).

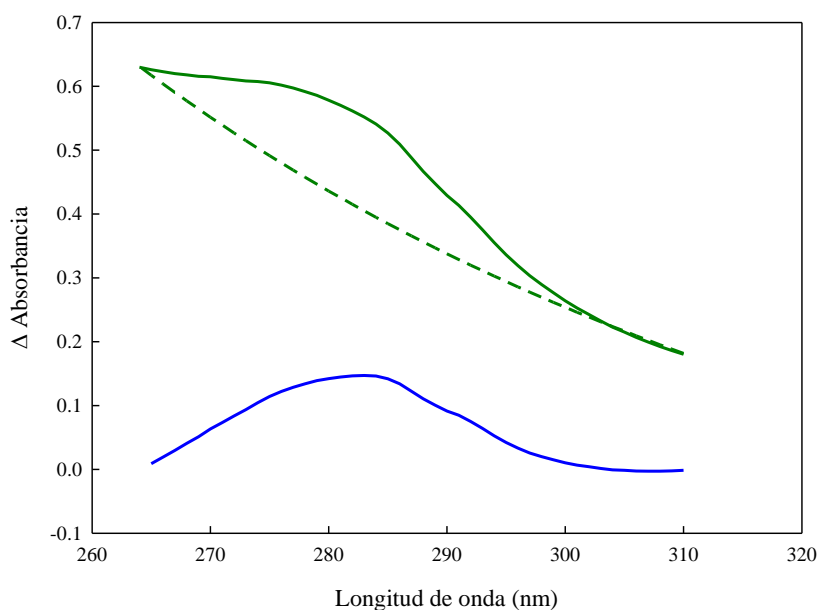


Figura 2.4: Espectros de absorción UV-Vis sin corrección (—), con corrección (—) y dependencia de la turbidez respecto a la longitud de onda (---).

4.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia de la α-Amy en un rango de λ entre 300 - 450 nm, excitando a 280 nm, en buffer Pi 50 mM, pH 3,00 y a 20°C. Los mismos se realizaron en ausencia y presencia de distintas cantidades de PAA, alcanzando relaciones molares PE/α-Amy cercanas a la “e” y en exceso de PAA respecto de la misma (tabla 2.2).

La concentración final de α -Amy en todos los casos fue 0,55 mg/mL, y las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman, Serie 2, utilizando cubeta de cuarzo, 1 cm de paso óptico, ancho de ranura 4 nm, a una velocidad de barrido de 100 nm min⁻¹ y tres ciclos repetitivos. Todos los espectros de fluorescencia fueron debidamente corregidos por la contribución del *buffer*.

4.3. Espectroscopía de dicroísmo circular

Se realizaron espectros de DC de la α -Amy en un rango de λ entre 200 - 260 nm, en *buffer* Pi 50 mM, a pH 3,00, 20°C, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de PAA 240.000 y 100.000 hasta alcanzar relaciones molares PAA/ α -Amy cercanas a la “e” y en presencia de exceso de PAA respecto de la misma (tabla 2.2).

La concentración final de α -Amy en todos los casos fue 0,11 mg/mL y las medidas se realizaron en un espectropolarímetro Jasco 810, empleando cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico, ancho de banda 1 nm, tiempo de respuesta 1 s y velocidad de barrido 50 nm min⁻¹. Se realizaron 7 acumulaciones de todos los espectros y los mismos fueron finalmente corregidos por la contribución del *buffer*.

5. Efecto sobre la actividad enzimática de la interacción PAA/alfa-amilasa

5.1. Determinación de la actividad enzimática de la alfa-amilasa

La actividad catalítica de la α -Amy se midió a través de un método cinético empleando el kit comercial *Amilase 405, kinetic unitest, Winer Lab.*, el cual se basa en la capacidad de esta enzima de hidrolizar un sustrato específico de la α -Amy: **2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP-G3)**:



siendo CNP: 2-cloro-p-nitrofenol, CNP-G2: 2-cloro-nitrofenil- α -D-maltósido y G3: maltotriosa.

El CNP absorbe a 405 nm y la velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática, por lo cual ésta se determinó a partir de la pendiente de la recta Abs. 405 nm vs. tiempo, medida cada 10 segundos durante 5 minutos (Ishikawa y col., 1.990) y fue expresada en “U”. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad requerida para hidrolizar 1 nmol de sustrato por minuto.

La actividad se registró, en todos los casos, en *buffer* Pi 50 mM, a pH 6,00.

6. Efecto de la interacción con PAA sobre la estabilidad de la alfa-amilasa

6.1. Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa

6.1.1. Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa a pH 6,00. Efecto del PAA

Se midió la actividad α -Amy incubada durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60, 90, 120 min y 24 hs) en ausencia y presencia de PAA 240.000 y 100.000 en cantidades superiores a la “e”: PAA: α -Amy 1:88 y 1:25, respectivamente. Las mezclas se prepararon en *buffer* Pi 50 mM, pH 6,00, en una concentración fija de proteína de 1,375 mg/mL, volumen final 2 mL y se dejaron incubar durante 24 hs a 20°C. Se tomaron alícuotas de cada mezcla a distintos tiempos y se midió la actividad de α -Amy en el mismo *buffer*, a una concentración y relación fija enzima/sustrato y la misma temperatura de incubación.

Por último se calculó el porcentaje de actividad remanente a las 24 hs respecto de la misma a las 0 hs (con o sin el PAA correspondiente en cada caso).

6.1.2. Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa a pH 3,00. Efecto del PAA

La inactivación de la α -Amy en medios ácidos (pH < 4,00) se ajusta matemáticamente a una cinética de primera orden, caracterizada por una pérdida exponencial de actividad en el tiempo (ecuación 2.5):

$$\ln(act.) = -k \cdot t + \ln(act._0) \quad (2.5)$$

siendo act. la actividad enzimática al tiempo t, act.₀ la actividad enzimática inicial y k la constante cinética de inactivación (Carlsen y col., 1.996).

Se prepararon soluciones 2,75 mg/mL de α -Amy, en *buffer* fosfato 50 mM, pH 3,00, en ausencia y presencia de PAA 240.000 y 100.000 en concentraciones superiores a la correspondiente a la “e”: PAA: α -Amy 1:88 (PAA 240.000) y 1:25 (PAA 100.000), en un volumen final de 2 mL. Estas mezclas se incubaron a 20°C durante 2:30 hs (α -Amy sola) y 4 hs (α -Amy/PAA), determinándose la actividad α -Amy cada 30 min. Las medidas de actividad se realizaron en *buffer* Pi 50 mM, pH 6,00, a una concentración y relación fija enzima/sustrato y la misma temperatura de incubación.

Finalmente, los datos se ajustaron a la expresión de orden uno (ecuación 2.5) y se obtuvieron los parámetros cinéticos de la inactivación.

6.2. Estabilidad estructural de la alfa-amilasa

6.2.1. Estabilidad de la estructura secundaria de la alfa-amilasa a pH 6,00 y 3,00 medida por espectroscopía de DC. Efecto del PAA

Se prepararon 2 mL de soluciones 5,5 mg/mL de α -Amy en medio *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00 y 3,00. Las mismas fueron incubadas durante 5 hs a 20°C, obteniéndose espectros de DC cada 2:30 hs. Para esto, se tomaron alícuotas de cada solución y se diluyeron en *buffer* Pi 50 mM, pH 6,00, hasta alcanzar una concentración final de enzima de 0,11 mg/mL.

Lo mismo se realizó en soluciones 5,5 mg/mL de α -Amy en *buffer* Pi 50 mM, pH 3,00, en presencia de PAA en relación molar PAA: α -Amy correspondiente a la “e”: 1:154 (PAA 240.000) y 1:52 (PAA 100.000), en un volumen final de 2 mL.

Los espectros fueron realizados en un rango de λ ente 200 - 260 nm, utilizando un espectropolarímetro Jasco 810, cubeta de cuarzo termostalizada a 20°C de 1 cm de paso óptico, ancho de banda 1nm y tiempo de respuesta 1s. Se realizaron 7 acumulaciones a una velocidad de 50 nm min⁻¹. Todos los espectros fueron corregidos por la contribución del *buffer*.

6.3. Calorimetría diferencial de barrido

Los termogramas de capacidad calorífica (Cp) vs. temperatura se obtuvieron empleado un calorímetro diferencial de barrido de alta sensibilidad modelo VP-DSC (Microcal Inc, USA), del Instituto de Química de la UNICAMP, San Pablo, Brasil.

En todos los casos, los datos de DSC fueron analizados a través del *software Origin 5,00, MicroCal Inc.* Previo a la determinación de los parámetros de desnaturalización, cada termograma fue corregido por sustracción del mismo correspondiente al *buffer* de trabajo, los datos fueron normalizados de acuerdo a la concentración de enzima y volumen de celda y se restó la línea de base correspondiente. Los valores de temperatura de *melting* (T_m) y entalpías calorimétricas (ΔH°_{cal}) fueron obtenidos a través de dicho *software* a partir del máximo de cada transición y de la integración del área debajo de cada curva, respectivamente.

6.3.1. Efecto del pH y PAA en el proceso de desnaturalización térmica de la alfa-amilasa

Se ha evaluado la estabilidad térmica de la α -Amy al pH óptimo de la enzima (6,00) y al pH de interacción máxima con PAA (3,00), para lo cual se obtuvieron los termogramas en medio *buffer* Pi 50 mM, al pH correspondiente en cada caso, con una concentración final de α -Amy de 22 mg/mL.

A continuación, se prepararon soluciones de α -Amy 22 mg/mL en *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00, en presencia de PAA en una relación molar PAA: α -Amy: 1:154 (PAA 240.000) y 1:52 (PAA 100.000).

El rango de temperatura de trabajo en todos los casos fue entre 308 y 358 K y la velocidad de barrido de 0,5 K/min. La celda de referencia fue cargada con el *buffer* de trabajo correspondiente en cada caso.

6.3.2. Análisis de reversibilidad en la desnaturalización térmica de la α -Amy: Barridos consecutivos de temperatura

El grado de reversibilidad en la desnaturalización térmica de la α -Amy en ausencia y presencia de PAA fue evaluado por un segundo ciclo de calentamiento de la muestra.

Las muestras se prepararon en medio *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00, con una concentración final de α -Amy de 22 mg/mL. Las relaciones molares PAA: α -Amy empleadas fueron: 1:154 (PAA 240.000) y 1:52 (PAA 100.000).

El rango de temperatura analizado fue entre 308 y 358 K y la velocidad de barrido de 0,5 K/min, colocándose *buffer* de trabajo en la celda de referencia. El segundo calentamiento fue realizado bajo las mismas condiciones luego de dejar enfriar

la muestra (1.400 s) hasta la temperatura inicial (308 K), inmediatamente finalizado el primer calentamiento.

6.3.3. Efecto de la velocidad de barrido en los termogramas de DSC de la α -Amy

Se prepararon soluciones de α -Amy 22 mg/mL en *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00, en ausencia y presencia de PAA en relación molar PAA: α -Amy: 1:154 (PAA 240.000) y 1:52 (PAA 100.000).

El rango de temperatura de trabajo fue entre 308 y 358 K y se emplearon distintas velocidades de barrido (V): 0,25 - 0,5 - 1 y 1,5 K/min. En todos los casos la celda de referencia fue cargada con el *buffer*.

Se realizó el ajuste al modelo de dos estados irreversibles, obteniéndose los parámetros cinéticos: E_A (según los métodos de validación mencionados en la Sección 4.1.6. de Introducción) y T^* (ecuaciones 1.30, 1.31 y 1.26).

6.3.4. Efecto de la concentración en los termogramas de DSC de la α -Amy

Se prepararon soluciones de α -Amy de distintas concentraciones (5,5 - 22 - 41,25 y 55 mg/mL) en *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00, en ausencia y presencia de PAA en relaciones molares PAA: α -Amy 1:154 (PAA 240.000) y 1:52 (PAA 100.000).

El rango de temperatura de trabajo fue entre 308 y 358 K y la velocidad de barrido 0,5 K/min. La celda de referencia fue cargada con el *buffer*.

7. Diseño del método de precipitación de la alfa-amilasa con los polielectrolitos

7.1. Precipitación de la alfa-amilasa con PAA

De acuerdo a los resultados obtenidos, se precedió a diseñar un modelo de concentración y purificación de α -Amy que consistió en la realización de los siguientes pasos:

- Preparación de 2,5 mL de una solución de α -Amy 2,2 mg/mL en *buffer* Pi 50 mM, al pH óptimo de interacción con PAA (3,00).
- Agregado de una alícuota de PAA, preparado en el mismo *buffer* y al mismo pH de la enzima, hasta alcanzar una relación PAA: α -Amy superior a la "e": 1:88 (PAA 240.000) y 1:25 (PAA 100.000).
- Incubación de la mezcla de precipitación durante 30 min a 8°C.

- Centrifugación de la mezcla durante 5 min a 1.373xg.
- Separación de precipitado y sobrenadante.
- Redisolución del precipitado hasta volumen inicial en *buffer* Pi 50 mM, pH 6,00.
- Determinación de la actividad enzimática en el precipitado redisolto (PP) y sobrenadante (SN).

Por último se determinó el porcentaje de actividad α -Amy en cada una de las fracciones (PP y SN) respecto de un control de la enzima en igual concentración que la mezcla de precipitación, disuelta en *buffer* Pi a pH 6,00 y ausencia de PAA (ecuación 2.6):

$$\% \text{Act.}_{fracción} = \frac{\text{Act.}_{fracción}}{\text{Act.}_{control}} \times 100 \quad (2.6)$$

7.2. Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa en los precipitados

La estabilidad de α -Amy en los precipitados fue evaluada luego de aplicar la estrategia de concentración, para lo cual se prepararon nueve tubos (por cada PAA) con las mezclas de precipitación, se incubaron en frío, se centrifugaron y se separaron las fases, tal como se indicó anteriormente (Sección I. 7.1. Métodos). Los precipitados se incubaron durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min) a 20°C, se redisolvieron hasta volumen inicial en *buffer* Pi 50 mM, pH 6,00 y se determinó la actividad α -Amy. Todas estas mediciones se realizaron en forma paralela junto a un control de la α -Amy en igual concentración que la mezcla de precipitación, en *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00 y ausencia de PAA.

Los datos se ajustaron a la expresión de orden uno (ecuación 2.5) y se obtuvieron los parámetros cinéticos de inactivación.

8. Análisis funcional de la alfa-amilasa luego de aplicar el método de precipitación

Luego de aplicar la metodología de precipitación diseñada y de redissolver los precipitados (Sección I 7.1. Métodos), se determinó la actividad α -Amy a distintos tiempos de incubación de dicho precipitado redisolto (0, 2, 4 y 24 hs).

SECCIÓN II: Reparto en SBAs

1. Reparto de alfa-amilasa en SBAs PEG-fosfato de potasio, pH 7,00

1.1. Preparación de los sistemas bifásicos acuosos

Se prepararon 45 g de sistemas bifásicos acuosos por mezclado de PEG (droga sólida), solución de fosfato de potasio 28% P/P a pH 7,00 y agua destilada por pesada directa, según los diagramas de fase realizados en nuestro laboratorio (López, 2.009*¹; Spelzini, 2.006*²) o publicados en bibliografía (Lei y col., 1.990*³; Zaslavsky, 1.995*⁴). Se utilizaron diferentes sistemas tanto en lo que respecta a las masas molares promedio de los PEGs como a las composiciones (cuatro T.L. diferentes). En la tabla 2.3 se indican las composiciones de los SBAs elegidos:

TABLA 2.3: Diagramas de fase de sistemas PEG-fosfato de potasio-agua, pH 7,00

T.L.	CONCENTRACIÓN % P/P								
	Composición inicial			Fase superior			Fase inferior		
	Pi	PEG	Agua	Pi	PEG	Agua	Pi	PEG	Agua
Sistema PEG 2.000-fosfato de potasio-agua, pH 7,00 ^(*1)									
1	12,26	14,09	73,65	4,14	27,56	68,3	20,55	0,51	78,94
2	12,86	15,90	71,24	3,55	30,81	65,64	22,21	0,55	77,24
3	13,57	16,82	69,61	2,98	33,36	63,66	24,52	0,46	75,02
4	14,28	18,64	67,08	2,27	36,48	61,25	26,60	0,42	72,98
Sistema PEG 3.350-fosfato de potasio-agua, pH 7,00 ^(*4)									
1	10,90	10,10	79,00	6,60	18,55	74,85	14,80	2,76	82,44
2	11,40	11,00	77,60	5,51	22,14	72,35	16,48	1,61	81,91
3	11,80	12,20	76,00	4,88	24,58	70,54	17,92	1,01	81,07
4	12,30	13,70	74,00	4,21	27,66	68,13	19,85	0,78	79,37
Sistema PEG 6.000-fosfato de potasio-agua, pH 7,00 ^(*2)									
1	9,76	11,23	79,01	4,67	22,75	72,58	14,41	0,66	84,93
2	10,69	13,19	76,12	3,23	29,59	67,18	16,69	0,03	83,28
3	11,68	14,27	74,05	2,93	31,14	65,94	19,16	0,02	80,98
4	12,98	14,94	72,08	2,07	35,59	62,33	20,97	0,01	79,20
Sistema PEG 8.000-fosfato de potasio-agua, pH 7,00 ^(*3)									
1	9,70	12,20	78,10	4,68	22,19	73,13	14,77	2,00	83,23
2	10,30	13,20	76,50	4,13	24,85	71,02	16,43	1,60	81,97
3	10,90	14,30	74,80	3,84	27,14	69,02	17,98	1,35	80,67
4	11,70	15,50	72,80	3,34	29,82	66,84	19,96	1,19	78,85

Estas composiciones corresponden a sistemas con una relación de volúmenes entre las fases (**R**) unitaria. El valor de **R** representa el cociente entre el volumen de la fase superior (V_{sup}) e inferior (V_{inf}):

$$\mathbf{R} = \frac{V_{\text{sup}}}{V_{\text{inf}}} \quad (2.7)$$

Estos sistemas se agitaron por inversión hasta disolución total de los componentes y se dejaron reposar durante 24 hs para lograr la formación de dos fases: una superior enriquecida en el polímero y una inferior enriquecida en la sal.

Posteriormente se separaron dichas fases y se construyeron SBAs de 4 mL totales, con volúmenes de fase perfectamente conocidos (2 mL) y **R**=1.

1.2. Determinación de los coeficientes de reparto de actividad enzimática (*K_e*). Dependencia con la composición de las fases, temperatura, concentración y peso molecular del PEG

El reparto de la enzima en cada uno de los sistemas se realizó por agregado de 75 μl de una solución de α -Amy 55 mg/mL sobre los SBAs formados como se indicó anteriormente (Sección II 1.1. Métodos).

Los sistemas contenían un volumen final de 4 mL, por lo cual el volumen de siembra de la α -Amy no alcanzó el 2 % del volumen total, lo cual asegura que no ocurra una modificación en la composición de los sistemas debido a un desplazamiento del equilibrio por dilución de los componentes.

Estos sistemas fueron colocados a la temperatura de trabajo (8°C y 36°C) durante 2 hs, agitando por inversión a intervalos de 15 min durante la primer hora y media, y dejando reposar los 30 min restantes. Luego se centrifugaron 10 min a 600xg y se separaron las fases. Seguidamente se tomaron alícuotas de la fase superior e inferior, se diluyeron convenientemente en *buffer* Pi 50 mM, pH 6,00, se midió su actividad α -Amy y a través un testigo de concentración conocida se expresó la [enzima] en cada fase. Los testigos fueron preparados en cada una de las fases (limpias), sometidos a los mismos procedimientos que los sistemas de trabajo y su actividad fue medida tomando el mismo volumen de alícuota que la fase incógnita. Esto permitió descartar la contribución de las fases en las medidas de actividad.

Seguidamente se calculó Ke , el cual se define como:

$$Ke = \frac{[enzima]_{fase\ sup.}}{[enzima]_{fase\ inf.}} \quad (2.8)$$

y describe el reparto de la enzima entre las fases del SBA.

1.3. Determinación de las funciones termodinámicas de reparto

A partir de los valores de Ke a ambas temperaturas se calcularon la variación de energía libre estándar (ΔG°) y el cambio entálpico estándar (ΔH°) del proceso de reparto de la α -Amy, como se describe a continuación:

$$\Delta G^\circ = - R T \ln Ke \quad (2.9)$$

$$\ln \frac{Ke_1}{Ke_2} = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (2.10)$$

y el cambio entrópico estándar (ΔS°) según la ecuación 2.2.

Ke_1 y Ke_2 son los coeficientes de reparto a las temperaturas T_1 y T_2 , respectivamente.

1.4. Caracterización de la extracción líquido-líquido

El rendimiento teórico en la fase superior de un SBA, $Y\%_{sup}$, se define como la relación porcentual entre la cantidad de enzima en la fase superior respecto de la cantidad total:

$$Y\%_{sup} = \frac{n_{sup}}{n_{tot}} \cdot 100 = \frac{100}{\frac{n_{tot}}{n_{sup}}} = \frac{100}{\frac{n_{sup} + n_{inf}}{n_{sup}}} = \frac{100}{1 + \frac{C_{inf} \cdot V_{inf}}{C_{sup} \cdot V_{sup}}} \quad (2.11)$$

donde n_{tot} , n_{sup} y n_{inf} representan el número de moles totales, en la fase superior e inferior, respectivamente. Teniendo en cuenta las ecuaciones 2.7 y 2.8 el rendimiento de masa recuperada en la fase superior puede expresarse a través de la siguiente ecuación:

$$Y\%_{\text{sup}} = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{R \cdot Ke} \right)} \quad (2.12)$$

El rendimiento teórico en la fase inferior ($Y\%_{\text{inf}}$) o relación porcentual entre la cantidad de enzima en la fase inferior sobre la cantidad total quedará definida como:

$$Y\%_{\text{inf}} = \frac{100}{1 + (R \cdot Ke)} \quad (2.13)$$

Debe considerarse además que:

$$Y\%_{\text{inf}} = 100 - Y\%_{\text{sup}} \quad (2.14)$$

1.5. Efecto de la presencia de NaCl en el reparto

Se prepararon los SBAs con una composición en PEG y fosfato de potasio dada por la tabla 2.3, en presencia de distintas concentraciones de NaCl (0% - 2% - 4% - 6% - 8%), con un volumen total de 4 mL y $R=1$ (2 mL de cada fase). Luego se procedió al reparto de la α -Amy por siembra de 75 μL de una solución 55 mg/mL de enzima, incubación a 8°C, mezclado por inversión, centrifugación, separación de fases, y determinación de Ke , tal como en ausencia de sal (Sección II 1.2. Métodos). Finalmente, se evaluó el rendimiento porcentual (Y%) en cada una de las fases de los sistemas (Sección II 1.4. Métodos).

1.6. Efecto de la variación en la relación de volúmenes entre las fases

Luego de preparados los SBAs según los diagramas de fase de la tabla 2.3, se procedió al armado de nuevos sistemas de 4 mL totales con distintas relaciones de volúmenes entre la fase superior e inferior (tabla 2.4):

TABLA 2.4: Relaciones de volumen, *R*, volúmenes de fase superior e inferior empleados

<i>R</i>	Volumen fase superior (mL)	Volumen fase inferior (mL)
0,33	1,00	3,00
0,60	1,50	2,50
1,00	2,00	2,00
1,67	2,50	1,50
3,00	3,00	1,00

Sobre estos nuevos sistemas se sembraron 75 μ l de una solución de α -Amy 55 mg/mL. Estos se incubaron a 8°C, se mezclaron por inversión, se centrifugaron, se separaron las fases y se determinaron los *Ke* (Sección II 1.2. Métodos). Por último se evaluaron los rendimientos teóricos porcentuales (Y%) en cada fase de los SBAs (Sección II 1.4. Métodos).

2. Caracterización de la interacción PEG-alfa-amilasa

2.1. Naturaleza de la interacción alfa-amilasa/PEG. Calorimetría de titulación isotérmica

Al igual que en la Sección I 3.1. de Métodos, el calorímetro empleado fue el modelo VP-ITC (MicroCal Inc., USA) del Instituto de Química de la UNICAMP, San Pablo, Brasil.

Luego de alcanzar la estabilización de la línea de base, la titulación se llevó a cabo a una temperatura de 20°C por adición de 46 alícuotas de una solución de PEG 2.000 18,24mM en la celda con 1,436mL de α -Amy 1mM, ambas soluciones preparadas en *buffer* Pi 50 mM, pH 7,00. El volumen de las alícuotas de PEG fue de 3 o 6 μ L. En la celda de referencia se colocó agua Milli-Q.

La energía asociada a la interacción entre α -Amy y PEG 2.000 se calculó descontando el calor de dilución tanto de la proteína como del polímero, los cuales fueron determinados titulando (en idénticas condiciones que las precedentemente detalladas) *buffer* en solución de proteína y PEG en *buffer*, respectivamente. Los datos fueron ajustados al modelo de *binding* de sitios independientes y equivalentes (ecuación 1.13). Los ΔG° y ΔS° para la reacción de *binding* fueron calculadas a través de las ecuaciones fundamentales de la termodinámica (ecuaciones 2.1 y 2.2).

3. Análisis conformacional de la alfa-amilasa en los SBAs seleccionados

3.1. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

Se obtuvieron espectros de emisión de F de la α -Amy en un rango de λ entre 300 y 450 nm, excitando a 280 nm, en *buffer* Pi 50 mM 7,00 y en las fases de los SBAs, a 20°C y una concentración final de α -Amy 0,55 mg/mL.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Amnico-Bowman, serie 2, usando cubeta de cuarzo, 1 cm de paso óptico, velocidad de barrido 100 nm min⁻¹, ancho de ranura 4 nm y tres ciclos repetitivos. Todos los espectros fueron corregidos por la contribución del *buffer* y las fases.

3.2. Extinción de la fluorescencia nativa de la alfa-amilasa con acrilamida

Se analizó la extinción de la F nativa de la α -Amy con acrilamida en *buffer* Pi 50 mM a pH 7,00 y en las fases de los SBAs, titulando una solución de α -Amy 0,55 mg/mL (disuelta en dicho *buffer* o en la fase correspondiente) con alícuotas de 10 μ L de acrilamida 4 M.

Los espectros de emisión de F se obtuvieron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman, serie 2, usando cubeta de cuarzo, 1 cm de paso óptico, velocidad de barrido 100 nm min⁻¹, ancho de ranura 4 nm y tres ciclos repetitivos. Todos los espectros fueron corregidos por la contribución del *buffer* y las fases.

Finalmente, los datos experimentales fueron ajustados al modelo de *quenching* de esfera de acción (ecuación 1.17).

3.3. Espectroscopía de dicroísmo circular

Se realizaron espectros de DC de la α -Amy en un rango de λ entre 200 - 260 nm, en *buffer* Pi 50 mM a pH 7,00 y en las fases de los SBAs. La concentración final de α -Amy fue 1,1 mg/mL y la temperatura 20°C.

Las medidas se realizaron en un espectropolarímetro Jasco 810, empleando cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico, ancho de banda 1 nm, tiempo de respuesta 1 s y velocidad de barrido 50 nm min⁻¹. Se realizaron cinco acumulaciones de todos los espectros y se corrigieron por la contribución del *buffer* o fase, según el caso.

4. Análisis funcional de la alfa-amilasa en las fases de los SBAs

Se procedió a determinar la actividad de la α -Amy en las distintas fases de los SBAs, diluidas en forma conveniente para evitar interferencias en las determinaciones. Paralelamente, se midió la actividad en un control de la enzima en *buffer* Pi 50 mM, pH 7,00, determinándose luego el % de actividad remanente en cada una de las fases respecto del control. La concentración final de α -Amy en todos los casos fue 0,22 mg/mL.

5. Estabilidad térmica de alfa-amilasa. Calorimetría diferencial de barrido

5.1. Efecto del PEG en el proceso de desnaturalización térmica de la alfa-amilasa

Al igual que en la Sección I 6.3. de Métodos, el calorímetro diferencial de barrido empleado fue el modelo VP-DSC (Microcal Inc, USA), del Instituto de Química de la UNICAMP, San Pablo, Brasil.

Se obtuvieron los termogramas de la α -Amy en medio *buffer* Pi 50 mM, pH 7,00 y de mezclas α -Amy/PEG 2.000 y α -Amy/PEG 8.000 en el mismo *buffer*. La concentración final de enzima en todos los casos fue de 22 mg/mL y se seleccionaron las relaciones de PEG correspondientes a las T.L. de mayor concentración polimérica, convenientemente diluidas para la obtención de termogramas adecuados (3,65 % P/P para PEG 2.000 y 0,12 % P/P para PEG 8.000).

El rango de temperatura monitoreado fue entre 308 K y 358 K y la velocidad de barrido de 0,5 K/min. La celda de referencia fue cargada con el *buffer* de trabajo.

Los datos de DSC fueron analizados a través del *software Origin 5,00, MicroCal Inc*. Previo a la determinación de los parámetros de desnaturalización, cada termograma fue corregido por sustracción del mismo correspondiente al *buffer*, los datos fueron normalizados de acuerdo a la concentración de enzima y volumen de celda y se restó la línea de base correspondiente. Finalmente se obtuvieron los valores de temperatura de *melting* (T_m) y entalpía calorimétrica (ΔH°_{cal}).

SECCIÓN III: Aplicación a fuentes naturales

1. Determinación de proteínas totales

1.1. Método de Warburg

Este método empleado para cuantificar proteínas fue el descrito por Warburg (Warburg y Christian, 1.942) y consiste en la medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, correspondientes mayoritariamente a la absorción de ácidos nucleicos y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas de las proteínas, respectivamente. El instrumental utilizado para la medición fue un espectrofotómetro de doble haz Jasco V-530 con un algoritmo que determina la concentración de proteínas y ácidos nucleicos contenidos en el volumen de la cubeta.

Se realizaron mediciones de absorbancia de cantidades crecientes de las muestras, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico conteniendo un volumen inicial de 2,00 mL de agua destilada. La concentración de proteínas totales (expresada en $\mu\text{g/mL}$) se determinó a partir de la pendiente de las gráficas de concentración de proteína en la cubeta en función de la relación de volúmenes inicial y final (V_i/V_f).

Se reservaron fases superiores e inferiores o *buffer*, según sea el caso, a los que no se les incorporó proteína para llevar a cabo los blancos correspondientes.

1.2. Método del ácido bicinconínico (BCA)

El ensayo del ácido bicinconínico para la determinación de proteínas fue descrito por Smith (Smith y col., 1.985) y, al igual que el método de Lowry (Lowry y col., 1.951), se fundamenta en la formación de un complejo entre las proteínas y Cu^{+2} en medio alcalino, seguido de reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} . Éste último reacciona con el BCA desarrollándose un intenso color púrpura con un máximo de absorción a 562 nm. Dado que la producción de Cu^{+1} es función de la concentración de proteínas y del tiempo de incubación, el contenido proteico de las muestras incógnitas debió ser determinado espectrofotométricamente en comparación con un estándar de concentración conocida.

Se empleó el kit comercial de BCA (Sigma-Aldrich), el cual contiene los siguientes reactivos:

- Reactivo A: bicinconinato de sodio (0,1 g), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2 g), tartrato de sodio dihidratado (0,16 g), NaOH (0,4 g) y NaHCO_3 (0,95 g) en 100 mL de H_2O , pH 11,25 ajustado con NaOH 10 M.
- Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 g) en 10 mL de H_2O .
- Solución de proteína estándar: albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL en NaCl 0,15 M y 0,05 % de azida de sodio como preservante microbiano.

Procedimiento:

Se preparó la solución de trabajo por mezclado de 49 mL del reactivo A y 1 mL del reactivo B. Se mezclaron 2 mL de esta solución de trabajo con 0,1 mL de la mezcla proteica (incógnita o estándar de BSA). Estas mezclas se incubaron 30 min a 37°C, se dejaron enfriar y se midió la Abs. a 562 nm. La concentración de proteínas se determinó a través de una curva de calibrado con las muestras estándares de BSA (Abs. 562 nm vs. concentración de BSA). Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V-530 de doble haz, con cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico.

2. Preparación del tejido homogeneizado de páncreas bovino (HPB)

El páncreas bovino fue gentilmente cedido por el frigorífico “Las Heras”, Buenos Aires. Previo a su procesamiento, se eliminó manualmente la materia grasa, se lavó exhaustivamente con *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00 y se trituró en procesadora eléctrica (minipimer Philips HR1363, 600W). Luego, a dicho material se agregó un volumen equivalente del mismo *buffer* y se continuó triturando hasta obtener un producto homogéneo. Todos estos pasos fueron realizados en baño de hielo. Para el clarificado se filtró a través de gasa y se centrifugó a bajas temperaturas (10 min, 910xg, 8°C). El sobrenadante obtenido fue ajustado al pH óptimo de estabilidad de la alfa-amilasa (6,00) y almacenado hasta su uso a -18°C.

Todas las determinaciones de actividad enzimática informadas fueron realizadas dentro de un rango de actividades lineales correspondientes a una curva de calibración realizada en *buffer* Pi. En dicha curva se graficó actividad enzimática vs. concentración de HPB.

3. Producción de alfa-amilasa fúngica: Cultivo líquido en lote de *Aspergillus oryzae*

La cepa de *Aspergillus oryzae* empleada fue la NRRL 695, cedida por The National Center for Agricultural Utilization Research (ARS), USDA, USA.

3.1. Optimización de variables experimentales de cultivo

Esta cepa fue propagada en medio Agar Papa Glucosado (APG) a 30°C, durante cinco días. Luego de dicho período de incubación, las esporas fueron suspendidas en 15 mL de agua destilada, en agitación constante durante 20 min y su concentración fue determinada por medidas de densidad óptica a 700 nm (previa realización de una curva de calibración de Abs 700 nm vs. [esporas] (esporas/mL), por recuento en cámara de Thoma).

Un volumen apropiado de esta suspensión madre de esporas fue empleado como inóculo para la siembra de un medio líquido mínimo hasta una concentración final de 10^6 esporas/mL. Dicho medio mínimo contenía almidón como única fuente de carbono disponible, es decir es específico para estimular la síntesis y secreción de alfa-amilasa por parte del microorganismo.

Este cultivo líquido se incubó durante cuatro días, en agitación orbital sin interrupción a 150 rpm, a 30°C. Luego se filtró y el sobrenadante fue empleado como fuente natural de alfa-amilasa fúngica (Kammoun y col., 2008).

Con el fin de optimizar los parámetros experimentales para la obtención del producto final con el mayor rendimiento enzimático posible, se ensayaron distintos factores que afectan al proceso global, tales como: composición del medio mínimo y niveles de nutrientes, concentración de sustrato y tiempo de incubación.

Al igual que para el HPB previamente descrito (Sección III 2. Métodos), todas las determinaciones de actividad enzimática informadas fueron medidas dentro de un rango de actividades lineales correspondientes a una curva de calibración realizada en *buffer* Pi. En dicha curva se graficó actividad enzimática vs. volumen del sobrenadante.

3.1.1. Composición del medio mínimo

Se prepararon medios con diferentes composiciones por disolución de los componentes en agua destilada, todos llevados hasta pH final 5,00, según se detalla en la tabla 2.5:

TABLA 2.5: Composición de dos medios mínimos ensayados. pH final 5,00. Fuente de carbono: almidón

MEDIO 1 (BÁSICO)		MEDIO 2 (OPTIMIZADO)	
Componente	Concentración (g/L)	Componente	Concentración (g/L)
Peptona	15	Peptona	1,875
NaCl	10	Urea	1,25
KH ₂ PO ₄	0,5	Glicerol	0,625
MgSO ₄	0,5	KH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂	0,5	MgSO ₄	0,25
Almidón	17	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25
		Almidón	17

Estos medios resultan de una adaptación de los utilizados por Radhouane Kammoun y col., los cuales fueron optimizados con los diseños estadísticos Plackett-Burman y Taguchi. La temperatura, agitación y tamaño del inóculo se resolvió por medio del diseño Box-Behnken, quienes utilizaron superficie de respuesta (Kammoun y col., 2.008).

3.1.2. Concentración de sustrato (almidón)

Se prepararon medios con composiciones correspondientes al optimizado (medio 2, tabla 2.5) pero con concentraciones variables de almidón: 17 g/L - 13,6 g/L - 20,4 g/L y 34 g/L. En todos los casos se mantuvieron constantes los demás parámetros y condiciones experimentales, determinándose luego la actividad alfa-amilasa recuperada en cada caso.

3.1.3. Tiempo de incubación en el medio mínimo

Se realizó un seguimiento de la productividad (Actividad alfa-amilasa/Tiempo) en función del tiempo de incubación del cultivo. Para esto se prepararon medios con la composición y concentración de sustrato previamente seleccionadas (medio 2, [almidón] 17 g/L, tabla 2.5). Estos fueron incubados a 30°C en agitador orbital a 150 rpm. Se tomaron alícuotas a distintos períodos de tiempo las cuales fueron centrifugadas en frío (10 min, 18.000 rpm, 15°C) y se midió la actividad alfa-amilasa en los sobrenadantes. Esto se realizó durante nueve días, obteniéndose el perfil de Productividad (U L⁻¹ días⁻¹) vs. tiempo (días).

3.2. Empleo de fuentes alternativas de almidón para la producción de alfa-amilasa a partir de cultivos de *Aspergillus oryzae*

Se emplearon como fuente alternativa de almidón productos de desechos de la cosecha del trigo. Los mismos se recogieron en campos locales post-cosecha del trigo, procesándose de diferentes maneras para obtener distintas muestras: *muestra A*) triturado y esterilización; *muestra semillas*) se seleccionaron manualmente las semillas las cuales fueron secadas en estufa, trituradas en mortero, tamizadas (apertura malla 840 micrones) y esterilizadas.

Estas muestras fueron empleadas en reemplazo de una cantidad equivalente de almidón en los medios de cultivo. La composición de los medios se detalla en la tabla 2.6 y fueron preparados por disolución de los componentes en agua destilada y llevados a pH final 5,00:

TABLA 2.6: Composición de los medios mínimos ensayados. pH final 5,00

MEDIO A		MEDIO SEMILLAS	
Componente	Concentración (g/L)	Componente	Concentración (g/L)
Peptona	1,875	Peptona	1.875
Urea	1,25	Urea	1,25
Glicerol	0,625	Glicerol	0,625
KH ₂ PO ₄	0,5	KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	0,25	MgSO ₄	0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,025	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,025
Muestra A	24	Muestra semillas	24

Un volumen apropiado de suspensión madre de esporas fue empleado como inóculo para la siembra de estos medios hasta una concentración final de 10⁶ esporas/mL. Estos cultivos líquidos se incubaron durante cuatro días en agitador orbital a 150 rpm y 30°C. Seguidamente se filtraron y los sobrenadantes fueron empleados como fuente natural de alfa-amilasa fúngica.

Al igual que en los cultivos con almidón (Sección III 3.1. Métodos), todas las actividades enzimáticas informadas fueron medidas dentro de un rango de actividades lineales correspondientes a curvas de calibración realizadas en *buffer* Pi. En dicha curva se graficó actividad enzimática vs. volumen del sobrenadante.

3.3. SDS-PAGE de los filtrados de los medios de cultivo

Se realizó una SDS-PAGE de los sobrenadantes de los cultivos fúngicos donde se detectó actividad alfa-amilasa (MEDIOS 2, A y SEMILLAS).

Se empleó el equipo Mini-Protean (Bio-Rad®) armándose un sistema de geles discontinuos (10% gel de concentración, 13% gel de resolución). La visualización de las bandas proteicas se llevó a cabo a través del protocolo de tinción con el colorante *Coomassie brilliant blue* (Neuhoff y col., 1.988; Neuhoff y col., 1.990). Como marcador de peso molecular se empleó el kit comercial Sigma Marker Molecular Weight, Low Range.

3.4. Estabilidad catalítica de la alfa-amilasa fúngica a pH 7,00 y 3,00

El sobrenadante del cultivo en medio semillas fue incubado a 20°C durante 24 hs, período durante el cual se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se determinó su actividad alfa-amilasa.

Una parte de este sobrenadante fue acidificado hasta pH 3,00 por agregado de HCl y también fue incubado a 20°C determinándose la actividad alfa-amilasa a distintos períodos de tiempo. Estos datos experimentales se ajustaron a una cinética de inactivación ácida de primer orden (ecuación 2.5) obteniéndose la constante de velocidad del proceso de inactivación (pendiente del gráfico log actividad vs. tiempo).

4. Aplicación de la metodología de precipitación con polielectrolitos sobre fuentes naturales de la alfa-amilasa

4.1. Precipitación de alfa-amilasa con PAA a partir del HPB

Se adaptó el modelo de precipitación diseñado para la α -Amy comercial (Sección I 7.1 Métodos) en la precipitación de la alfa-amilasa presente en el HPB.

Luego de descongelar y antes de usar el HPB, éste fue centrifugado nuevamente (5 min 815xg), como un paso extra de clarificado. A continuación se diluyó convenientemente en *buffer* Pi 50 mM, pH 3,00 (25 μ L de HPB en 2,30 mL de *buffer*) y se adicionaron 200 μ L de PAA 240.000 (diluido 1/200). Esta mezcla se incubó durante 30 min a 8°C, se centrifugó 5 min a 1.373xg, se separó el sobrenadante del precipitado y este último se redisolvió hasta volumen inicial en *buffer* Pi 50 mM, pH 6,00.

Luego se midió la actividad alfa-amilasa y concentración de proteínas totales (PT) y ácidos nucleicos (AN) en el precipitado redisuelto (PP), sobrenadante (SN) y en un control del HPB (igual dilución que en la mezcla de precipitación pero en *buffer* Pi 50 mM pH 6,00 y en ausencia de PAA). Las determinaciones de [PT] y [AN] se realizaron a través del Método de Warburg.

Finalmente se calculó la actividad específica (Act. esp.), factor de purificación (FP) y rendimiento (R %) en cada una de las fracciones, a través de las siguientes expresiones:

$$Act. esp = \frac{Act.(fracción)}{PT(mg)} \quad (2.15)$$

$$FP = \frac{Act. esp.(fracción)}{Act. esp.(control)} \quad (2.16)$$

$$R\% = \frac{Act.(fracción)}{Act.(control)} \cdot 100 \quad (2.17)$$

4.2. Precipitación de alfa-amilasa con PAA a partir de cultivos líquidos de *Aspergillus oryzae*

Se adaptó la metodología de precipitación diseñada para la α -Amy comercial (Sección I 7.1. Métodos) sobre los sobrenadantes (en adelante, filtrados) de los cultivos líquidos de *Aspergillus oryzae*, tanto cuando se empleó almidón (medio 2) o fuentes alternativas del mismo (medio A).

Las precipitaciones fueron llevadas a cabo por agregado de alícuotas de diferentes volúmenes de PAA en forma directa sobre el filtrado, llevándose luego el pH del medio gradualmente hasta el valor de 3,00 (por agregado de HCl). Esta mezcla se dejó incubar a 8°C durante 30 min, se centrifugó 15 min a 1.274xg y 8°C, se separó el sobrenadante del precipitado y este último se redisolvió en *buffer* Pi 50 mM a pH 6,00. Todos estos pasos se realizaron en baño de hielo.

En la siguiente tabla se detallan los volúmenes y concentraciones de PAA empleados, partiendo en todos los casos de un volumen de filtrado de 2 mL:

Tabla 2.7: Condiciones de precipitación de alfa-amilasa en los cultivos fúngicos

	Vol. PAA (μ l)	[PAA] (%P/P)
PAA 240.000		
<i>Medio A</i>	20	2,50
<i>Medio 2</i>	30	2,50
PAA 100.000		
<i>Medio A</i>	10	3,50
<i>Medio 2</i>	50	0,35
	10	3,50
	30	3,50

Posteriormente se determinó la actividad de la alfa-amilasa, [PT] y [AN] en cada una de las fracciones y en el control (filtrado sin ningún tratamiento). Las concentraciones de proteínas totales y ácidos nucleicos se determinaron a través del método de Warburg.

Se calcularon la actividad específica, factor de purificación y rendimiento, según las ecuaciones 2.15, 2.16 y 2.17.

5. Aplicación de la metodología de reparto en SBAs sobre fuentes naturales de alfa-amilasa

5.1. Reparto del HPB en los SBAs seleccionados

Para la preparación de los SBAs y el reparto de la enzima pancreática se siguió el mismo procedimiento general que para la enzima comercial (Sección II 1.1. Métodos) con volúmenes finales de SBA de 4 mL totales, sin el agregado de NaCl y **R** óptimos, según los Y% obtenidos en cada sistema. Los SBAs empleados fueron: **PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L.3/R1 y R3** y **PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L.1/R1 y R 0,33**. Los volúmenes de fase utilizados para cada **R** son los que se describen en la tabla 2.4.

Una vez equilibradas las fases se procedió a la siembra de 100 μ l de HPB, se incubó durante 2 hs (con agitación por inversión a intervalos de 15 min durante la primer hora y media) y se centrifugó 10 min a 600xg. La temperatura de trabajo fue 25°C.

Luego de determinar el volumen de cada fase y de su separación, se determinó la actividad alfa-amilasa y concentración de proteínas totales y ácidos nucleicos en cada una de ellas. Seguidamente se calcularon los coeficientes de reparto de actividad

enzimática, Ke (ecuación 2.8) y de proteínas totales (Kp). Este último es el cociente entre la [PT] en la fase superior e inferior.

La determinación de PT y AN se llevó a cabo a través del método de Warburg. Se realizaron los blancos correspondientes con fases superior e inferior “limpias”, es decir, en ausencia de HPB. Finalmente se calcularon la actividad específica en el HPB y en cada una de las fases, factor de purificación y rendimiento porcentual del proceso (ecuaciones 2.15, 2.16 y 2.17).

5.2. Reparto en SBAs de la alfa-amilasa proveniente de cultivos líquidos de *Aspergillus oryzae*

Los SBAs utilizados para el reparto de la enzima fúngica fueron preparados de acuerdo a la composición de la tabla 2.3, reemplazando la masa correspondiente al agua por una cantidad equivalente de los filtrados de los cultivos de *Aspergillus oryzae* (medio 2 y medio A).

Se prepararon sistemas de 10 g los cuales fueron agitados hasta disolución total del PEG y el fosfato y se incubaron durante 24 hs a temperatura ambiente (25°C). Pasado dicho período, se midieron los volúmenes de fase y las mismas se separaron, determinándose la actividad de alfa-amilasa y proteínas totales por el método del ácido bicinconínico (BCA) en cada una de ellas y en el control (filtrado de los cultivos fúngicos sin tratamiento).

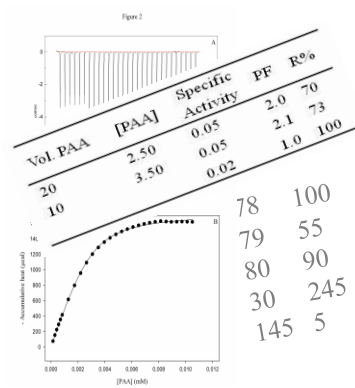
Finalmente se calcularon Ke (ecuación 2.8) y Kp (Sección III 5.1. Métodos), actividad específica, factor de purificación y rendimiento porcentual (ecuaciones 2.15, 2.16 y 2.17) en cada fase y en el control.

6. Procesamiento de los datos experimentales

El ajuste estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el programa Sigma Plot, versión 10.0 (Windows) el cual emplea el algoritmo Marquardt-Levenberg (Marquardt, 1.963).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO 3: Resultados y Discusión

SECCIÓN I: Precipitación con PEs

1. SDS-PAGE del liofilizado comercial de alfa-amilasa (*Aspergillus oryzae*)

La figura 3.1 muestra la SDS-PAGE del liofilizado comercial de α -Amy:

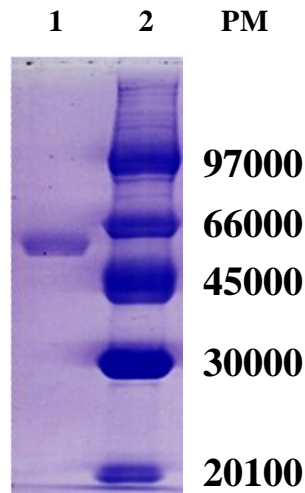


Figura 3.1: SDS-PAGE. Calle 1: α -Amy - Calle 2: marcadores de peso molecular.

En la calle 1 se obtuvo una banda intensa de 50 kDa la cual se trata de la α -Amy. Ésta representa la totalidad del contenido proteico de la muestra.

2. Determinación de las condiciones de precipitación y disolución de los complejos PAA/alfa-amilasa

2.1. Efecto de la concentración de PAA. Curvas de titulación turbidimétrica α -Amy/PAA

Los complejos proteínas/PE pueden ser solubles o insolubles no solo en función de variables inherentes al medio (tales como pH y fuerza iónica) sino también de las concentraciones relativas de ambos componentes, formando complejos solubles a bajas concentraciones del PE. A medida que se va elevando la concentración relativa del PE, los complejos pueden agregarse y formar estructuras macroscópicas, lo cual se traduce en un aumento brusco en la turbidez del sistema (Cooper y col., 2.005).

Al graficar Abs. a 400 nm vs. relación molar PAA/ α -Amy se pueden obtener curvas sigmoideas o hiperbólicas, las cuales responden a mecanismos de saturación de formación de los complejos. A partir de estas curvas se puede obtener el valor de “ e ”, el cual permite analizar el poder precipitante de los polielectrolitos sobre la enzima de interés, seleccionándose aquellos que den lugar a estequiometrías que indiquen alta eficiencia de precipitación con baja cantidad de polímero (por ejemplo, 10 moléculas de proteína por cada molécula de polímero, o superior).

En la figura 3.2 se muestran las curvas de titulación turbidimétrica obtenidas con PAA 240.000. Para independizar al sistema del volumen se graficó Abs. a 400 nm en función de la relación molar PAA/ α -Amy.

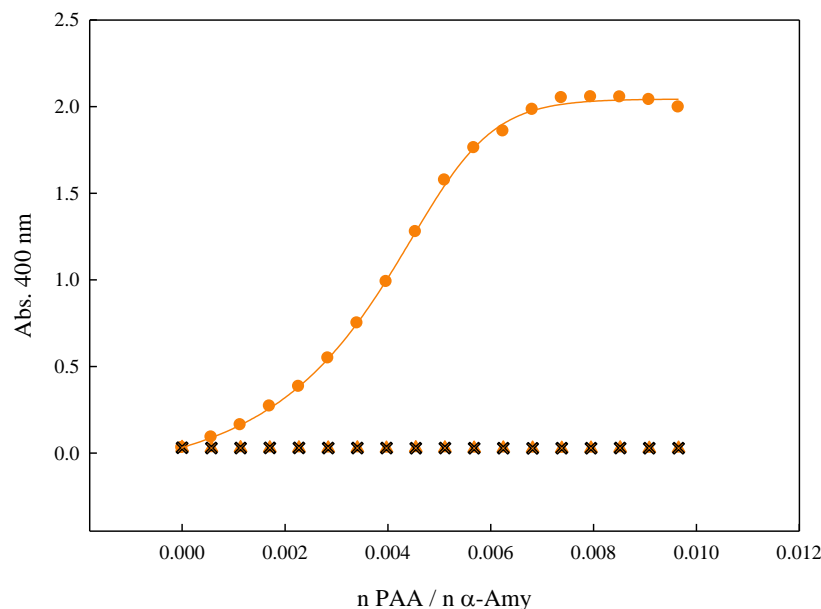


Figura 3.2: Curvas de titulación turbidimétrica de la α -Amy con PAA 240.000: Abs. a 400 nm vs. relación molar PAA/ α -Amy. pH del medio: 3,00 (●); 4,00 (▲); 5,00 (x) y ajuste matemático (—). Medio buffer Pi 50 mM. Temperatura 20°C.

Se observó turbidez solo cuando la titulación fue llevada a cabo a pH 3,00, lo cual se debe al estado de carga de la α -Amy a dicho pH, permitiendo una mayor interacción electrostática con el PAA, a diferencia de lo que ocurre a pH 4,00 y 5,00.

La formación de este complejo siguió un comportamiento sigmoideo, lo cual se relaciona con un mecanismo del todo o nada, es decir, es necesario alcanzar una relación molar de formación del complejo crítica, para favorecer la interacción entre las partículas de complejo soluble y así formarse agregados de mayor tamaño.

La estequiometría del complejo, “ e ”, calculada por mol de PAA a pH 3,00 fue de 154 ± 5 , lo que indica que un gran número de moléculas de proteína se unen a una única molécula de PAA, lo cual sugiere que este polímero podría ser un buen precipitante de la α -Amy. O bien, $n \alpha$ -Amy/ n monómero $0,046 \pm 0,001$.

La figura 3.3 muestra las curvas de titulación turbidimétrica obtenidas con PAA 100.000:

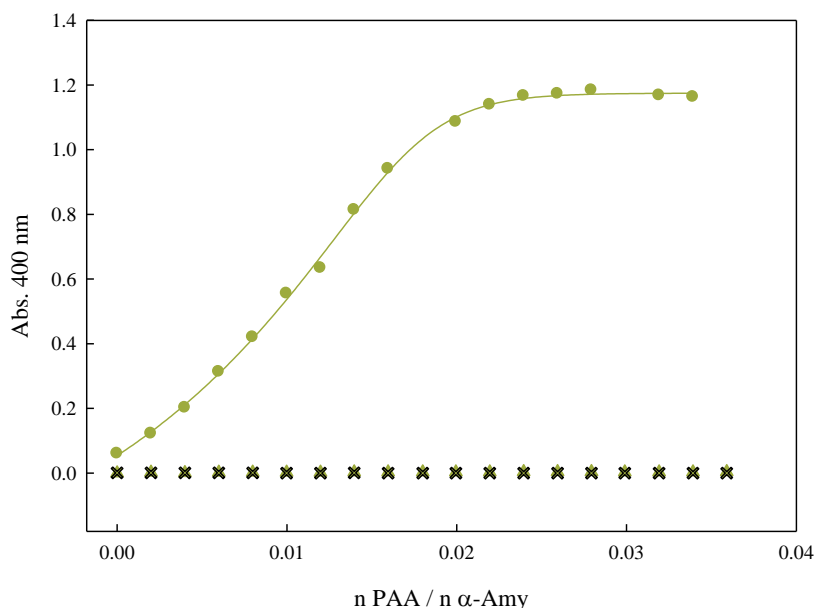


Figura 3.3: Curvas de titulación turbidimétrica de la α -Amy con PAA 100.000: Abs. a 400 nm vs. relación molar PAA/ α -Amy. pH del medio: 3,00 (\bullet); 4,00 (\blacktriangle); 5,00 (\times) y ajuste matemático ($-$). Medio buffer Pi 50 mM. Temperatura 20°C.

Al igual que en el caso anterior, solo se detectó turbidez a pH 3,00, efecto del estado de carga de la α -Amy. Cabe destacar que el valor de turbidez máximo alcanzado disminuyó al decrecer el peso molecular del PAA (> 2 para PAA 240.000 y $\approx 1,2$ para PAA 100.000). Esto podría atribuirse a un menor tamaño o número de partículas formadas al disminuir el peso molecular del polielectrolito.

En este caso, la formación del complejo siguió una tendencia sigmoidea y la estequiometría del complejo, “ e ”, calculada por mol de PAA a pH 3,00 fue de 52 ± 4 , lo cual hace a este polielectrolito otro potencial precipitante de la enzima. La estequiometría calculada en función de los moles de acrilato fue de $0,037 \pm 0,003$ $n \alpha$ -Amy/ n monómero.

En la figura 3.4 se muestran las curvas de titulación turbidimétrica obtenidas con PAA 5.000:

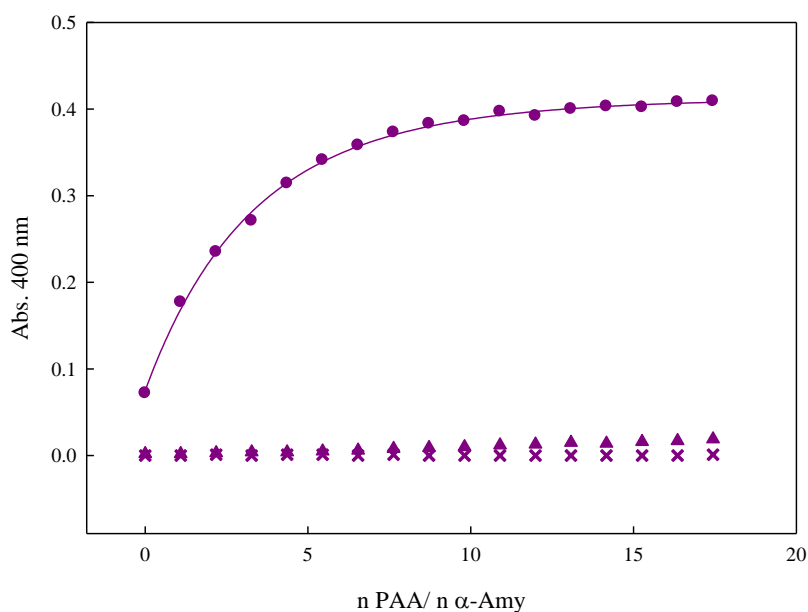


Figura 3.4: Curvas de titulación turbidimétrica de la α -Amy con PAA 5.000: Abs. a 400 nm vs. relación molar PAA/ α -Amy. pH del medio: 3,00 (●); 4,00 (▲); 5,00 (×) y ajuste matemático (—). Medio buffer Pi 50 mM. Temperatura 20°C.

Nuevamente solo se evidenció turbidez a pH 3,00, aunque en menor magnitud respecto de los casos anteriores. Esto sugiere que el tamaño o número de partículas de complejo insoluble que se forman es también menor, con lo cual se requieren cantidades mayores de polímero para alcanzar un precipitado apreciable.

La forma de la gráfica se ajusta a una función hiperbólica, lo cual sugiere un mecanismo de saturación de formación del complejo, aunque diferente a los casos anteriores.

La estequiometría del complejo, “ e ”, calculada a pH 3,00 para este caso fue de $0,16 \pm 0,01$, es decir, aproximadamente 6 moles de PAA 5.000 se unen por mol de α -Amy. Esta estequiometría inversa sugiere que el PAA 5.000 no es un buen precipitante de la enzima. Esto también se verifica por los bajos valores de turbidez alcanzados.

De acuerdo a estos resultados, el pH de trabajo seleccionado como el de mayor interacción entre la α -Amy y el PAA fue de 3,00, descartando al PAA 5.000 como posible precipitante de la enzima.

2.2. Efecto del pH. Diagramas de fase α -Amy/PAA

Se seleccionaron relaciones molares PAA: α -Amy cercanas al *plateau* obtenido en las curvas de titulación turbidimétrica a pH 3,00 (figuras 3.2 y 3.3) para realizar los barridos de pH correspondientes.

En la figura 3.5 se muestran los diagramas de fase para el complejo α -Amy/PAA 240.000:

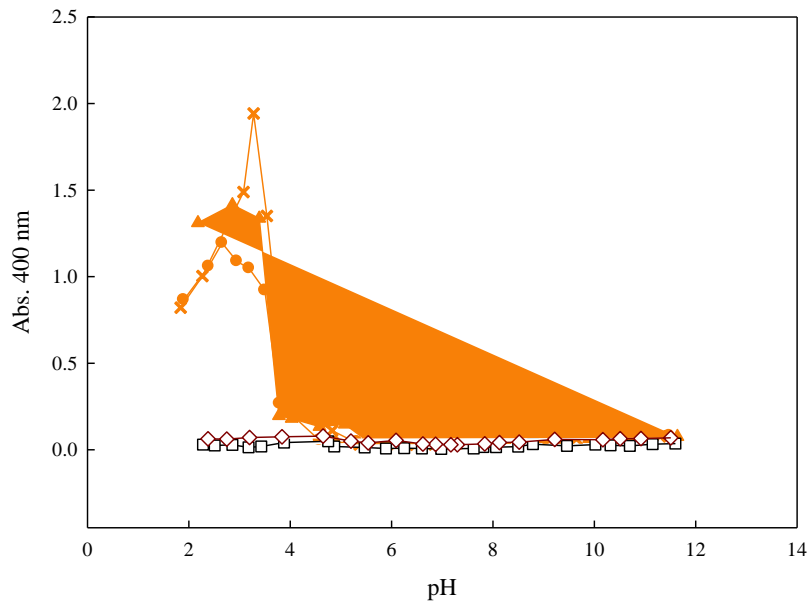


Figura 3.5: Diagramas de fase del complejo α -Amy/PAA 240.000: Abs. a 400 nm vs. pH. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:135 (●); 1:126 (▲); 1:117 (×); solo PAA (□) y solo α -Amy (◇). Medio buffer fosfato 50 mM. Temperatura 20°C.

La turbidez alcanzada fue mayor al aumentar la cantidad de PAA, siendo el rango de pH de insolubilidad del complejo el mismo en todos los casos. Esto significa que el pH de solubilidad o insolubilidad es independiente de la relación molar empleada dentro del rango de relaciones molares cercano a la “e”.

Este complejo mostró ser insoluble a pHs menores a 4,00, aproximadamente, solubilizándose por completo por encima de este valor.

Los diagramas de solubilidad para el complejo α -Amy/PAA 100.000 se muestran en la figura 3.6:

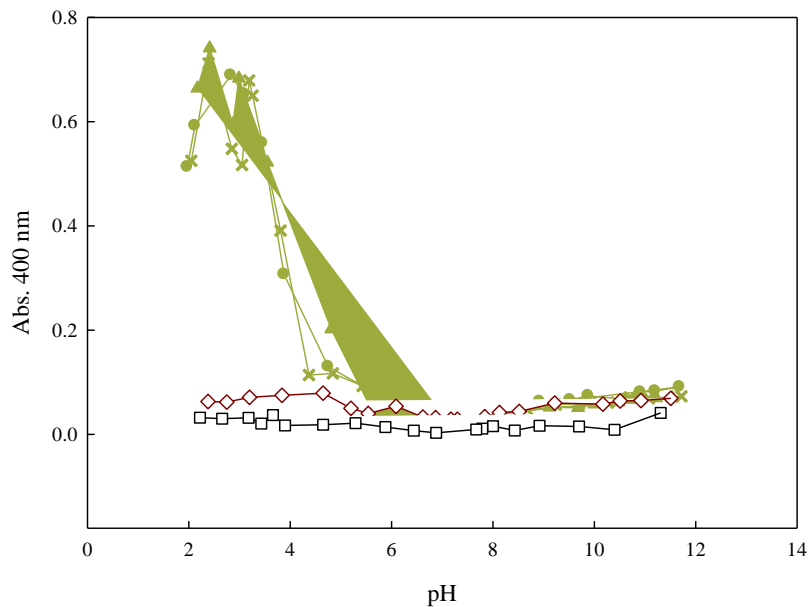


Figura 3.6: Diagramas de fase del complejo α -Amy/PAA 100.000: Abs. a 400 nm vs. pH. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:46 (●); 1:42 (▲); 1:39 (x); solo PAA (□) y solo α -Amy (◇). Medio buffer fosfato 50 mM. Temperatura 20°C.

Este complejo resultó ser soluble a pHs por encima de 5,50, aproximadamente, manteniendo el mismo rango de solubilidad para todas las relaciones molares ensayadas.

Se descartó la contribución individual de los componentes por separado a través de barridos de pH controles: α -Amy en ausencia de PAA y viceversa. Dado que en estas condiciones no se observó turbidez alguna, se puede afirmar que la misma se debe a la formación de los complejos y no a la desnaturalización de la enzima a pHs ácidos o a la insolubilidad del polímero.

Según la información obtenida de estos diagramas de solubilidad, el pH de trabajo seleccionado para ambos PAA fue nuevamente de 3,00, el cual coincide con el pH de máxima turbidez en las curvas de titulación (figuras 3.2 y 3.3). A este pH nos aseguramos que se forma el complejo insoluble, alcanzando una turbidez suficiente para dar lugar a un precipitado apreciable.

2.3. Efecto de la fuerza iónica. Curvas de titulación turbidimétrica en presencia de NaCl

En muchos casos la interacción PE/proteína tiene un elevado carácter electrostático, lo cual hace que sea posible redissolver los complejos formados por los mismos a través de un aumento en la fuerza iónica del medio (Romanini y col., 2007).

En las figuras 3.7 y 3.8 se muestra la Abs. a 400 nm en función de la relación molar PAA/ α -Amy al utilizar como titulante PAA 240.000 y PAA 100.000, respectivamente, en presencia de NaCl 1M.

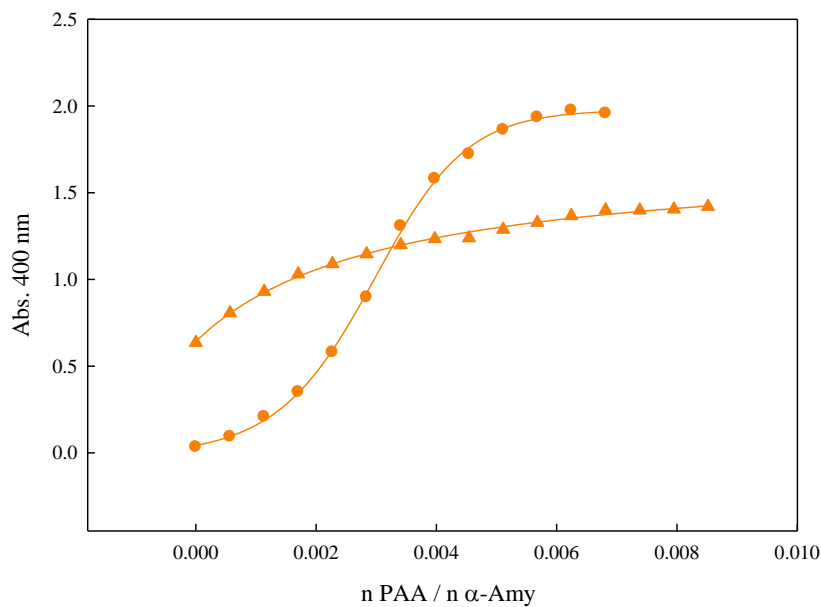


Figura 3.7: Curvas de titulación turbidimétrica de la α -Amy con PAA 240.000: Abs. a 400 nm vs. relación molar PAA/ α -Amy. NaCl 0 M (●), 1 M (▲) y ajuste matemático (—). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C.

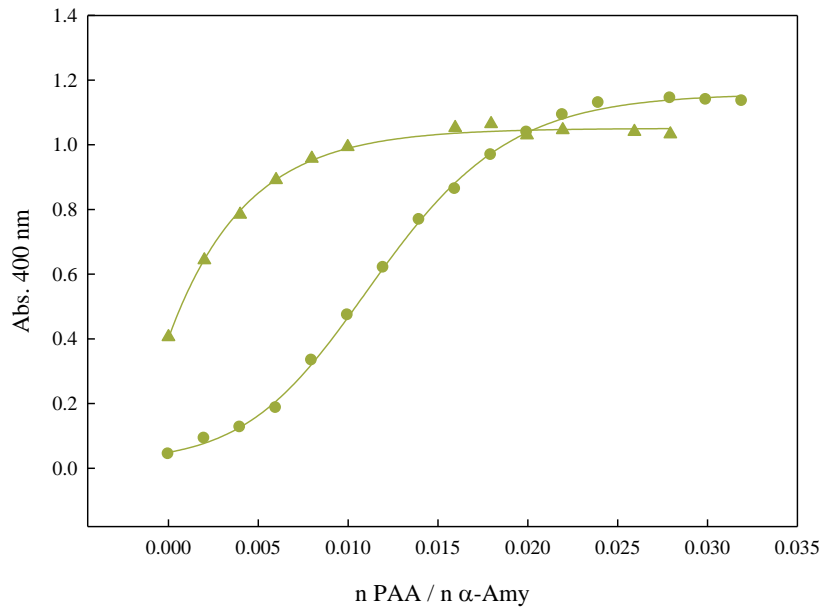


Figura 3.8: Curvas de titulación turbidimétrica de la α -Amy con PAA 100.000: Abs. a 400 nm vs. relación molar PAA/ α -Amy. NaCl 0 M (\bullet); 1 M (\blacktriangle) y ajuste matemático ($-$). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C.

El comportamiento frente a esta abrupta variación en la fuerza iónica resultó ser similar para ambos complejos: por un lado, aún una concentración suficientemente alta de NaCl (1 M) no fue suficiente para disminuir la turbidez del sistema, lo que indica que los complejos no son redissueltos por completo. Por otro lado, se registró un cambio en la forma de las curvas (de sigmoideas a hiperbólicas) lo que implica un mecanismo diferente de asociación.

Estos resultados sugieren que aumentar la fuerza iónica del medio no es una alternativa de elección para redissolver los complejos α -Amy/PAA. En su lugar, es conveniente modificar el pH del medio a valores aproximadamente mayores o iguales a 4,00 (PAA 240.000) y 5,50 (PAA 100.000), tal como se mencionó anteriormente (Sección I 2.2. R y D), o bien al valor de 6,00, ya que a dicho pH no sólo nos aseguramos la redisolución completa de los complejos sino que también se encuentra dentro del rango de mayor estabilidad de la α -Amy (5,00 - 8,00) (Carlsen y col., 2.006).

3. Caracterización de la interacción PAA/alfa-amilasa

3.1. Naturaleza de la interacción PAA/alfa-amilasa. ITC

En la figura 3.9 A se muestra la isoterma (a 20°C) obtenida por ITC para la interacción α -Amy/PAA 240.000 y en 3.9 B el calor total intercambiado luego de cada agregado del PE en valor absoluto (- Qacumulado) en función de la concentración de ligando total ([PAA]), junto con el ajuste de los datos experimentales al modelo de fijación de sitios equivalentes e independientes, corregidas por efectos de dilución:

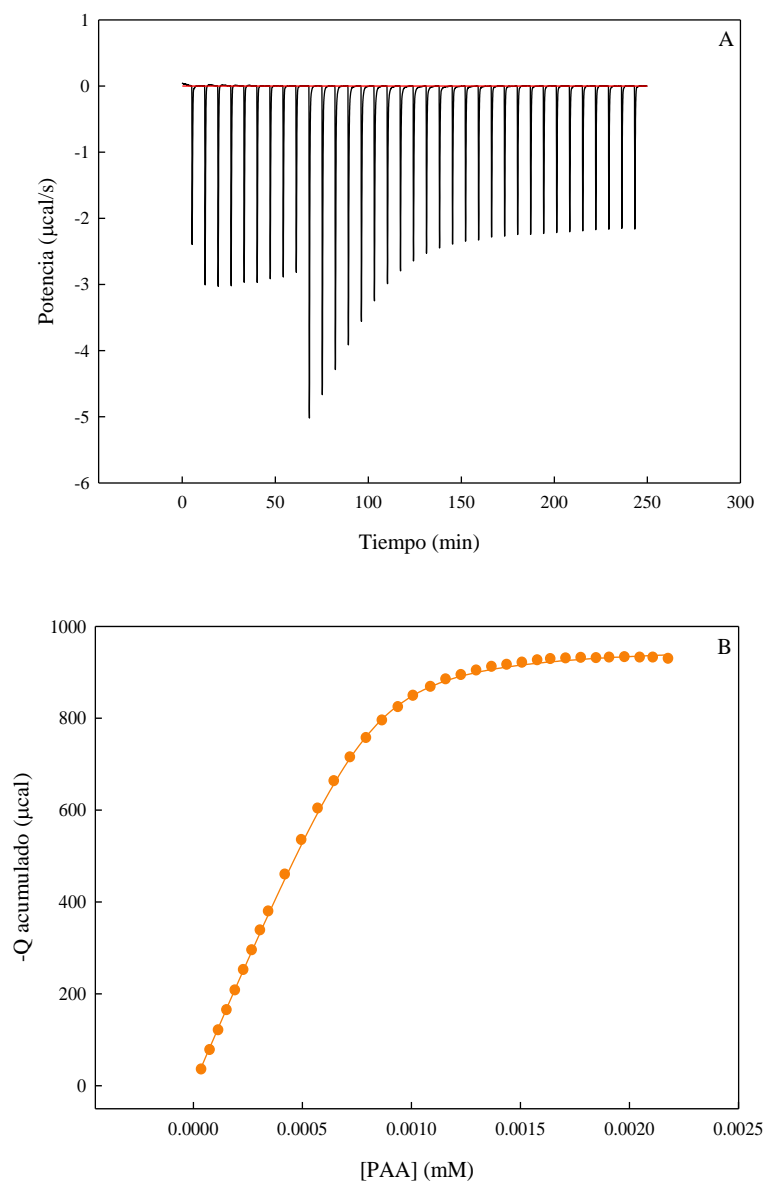


Figura 3.9: ITC α -Amy/PAA 240.000. A- Potencia ($\mu\text{cal/s}$) vs. Tiempo (min).
 B- $|\text{Qacumulado}|$ (μcal) vs. $[\text{PAA}]$ (mM). Ajuste matemático (—).
 Medio buffer Pi 50 mM, pH 3,00, Temperatura 20°C.

Las mismas representaciones se muestran en las figuras 3.10 A y B para la titulación de α -Amy con PAA 100.000:

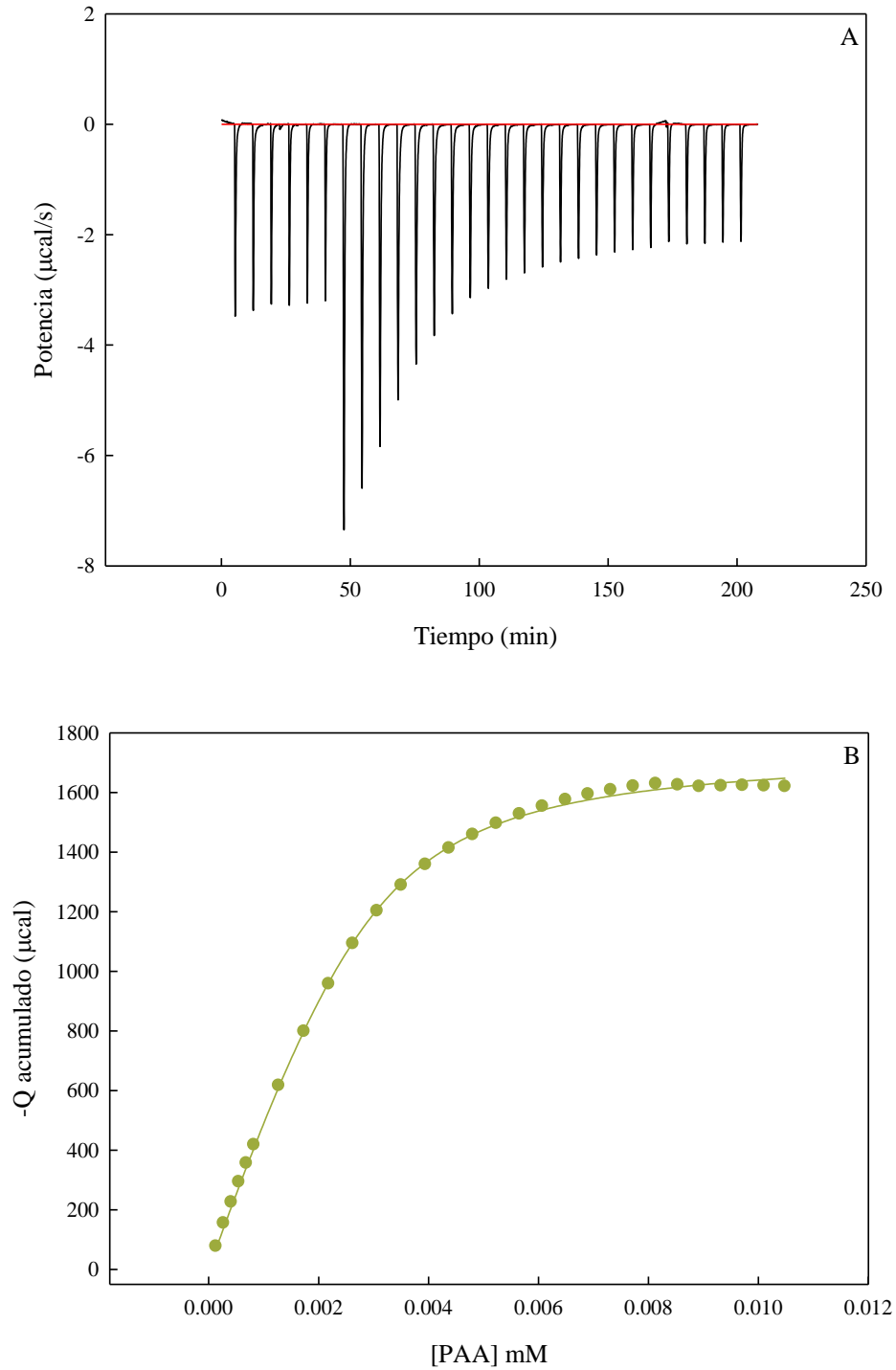


Figura 3.10: ITC α -Amy/PAA 100.000. **A-** Potencia ($\mu\text{cal/s}$) vs. Tiempo (min).
B- $|Q_{\text{acumulado}}|$ (μcal) vs. [PAA](mM). Ajuste matemático (—).
 Medio buffer Pi 50 mM, pH 3,00, Temperatura 20°C.

Estos resultados mostraron una interacción predominantemente exotérmica, con deflexiones negativas respecto de la línea de base para ambos PAA y calores acumulados negativos, alcanzando saturación a una dada concentración de PAA.

Los parámetros K , ΔH° y n arrojados por el ajuste de los datos experimentales al modelo de *binding* de sitios equivalentes e independientes, junto con las funciones termodinámicas ΔG° y ΔS° , se muestran en la tabla 3.1:

TABLA 3.1: Funciones termodinámicas y parámetros de fijación de la α -Amy a PAA

PAA	ΔH° (cal/mol)	$K (M^{-1})$	n	ΔG° (cal/mol)	ΔS° (cal/Kmol)
240.000	-1.677 ± 3	$2,7 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-5}$	-5.980 ± 40	$14,7 \pm 0,1$
100.000	-3.040 ± 10	$2,1 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^2$	$7,3 \times 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	-4.480 ± 60	$4,9 \pm 0,2$

Según estos resultados, para el sistema α -Amy/PAA 240.000, aproximadamente 476 ± 2 moles de proteína se unen por mol de PAA ($1/n_{PAA\ 240.000}$), mientras que con PAA 100.000 son 137 ± 4 moles de α -Amy los que se unen a un mol de PAA ($1/n_{PAA\ 100.000}$). Estos valores indican menor estequiometría para el polielectrolito de menor peso molecular, tal como mostraron las técnicas turbidimétricas (Sección I 2.1. R y D). Las estequiometrías calculadas por mol de monómero, en base a un peso molecular de acrilato de 71, fueron: $0,1408 \pm 6 \cdot 10^{-4}$ (PAA 240.000) y $0,097 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ (PAA 100.000).

Los valores de K mostraron una afinidad superior para el PAA de mayor peso molecular por los sitios de unión en la proteína, adjudicando las diferencias al mayor número de restos cargados al aumentar las subunidades monoméricas del polielectrolito.

Los valores negativos de ΔH° corresponden a interacciones de naturaleza electrostática, mientras que los valores positivos de ΔS° indican desordenamiento del sistema luego de cada agregado de PAA. A pesar que la formación de complejos es un proceso que tiende a favorecer el orden en el sistema, en este caso el efecto de desestructuración del agua parece ser el factor más contribuyente al cambio entrópico final. Esta combinación de efectos entálpico-entrópico permiten evidenciar una interacción PAA/ α -Amy de naturaleza mixta, con una elevada contribución electrostática por diferencia de cargas entre los componentes interactuantes y un aporte hidrofóbico caracterizado por la variación positiva de entropía. En conclusión, podríamos decir que el proceso de formación del complejo está conducido tanto

entálpica como entrópicamente, ya que ambos factores contribuyen a negativizar la variación de energía de Gibbs total: *interacción mixta*.

3.2. ITC PAA/alfa-amilasa. Efecto de la fuerza iónica

Las mismas experiencias de ITC que en el apartado anterior llevadas a cabo en un medio con mayor fuerza iónica permitió profundizar en la naturaleza de la interacción α -Amy/PAA, pudiendo inferir o verificar un aporte mixto entre fuerzas electrostáticas y/o hidrofóbicas.

Las figuras 3.11 A y B muestran las isothermas de ITC y el calor total acumulado (en valor absoluto) luego de cada inyección para el sistema α -Amy/PAA 240.000/NaCl y las figuras 3.12 A y B las correspondientes representaciones para el caso α -Amy/PAA100.000/NaCl.

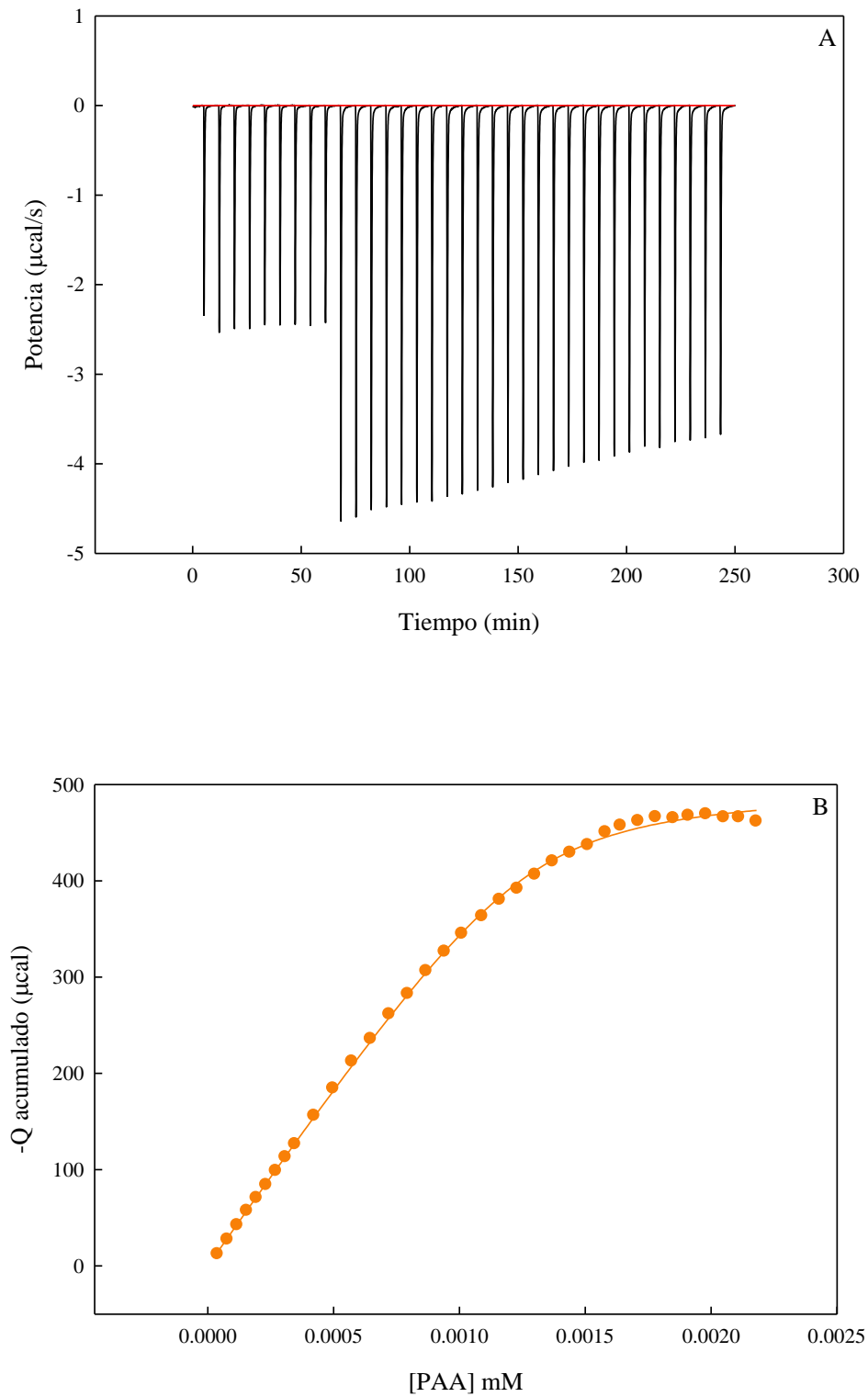


Figura 3.11: ITC α -Amy/PAA 240.000. **A-** Potencia ($\mu\text{cal/s}$) vs. Tiempo (min).
B- $|Q_{\text{acumulado}}|$ (μcal) vs. [PAA](mM). Ajuste matemático (—).
Medio buffer Pi 50 mM, pH 3,00, NaCl 1M. Temperatura 20°C.

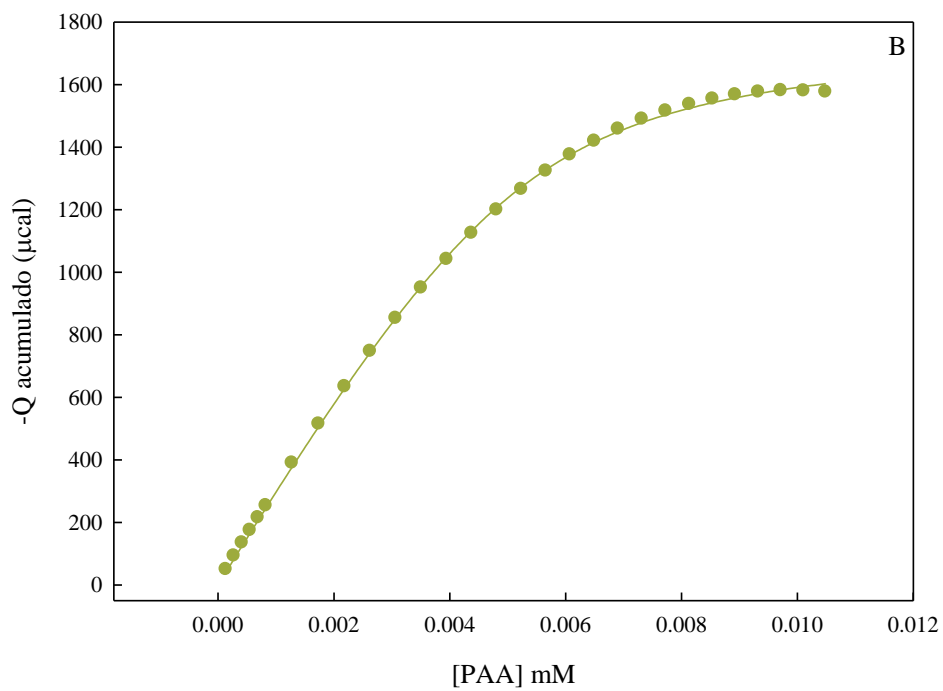
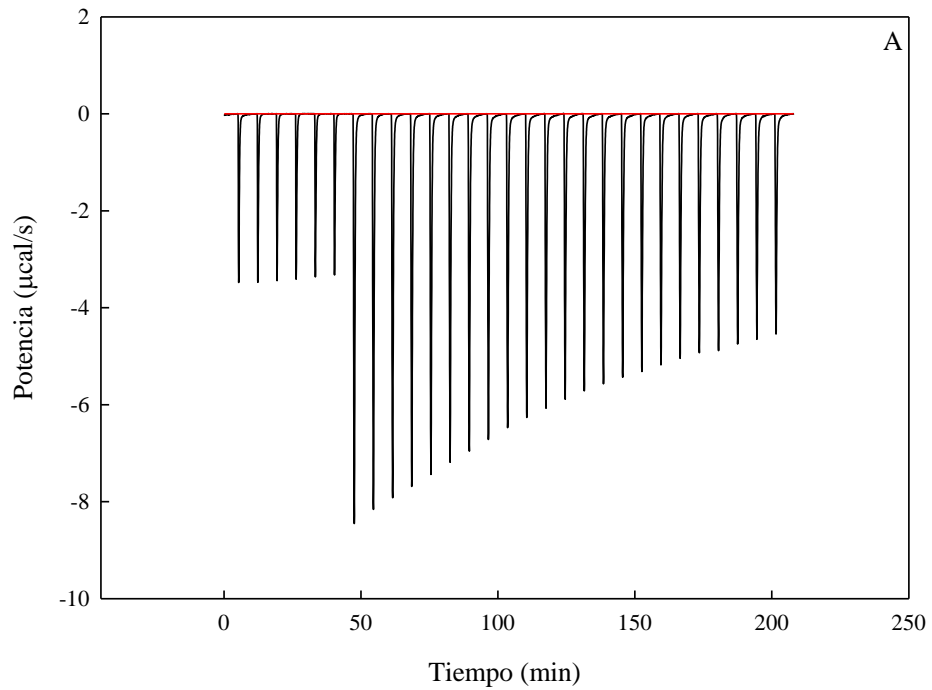


Figura 3.12: ITC α -Amy/PAA 100.000. **A-** Potencia ($\mu\text{cal/s}$) vs. Tiempo (min).
B- $|Q_{\text{acumulado}}|$ (μcal) vs. $[PAA]$ (mM). Ajuste matemático (—).
Medio buffer Pi 50 mM, pH 3,00, NaCl 1M. Temperatura 20°C.

El ajuste no lineal de los datos experimentales confirmó que se mantiene el modelo de sitios independientes y equivalentes entre los sitios de unión al ligando, arrojando los parámetros de *binding* que se detallan en la tabla a continuación:

TABLA 3.2: Funciones termodinámicas y parámetros de fijación de la α -Amy a PAA en un medio de elevada fuerza iónica

PAA	ΔH° (cal/mol)	$K (M^{-1})$	n	ΔG° (cal/mol)	ΔS° (cal/Kmol)
240.000	-867 ± 5	$1,9 \cdot 10^4 \pm 3 \cdot 10^3$	$3,20 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-5}$	-5.770 ± 90	$16,7 \pm 0,3$
100.000	-3.050 ± 10	$1,9 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^2$	$13,2 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	-4.420 ± 60	$4,7 \pm 0,2$

Los valores negativos de calor a presión constante, ΔH° , evidenciaron una interacción exotérmica, aún a elevada fuerza iónica. Además, la presencia de sal no fue suficiente para inhibir por completo la interacción, tal como se había observado a partir de los ensayos turbidimétricos (Sección I 2.3. R y D).

La estequiometría de los complejos también se vio afectada ante el agregado de NaCl: 313 ± 3 moles α -Amy/PAA 240.000 y 76 ± 1 moles α -Amy/PAA 100.000. Es decir, el número de moles de α -Amy por mol de PAA ($1/n$) fue menor en comparación a los valores en ausencia de sal. El mismo comportamiento se obtuvo para las constantes de afinidad (K), disminuyendo en magnitud a elevada fuerza iónica (característica de las interacciones con contribución electrostática) respecto de la ausencia de NaCl (Sección I 3.1. R y D).

Estos resultados son coherentes con el efecto de la sal observado a través de técnicas turbidimétricas, confirmando nuevamente un proceso de naturaleza mixta, dado que, si bien una elevada fuerza iónica del medio reduce la afinidad de la interacción, ésta no es suficiente para inhibir la formación del complejo.

3.3. Cinética de formación de los complejos PAA/alfa-amilasa

En general, la formación de complejos PE/proteína no es instantánea. La cinética de interacción entre los componentes también es un parámetro fundamental y característico de cada sistema (Patrickios y col., 1.999).

El seguimiento cinético de formación de los complejos insolubles permite determinar el tiempo que requiere el sistema para alcanzar la máxima turbidez

inmediatamente luego de realizada la mezcla α -Amy/PAA, es decir el tiempo de incubación necesario para la interacción.

En ambos casos, la formación del complejo insoluble resultó ser rápida (figuras 3.13 y 3.14, para PAA 240.000 y 100.000, respectivamente) dado que el máximo de turbidez se alcanzó a aproximadamente 40 s luego de realizada la mezcla α -Amy/PAA:

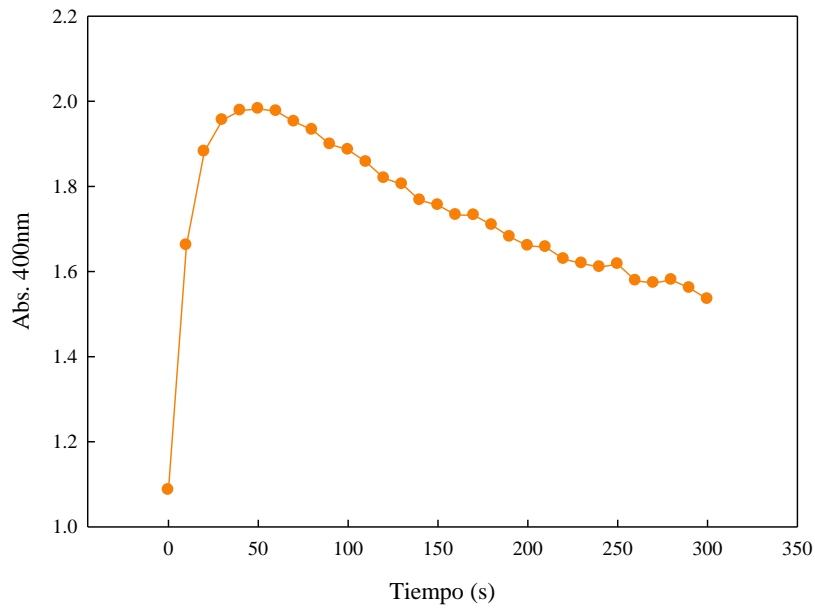


Figura 3.13: Cinética de formación del complejo α -Amy/PAA 240.000: Abs a 400 nm vs. Tiempo (s). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C.

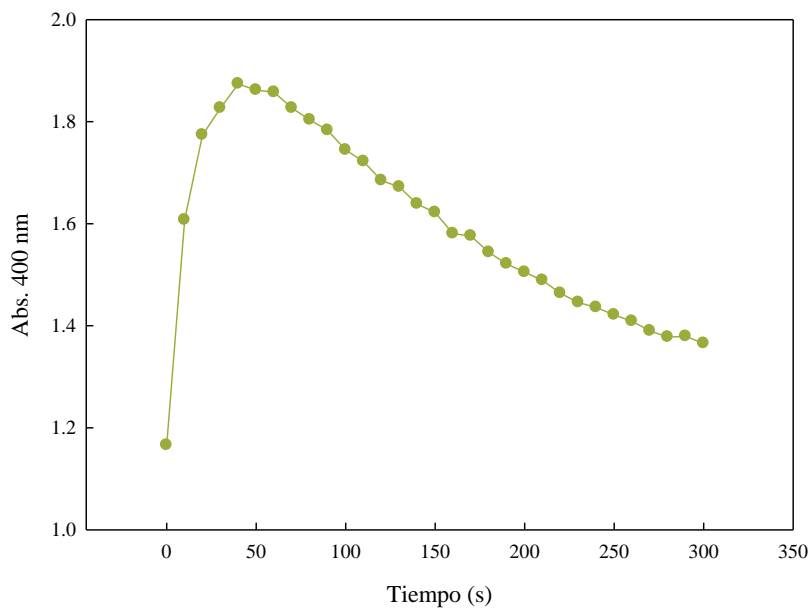


Figura 3.14: Cinética de formación del complejo α -Amy/PAA 100.000: Abs a 400 nm vs. Tiempo (s). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C.

4. Efecto de la interacción con PAA sobre la estructura de la alfa-amilasa

4.1. Espectros de absorción UV-Vis de la alfa-amilasa con y sin PAA

En las figuras 3.15 y 3.16 se muestran los espectros de absorción UV-Vis correspondientes a los sistemas con PAA 240.000 y 100.000, respectivamente y en el cuadro interno los $\lambda_{\text{máx}}$ obtenidos para cada relación molar:

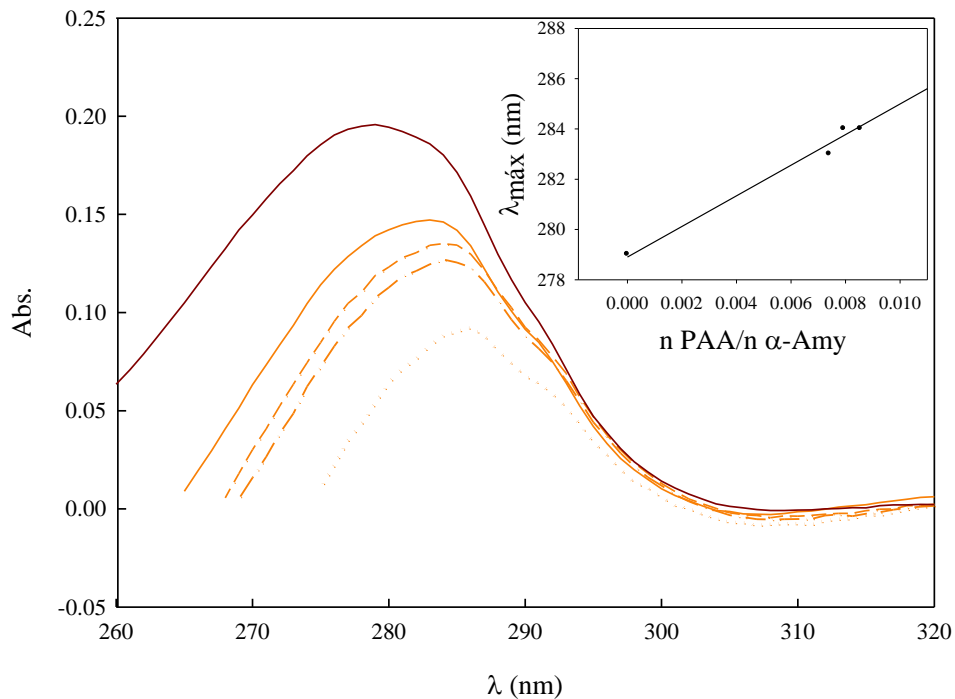


Figura 3.15: Espectros de absorción UV-Vis de la α -Amy en ausencia (—) y presencia de PAA 240.000. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:135 (—); 1:126(---); 1:117 (— · —) y 1:88 (····). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C. Cuadro interno: $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) vs. relación molar PAA/ α -Amy.

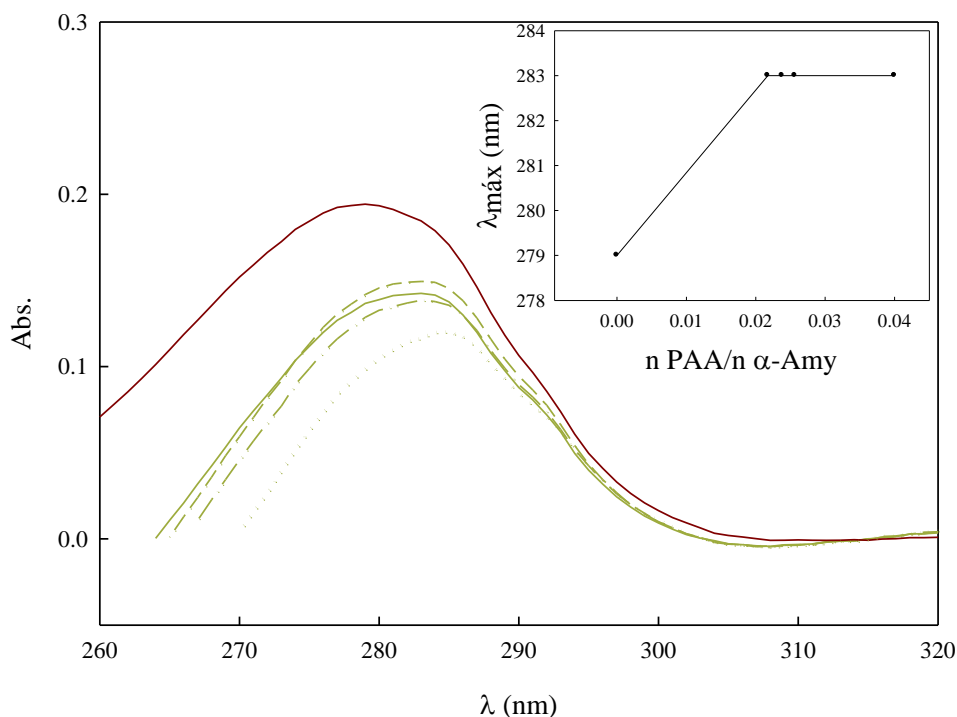


Figura 3.16: Espectros de absorción UV-Vis de la α -Amy en ausencia (—) y presencia de PAA 100.000. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:46 (—); 1:42 (-----); 1:39 (— · —) y 1:25 (····). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C. Cuadro interno: $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) vs. relación molar PAA/ α -Amy.

En ambos casos, la presencia de PAA afectó el máximo de absorción disminuyendo la intensidad de la banda (efecto hipocrómico), junto con un leve corrimiento en la posición del máximo hacia el rojo del espectro (efecto batocrómico) a medida que aumenta la cantidad de PAA presente en la muestra. Esto sugiere que los polielectrolitos inducen un cambio en la polaridad del entorno de los residuos aromáticos de la proteína, posiblemente debido a un reordenamiento estructural.

4.2. Espectros de emisión de F de la alfa-amilasa con y sin PAA

En este trabajo se analizaron dos aspectos de los espectros de emisión de F de la α -Amy en presencia de PAA: i- la intensidad de la fluorescencia emitida, la cual puede variar significativamente por fenómenos de *quenching* ii- el corrimiento en la longitud de onda del máximo de emisión ($\lambda_{m\acute{a}x}$), la cual depende de la polaridad en el microentorno de los triptófanos (Lakowicz, 1.983).

La figura 3.17 muestra los espectros de emisión de F de la α -Amy en presencia de PAA 240.000, y en el cuadro interno los $\lambda_{m\acute{a}x}$ alcanzados para cada relación molar:

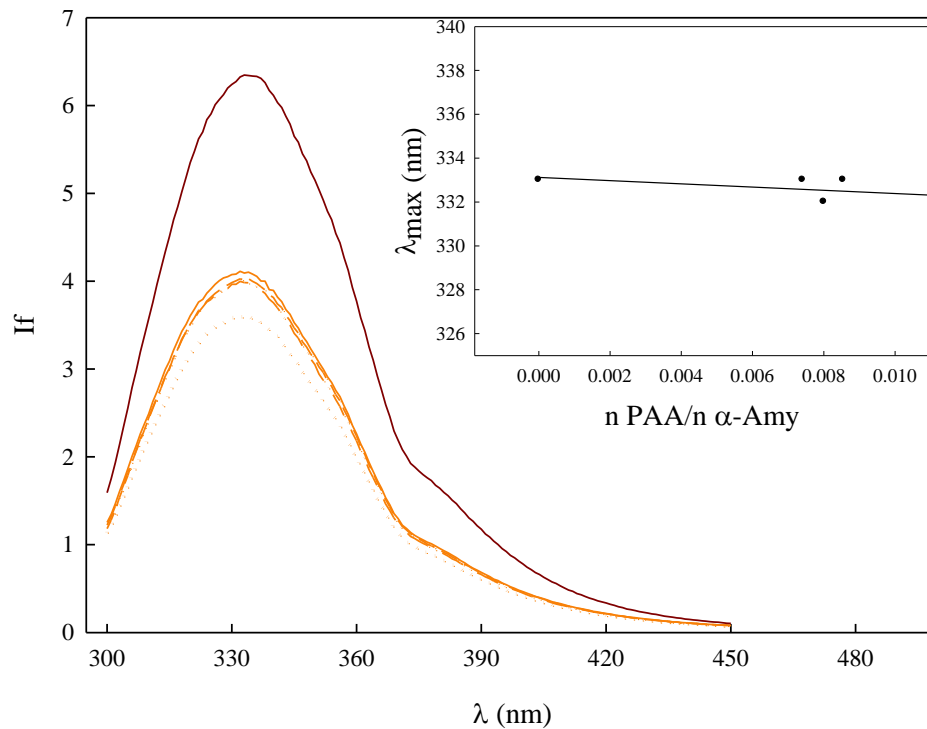


Figura 3.17: Espectros de emisión de F de la α -Amy en ausencia (—) y presencia de PAA 240.000. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:135 (—); 1:126 (---); 1:117 (— · —) y 1:88 (····). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C. Cuadro interno: $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) vs. relación molar PAA/ α -Amy.

La formación del complejo disminuyó la intensidad de F de la α -Amy. Más aún, en presencia de un exceso de PAA (1:88) este efecto es más pronunciado.

Sin embargo, no se observó un corrimiento significativo en la posición del $\lambda_{\text{máx}}$, lo cual demuestra que la estructura tridimensional de la α -Amy en el microentorno de los triptófanos no se encuentra significativamente afectada (Lackowickz, 1.983; Andersson y Hatti-Kaul, 2.000).

Los espectros de emisión de F de la α -Amy con PAA 100.000 se muestran en la figura 3.18 y en el cuadro interno los $\lambda_{\text{máx}}$ alcanzados para cada relación molar:

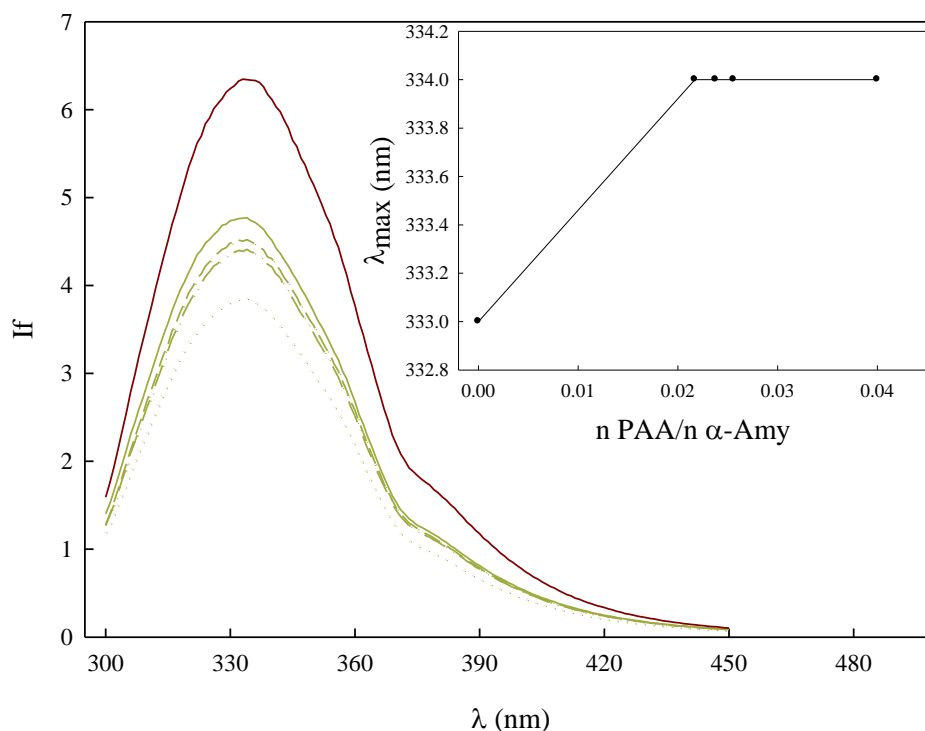


Figura 3.18: Espectros de emisión de F de la α -Amy en ausencia (—) y presencia de PAA 100.000. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:46 (—); 1:42 (---); 1:39 (— · —) y 1:25 (····). Medio buffer fosfato 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C. Cuadro interno: $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) vs. relación molar PAA/ α -Amy.

En este caso, cantidades crecientes de PAA también disminuyeron la intensidad de F de la α -Amy, acompañado de un pequeño corrimiento hacia el rojo en $\lambda_{\text{máx}}$. Esto se relaciona con una disminución en la hidrofobicidad del entorno de los triptófanos de la enzima, lo que sugiere que se estaría produciendo una sobreexposición de estos residuos al solvente. Esto se puede atribuir a leves cambios en la estructura tridimensional de la enzima al interactuar con el PAA, al menos en el microentorno de los triptófanos. Resulta interesante destacar que otros autores atribuyeron a estados desnaturalizados corrimientos hacia el rojo en el $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión de F de la enzima alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* (Duy y Fitter, 2.006). Este comportamiento diferente del PAA 100.000 frente al PAA 240.000 puede atribuirse al mayor PM de este último, el cual no modifica el microentorno de los Trp posiblemente por cuestiones estéricas.

Por otro lado, todos los espectros de emisión de F presentados en estas figuras exhibieron $\lambda_{\text{máx}}$ entre 332 y 334 nm, lo cual corresponde a longitudes de onda de residuos de triptófanos que se ubican en una región interna dentro de la estructura

tridimensional de la proteína. Los triptófanos superficiales se encuentran en un entorno más polar y por lo tanto sus $\lambda_{\text{máx}}$ están más corridos hacia el rojo del espectro (Lakowicz, 1.983; Duy y Fitter, 2.006).

Ambos PAA disminuyeron la intensidad de F de los Trp de la enzima a través de un efecto de *quenching* que se ajustó a una gráfica lineal de Stern-Volmer (figura 3.19 y 3.20):

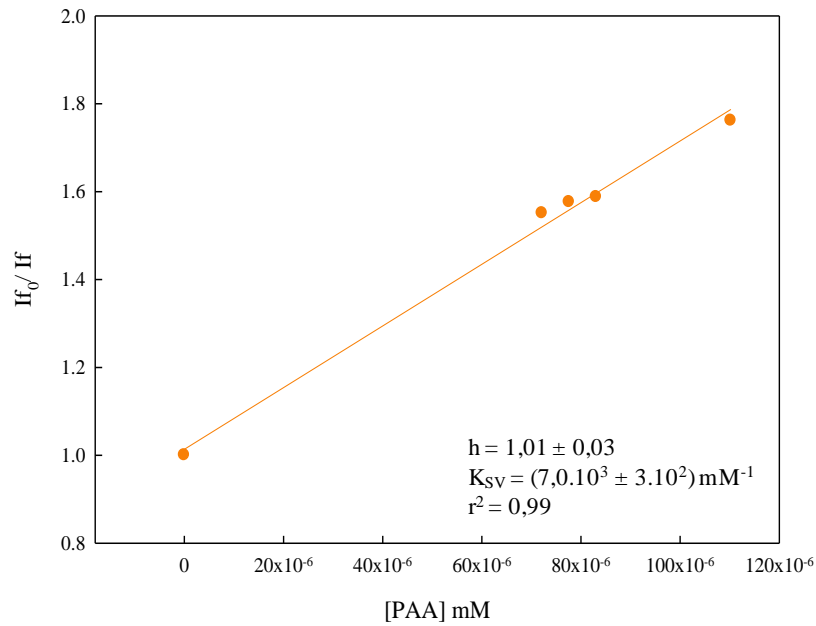


Figura 3.19: Gráficos de Stern-Volmer: I_{f_0}/I_f vs. $[PAA]$ (mM), para α -Amy con PAA 240.000 (●) y ajuste lineal (—). Parámetros de la regresión lineal: h (ordenada al origen), K_{SV} (Constante de Stern Volmer, pendiente) y r^2 (coeficiente de correlación lineal).

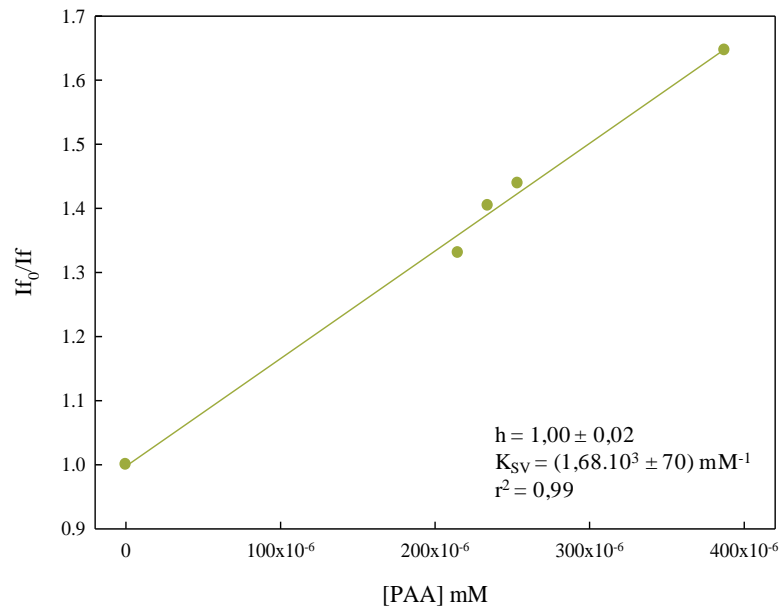


Figura 3.20: Gráficos de Stern-Volmer: I_{f_0}/I_f vs. $[PAA]$ (mM), para α -Amy con PAA 100.000 (●) y ajuste lineal (—). Parámetros de la regresión lineal: h (ordenada al origen), K_{SV} (Constante de Stern Volmer, pendiente) y r^2 (coeficiente de correlación lineal).

Dado que se requerirían ensayos complementarios para poder discernir el modelo de *quenching* (dinámico o estático) que se cumple en estos sistemas, se denominó en forma genérica K_{SV} a la constante de Stern-Volmer.

Si bien no es posible concluir sobre la naturaleza del *quenching*, esta relación lineal en las gráficas de Stern-Volmer indica que existe una única población de Trp todos igualmente accesibles al *quencher*. Esta población de Trp correspondería a residuos que se encuentran dentro de la estructura tridimensional proteica y no son superficiales, dado las $\lambda_{m\acute{a}x}$ de emisión observadas y además existen datos de bibliografía que informan que la alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* exhibe residuos de Trp internos en la proteína y no expuestos en la superficie, a diferencia de otras amilasas de distinto origen (Duy y Fitter, 2.006).

4.3. Espectros de DC de la alfa-amilasa con y sin PAA

Las figuras 3.21 y 3.22 muestran los espectros de DC obtenidos para la α -Amy sola y en presencia de diferentes cantidades de PAA 240.000 y 100.000, respectivamente:

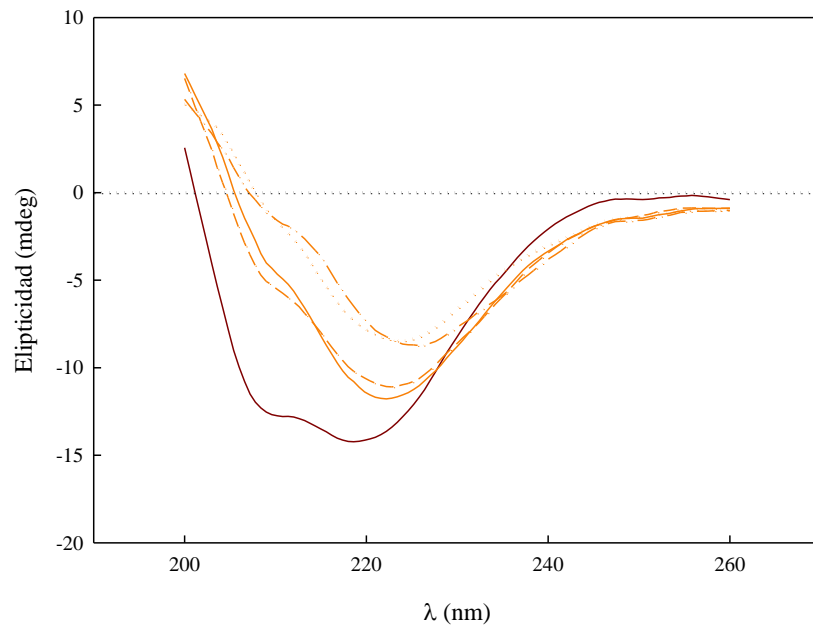


Figura 3.21: Espectros de DC de la α -Amy en ausencia (—) y presencia de PAA 240.000. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:135 (—); 1:126 (---); 1:117 (— · —) y 1:88 (····). Medio buffer fosfato 50mM, pH 3,00. Temperatura 20°C.

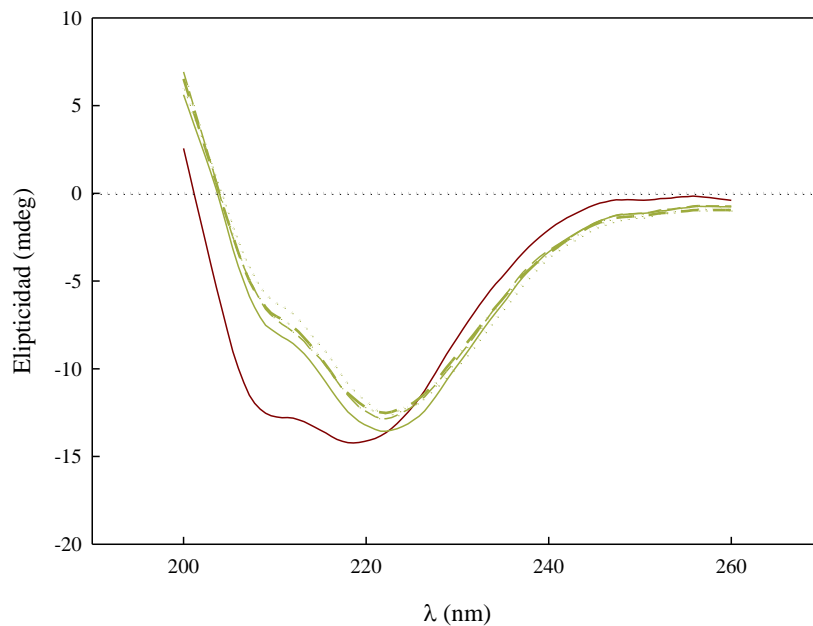


Figura 3.22: Espectros de DC de la α -Amy en ausencia (—) y presencia de PAA 100.000. Relaciones molares PAA: α -Amy: 1:46 (—); 1:42 (---); 1:39 (— · —) y 1:25 (····). Medio buffer fosfato 50mM, pH 3,00. Temperatura 20°C.

En todos los espectros se registraron dos picos negativos alrededor de 222 y 208 nm, característicos de estructuras alfa-hélice. Sin embargo, sus intensidades sugieren la existencia de segmentos que alternan a lo largo de la cadena polipeptídica entre

estructuras alfa-hélice y láminas-beta combinadas (predominio espectral alfa-hélice) (Fasman, 1.996). Por otro lado, las intensidades de los picos disminuyeron al incrementar la concentración de PAA, es decir, éste estaría reduciendo el contenido de estructuras secundarias en la α -Amy.

5. Estabilidad de la alfa-amilasa

5.1. Estabilidad catalítica

En muchos casos, la interacción entre enzimas y polímeros cargados incrementa la estabilidad catalítica de las mismas, sugiriendo que estos polielectrolitos pueden ser una herramienta útil para la estabilización de enzimas (Foreman y col., 2.001).

La actividad enzimática medida a través del tiempo es un parámetro que permite determinar si una enzima es estable o no en el medio en el que se encuentra.

5.1.1. Estabilidad catalítica a pH 6,00 con y sin PAA

El gráfico a continuación muestra la actividad de la α -Amy durante distintos de períodos de incubación a pH 6,00, en ausencia y presencia de PAA (figura 3.23).

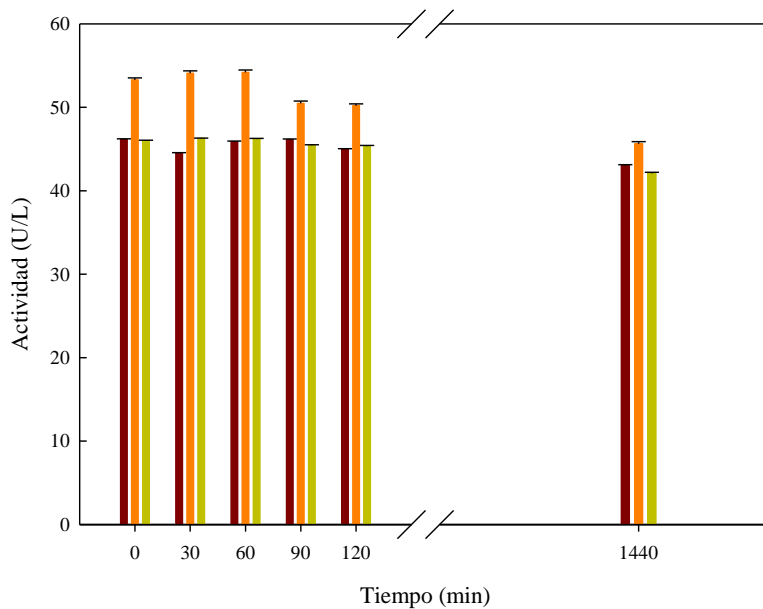


Figura 3.23: Estabilidad de la α -Amy a pH 6,00: Actividad vs. Tiempo (min). α -Amy sola (—), α -Amy/PAA 240.000 (—) y α -Amy/PAA 100.000 (—). Medio buffer Pi 50 mM, pH 6,00. Temperatura 20°C.

La actividad de la enzima en ausencia de PAA permaneció relativamente constante y disminuyó sólo un 6,80 % luego de las 24 hs de incubación, respecto a la actividad inicial. Esto es de esperar dado que se trabajó a un valor de pH perteneciente al rango de estabilidad de la enzima (Carlsen y col., 1.996). En presencia de PAA la α -Amy también fue estable, registrándose a las 24 hs una pérdida de actividad del 14,36 % (PAA 240.000) y 8,50 % (PAA 100.000), respecto de la actividad inicial con el PAA correspondiente en cada caso.

En cuanto a los valores iniciales (tiempo 0 min), se observó que PAA 100.000 no modificó la actividad de la α -Amy mientras que PAA 240.000 la incrementó. Esto puede deberse a cambios estructurales en las proximidades del sitio activo que modifican la afinidad de la enzima por el sustrato.

5.1.2. Estabilidad catalítica a pH 3,00 con y sin PAA. Cinética de inactivación

En trabajos previos, Carlsen y col. demostraron que la enzima alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* es extremadamente estable a pH neutro (5,00 - 8,00) pero pierde actividad en valores por debajo de este rango, siendo parcialmente inactivada de manera irreversible por un proceso que sigue una cinética de primer orden (Carlsen y col., 1.996).

En este trabajo, se corroboró dicha cinética de inactivación a pH 3,00 (pH de precipitación) y se evaluó el efecto de los polielectrolitos en la estabilidad enzimática. La figura 3.24 A muestra la actividad (U/L) de la α -Amy a pH 6,00 luego de distintos períodos de incubación a pH 3,00, en ausencia y presencia de PAA. A partir de los gráficos semilogarítmicos (figura 3.24 B) se observó que la inactivación ácida de la α -Amy siguió una cinética de primer orden, incluso en presencia de los polielectrolitos:

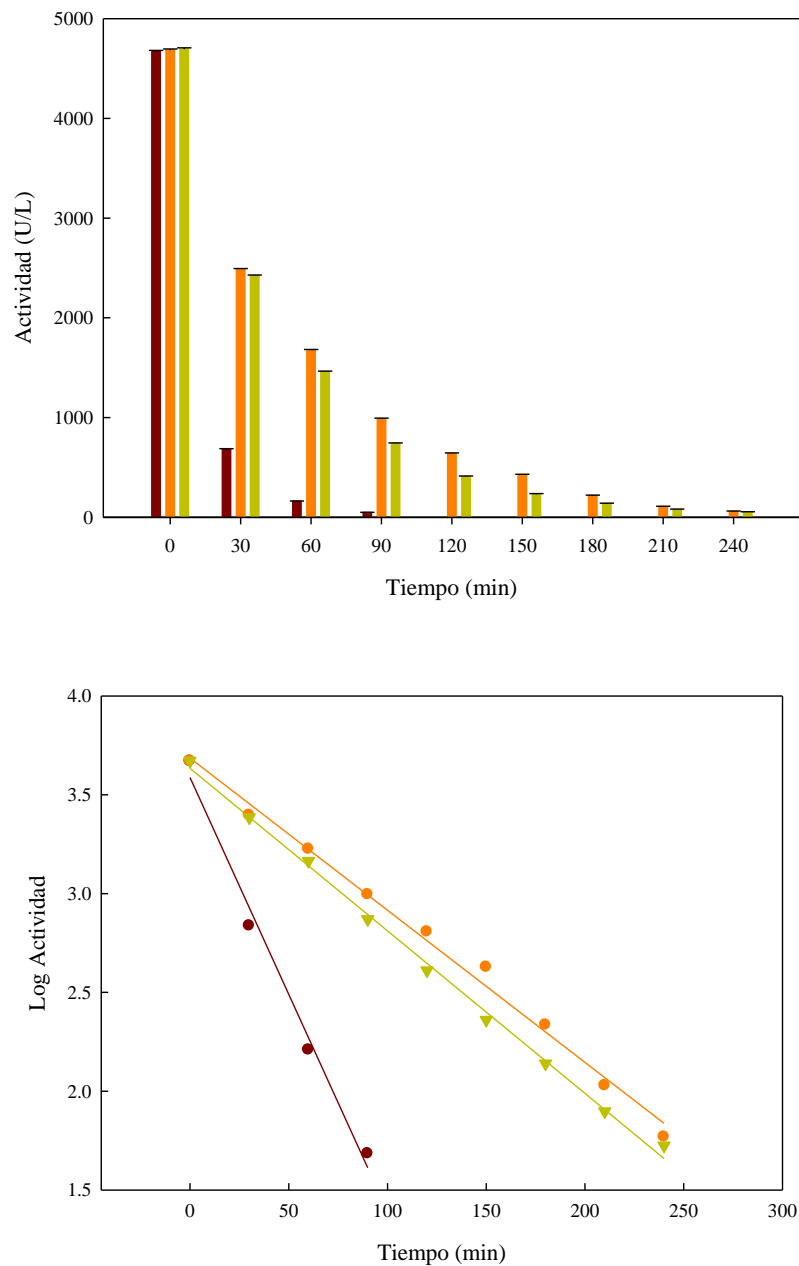


Figure 3.24: **A-** Estabilidad de α -Amy a pH 3,00: Actividad (U/L) vs Tiempo (min), α -Amy sola (—), α -Amy/PAA 240.000 (—) y α -Amy/PAA 100.000 (—). **B-** Cinética de inactivación de primer orden: log Act. vs. Tiempo (min) de la α -Amy en ausencia (●) y presencia de PAA 240.000 (●) y 100.000 (▼).

Las constantes de velocidad (k) obtenidas de las pendientes de la figura 3.24 B (tabla 3.3) fueron menores en presencia de los polielectrolitos, lo que sugiere cierto grado de estabilización de la enzima al interactuar con los mismos. Además dicho efecto resultó ser más significativo para el PAA de mayor peso molecular.

TABLA 3.3: Constantes cinéticas de inactivación de orden uno (k) a pH 3,00

	k (min^{-1})
α -Amy	$2,2 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$
α -Amy/PAA 100.000	$8,2 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$
α -Amy/PAA 240.000	$7,7 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$

El mecanismo de inactivación ácida de esta enzima se describe en términos de desnaturalización de su estructura tridimensional. Por ende, las moléculas de enzima desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas pierden su actividad biológica (Carlsen y col., 1.996). Por lo tanto, el efecto del PAA sobre la α -Amy puede interpretarse como una estabilización de la estructura tridimensional de la enzima, lo cual retrasa el proceso de desnaturalización, es decir, la protege frente a la inactivación ácida.

5.2. Estabilidad estructural de la alfa-amilasa

5.2.1. Espectros de DC de la α -Amy en el tiempo a pH 6,00 y 3,00 con y sin PAA

Se analizó la estabilidad de la enzima desde el punto de vista de su estructura secundaria, tanto a pH 6,00 como 3,00 y cómo afecta a la misma la presencia de los polielectrolitos.

La figura 3.25 muestra los espectros de DC obtenidos para la enzima sola a pH 3,00 (A) y 6,00 (B).

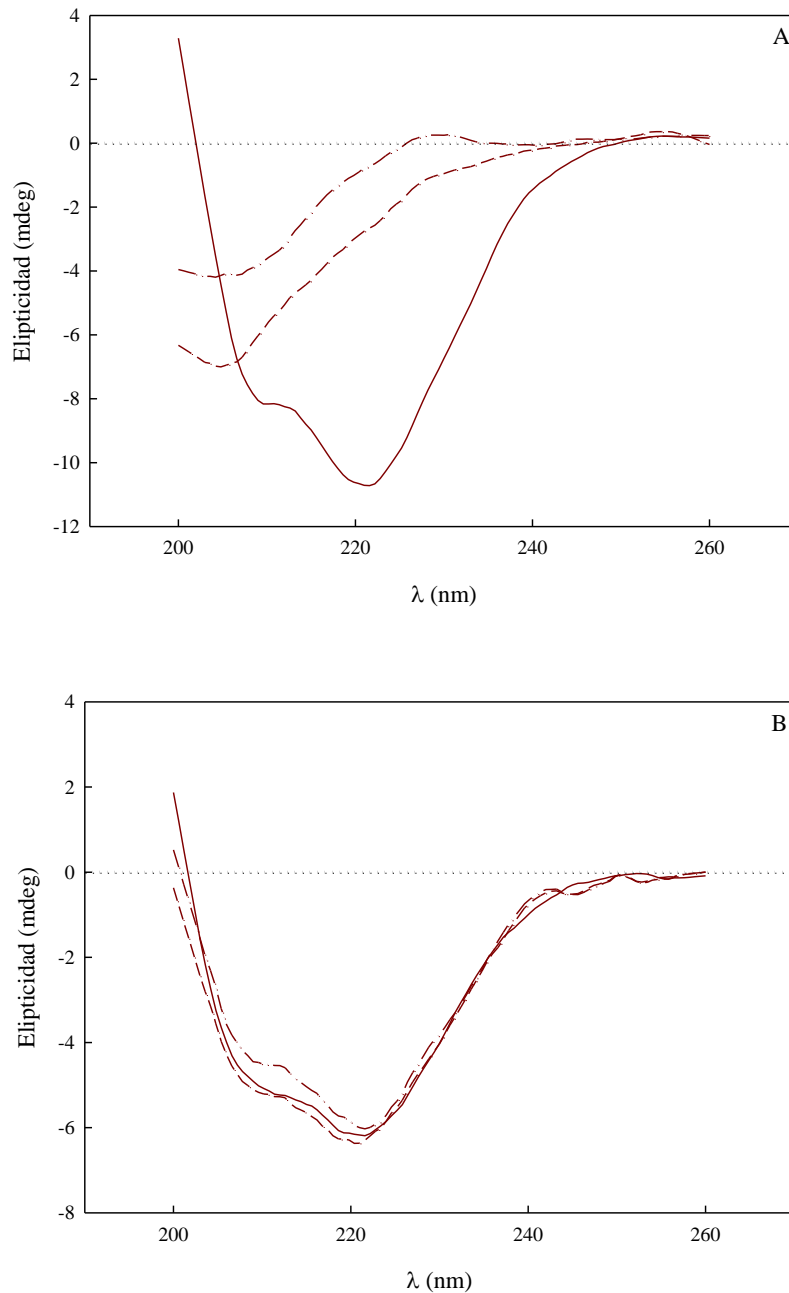


Figura 3.25: Estabilidad de la estructura secundaria de la α -Amy: espectros de DC a 0 hs (—), 2:30 hs (---) y 5 hs (- · -) de incubación a pH 3,00 (A) y 6,00 (B). Medio buffer Pi 50 mM. Temperatura 20°C.

A partir de estos espectros se pudieron apreciar diferencias importantes en la estabilidad de la enzima a ambos pHs: a pH 3,00 el espectro inicial (0 hs) mostró los dos picos negativos característicos de la α -Amy a alrededor de 208 y 222 nm, tal como se observó anteriormente (Sección I 4.3. R y D). Sin embargo, a partir de las 2:30 hs de incubación se registró una banda negativa principal alrededor de los 200 nm,

característico de ovillos estadísticos. Es decir, la enzima se desnaturaliza a medida que es incubada en medio ácido. A pH 6,00, en cambio, la superposición de los espectros durante toda la incubación denota nuevamente la alta estabilidad de la α -Amy a pH neutro, incluso en niveles de estructuración secundario.

Los espectros de DC de la α -Amy en presencia de PAA 240.000 y 100.000 se muestran en las figuras 3.26 A y B, respectivamente:

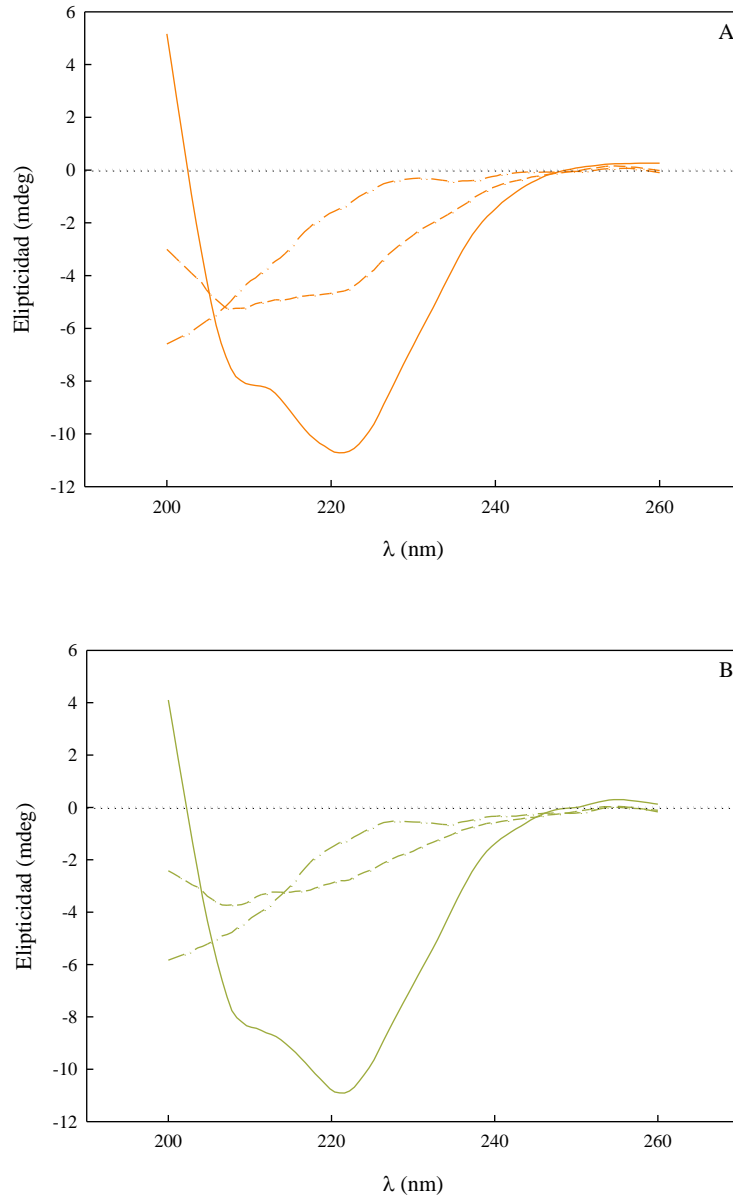


Figura 3.26: Estabilidad de la estructura secundaria de la α -Amy: espectros de DC con PAA 240.000 (A), relación molar 1:154, tiempo de incubación 0 hs (—), 2:30 hs (----) y 5 hs (- · -); y con PAA 100.000 (B), relación molar 1:52, tiempo de incubación 0 hs (—), 2:30 hs (----) y 5 hs (- · -). Medio buffer Pi 50 mM, pH 3,00. Temperatura 20°C.

Resultados similares a los encontrados para la α -Amy sola a pH 3,00 (figura 3.25 A) se observaron para la enzima en presencia de ambos PAA, perdiéndose elementos de estructura secundaria durante la incubación ácida. Sin embargo, los espectros registrados a las 2:30 hs aún conservaron, aunque con menor intensidad, los dos picos característicos de la α -Amy a 208 y 222 nm. Esto demuestra que la pérdida en estructuras secundarias de la enzima se ve retrasada en presencia de PAA, lo que nos permite nuevamente sugerir un efecto estabilizante de estos polielectrolitos sobre la α -Amy a pH ácido, también más evidente para el PAA de mayor peso molecular.

5.3. Estabilidad térmica de la alfa-amilasa

5.3.1. DSC de la α -Amy a pH 3,00 y 6,00, con y sin PAA

En la figura 3.27 se muestran los termogramas de Capacidad calorífica (C_p) en función de T, obtenidos para la enzima a pH 3,00 y 6,00:

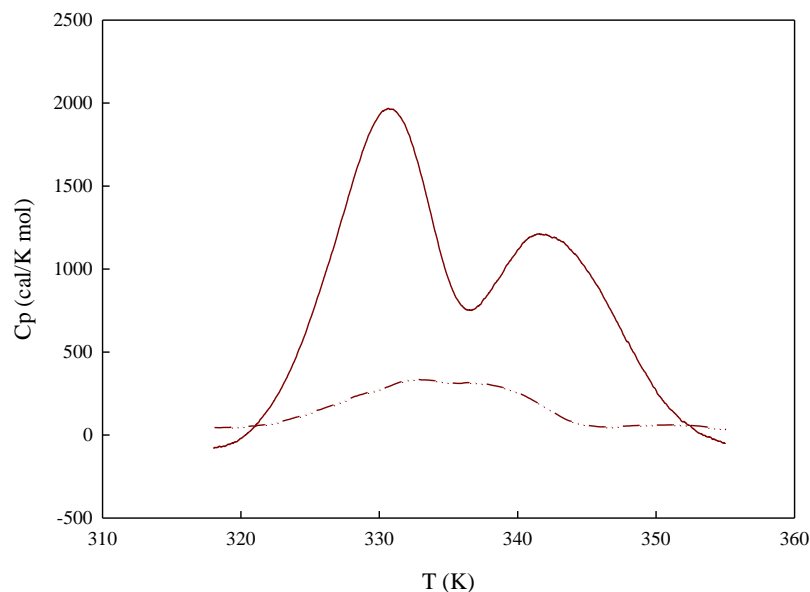


Figura 3.27: DSC de la α -Amy a pH 3,00 (---) y 6,00 (—). Medio buffer Pi 50 mM. Velocidad de barrido 0,5 K/min.

A pH 6,00 se identificaron dos transiciones correspondientes a dominios estructurales independientes de la α -Amy, ambos con T_m característicos, lo cual permite suponer la existencia de intermediarios estables en el proceso de desnaturalización térmica de la α -Amy.

Por el contrario, a pH 3,00 no se observaron dichas transiciones. Bajo estas condiciones, la enzima parte desde un estado estructural diferente previo al calentamiento, posiblemente ya desnaturalizada o parcialmente desnaturalizada, lo que da lugar a un termograma con características totalmente diferentes.

Dada la inestabilidad térmica encontrada para la α -Amy a pH 3,00, el efecto de los polielectrolitos en el termograma fue monitoreado a pH 6,00. Es decir, se evaluó el efecto de la presencia de PAA en la estabilidad térmica de la α -Amy. Los termogramas correspondientes se muestran en la figura 3.28:

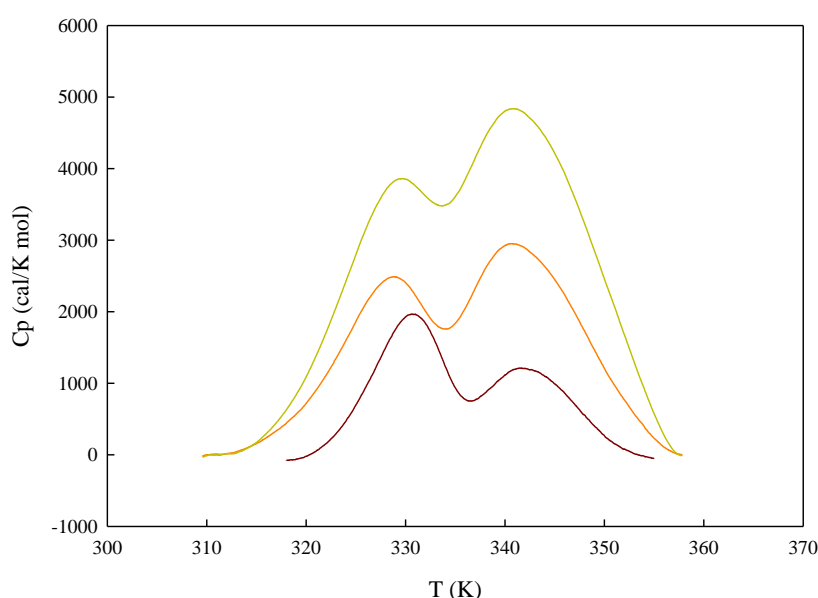


Figura 3.28: DSC de la α -Amy en ausencia (—) y en presencia de PAA 240.000 (—) y 100.000 (—). Medio buffer Pi, 50 mM, pH 6,00. Velocidad de barrido 0,5 K/min.

En la tabla a continuación se detallan los valores de T_m y ΔH°_{cal} para cada caso:

TABLA 3.4: Parámetros de la transición nativo-desnaturalizado de la α -Amy en presencia y ausencia de PAA, en medio buffer Pi 50 mM, pH 6,00 ^(*)

	T_m (K)		ΔH°_{cal} (cal/mol)	
	1 ^{ra} transición	2 ^{da} transición	1 ^{ra} transición	2 ^{da} transición
α -Amy	330,37 \pm 0,01	342,73 \pm 0,02	1,770.10 ⁴ \pm 50	1,250.10 ⁴ \pm 50
α -Amy/PAA 240.000	327,72 \pm 0,02	342,23 \pm 0,02	2,75.10 ⁴ \pm 100	4,25.10 ⁴ \pm 100
α -Amy/PAA 100.000	328,30 \pm 0,03	342,49 \pm 0,02	4,41.10 ⁴ \pm 300	7,71.10 ⁴ \pm 300

^(*)La determinación de los parámetros T_m y ΔH°_{cal} a pH 3,00 no resultaría adecuada dadas las características del termograma, motivo por el cual no se exponen en estos resultados.

En presencia de ambos PAA se mantuvo el mismo patrón de desnaturalización térmica con dos transiciones, tal como se observó para la enzima en ausencia de PAA. Las T_m correspondientes a la primera transición disminuyeron en aproximadamente 2K ante la presencia de los polielectrolitos, mientras que para la segunda transición no se vieron afectadas. Sin embargo, los mayores ΔH°_{cal} obtenidos en presencia de PAA reflejan interacción de estos polielectrolitos sobre ambos dominios de desnaturalización (más pronunciado para el PAA 100.000 respecto del 240.000). Posiblemente, la presencia de PAA aumenta la estabilidad de la enzima al interactuar con sus diferentes dominios, probablemente con una flexibilidad conformacional reducida (Hashim y col., 2.005).

5.3.2. Reversibilidad en el proceso de desnaturalización térmica de la α -Amy.

Efecto del segundo ciclo de calentamiento en los termogramas de DSC

En las figuras 3.29 A, B y C se muestran los termogramas obtenidos para la α -Amy sola y en presencia de PAA 240.000 y 100.000, respectivamente, en los barridos consecutivos de temperatura:

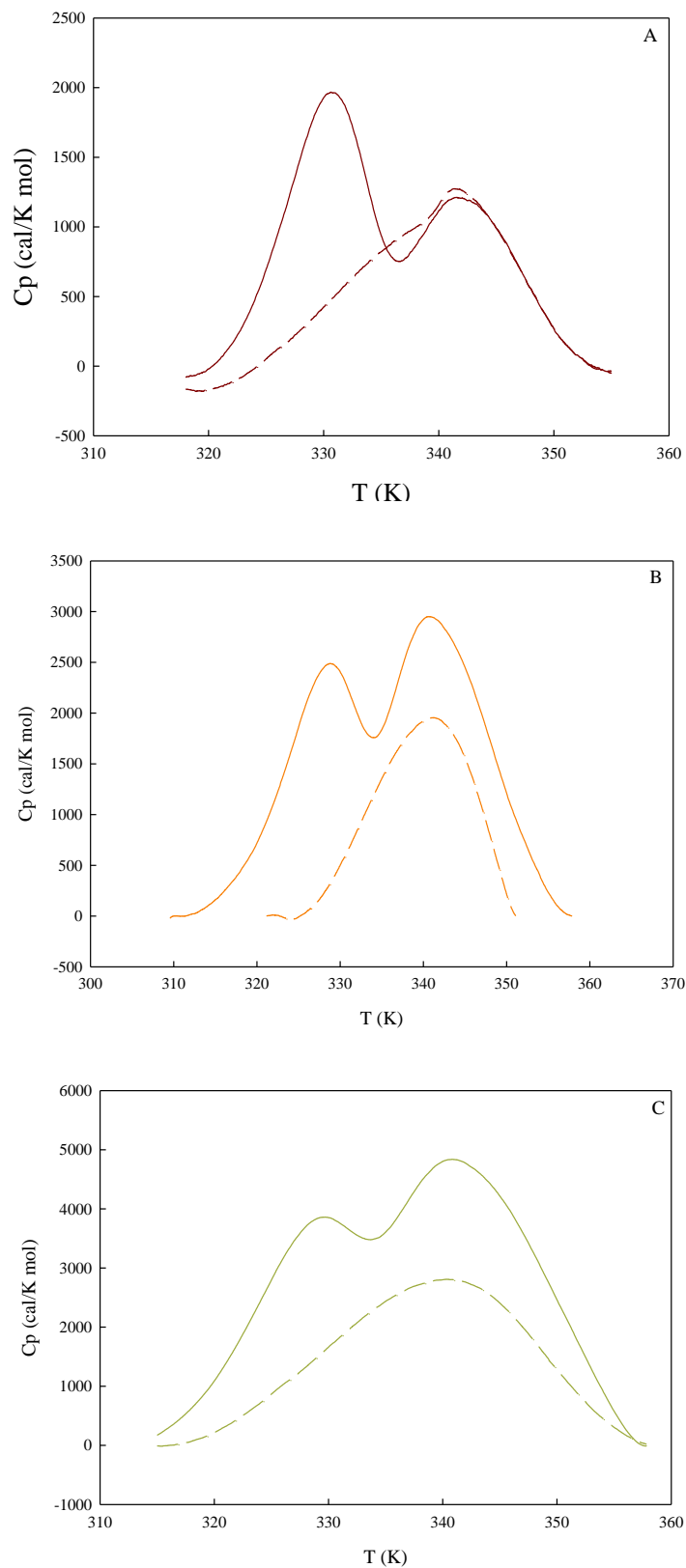


Figure 3.29: DSC: barridos consecutivos de temperatura. **A-** α -Amy sola: primer (—) y segundo (---) calentamiento. **B-** α -Amy/PAA 240.000: primer (—) y segundo (---) calentamiento. **C-** α -Amy/PAA 100.000: primer (—) y segundo (---) calentamiento. Medio buffer Pi 50 mM, pH 6,00. Velocidad de barrido 0,5 K/min.

En la tabla a continuación se muestran los parámetros T_m y ΔH°_{cal} obtenidos en cada caso, junto con el porcentaje de entalpía calorimétrica recuperado en el segundo calentamiento:

TABLA 3.5: Parámetros de la transición nativo-desnaturalizado de la α -Amy en presencia y ausencia de PAA, para el primer y segundo barrido consecutivo de T: T_{m1} y T_{m2} , temperaturas de melting para la primera y segunda transición; ΔH°_{cal1} y ΔH°_{cal2} , entalpías calorimétricas para la primera y segunda transición

α-Amy			
	1° BARRIDO	2° BARRIDO	ΔH°_{cal} Recuperado (%)
T_{m1} (K)	$330,37 \pm 0,01$	$334,3 \pm 0,1$	
ΔH°_{cal1} (cal/mol)	$1,770 \cdot 10^4 \pm 50$	$6,6 \cdot 10^3 \pm 200$	37,46 %
T_{m2} (K)	$342,73 \pm 0,02$	$342,69 \pm 0,05$	
ΔH°_{cal2} (cal/mol)	$1,250 \cdot 10^4 \pm 50$	$1,23 \cdot 10^4 \pm 200$	82,00 %
α-Amy/PAA 240.000			
T_{m1} (K)	$327,72 \pm 0,02$		
ΔH°_{cal1} (cal/mol)	$2,75 \cdot 10^4 \pm 100$		----
T_{m2}	$342,23 \pm 0,02$	$340,34 \pm 0,02$	
ΔH°_{cal2} (cal/mol)	$4,25 \cdot 10^4 \pm 100$	$3,05 \cdot 10^4 \pm 100$	71,76 %
α-Amy/PAA 100.000			
T_{m1} (K)	$328,3 \pm 0,03$		
ΔH°_{cal1} (cal/mol)	$4,41 \cdot 10^4 \pm 300$		----
T_{m2} (K)	$342,49 \pm 0,02$	$339,35 \pm 0,02$	
ΔH°_{cal2} (cal/mol)	$7,71 \cdot 10^4 \pm 300$	$6,38 \cdot 10^4 \pm 100$	82,75 %

En ninguno de los casos el segundo calentamiento mostró superponerse con el primero de los termogramas (primer barrido). La transición más afectada fue la primera, donde casi no se observaron efectos térmicos durante el segundo ciclo de calentamiento, mientras que la segunda transición parece ser parcialmente reversible recuperándose un porcentaje mayor de la entalpía calorimétrica. Todo esto sugiere que la desnaturalización térmica de la α -Amy involucra procesos irreversibles.

5.3.3. Dependencia de los termogramas de DSC con la velocidad de barrido

La variación de T_m con la velocidad de barrido (V) indica la existencia de procesos controlados cinéticamente, lo cual sugiere la presencia de procesos irreversibles durante la desnaturalización térmica.

En la figura 3.30 se observa que las T_{m1} aumentaron cuanto mayor es la velocidad de barrido, tanto en presencia como en ausencia de PAA:

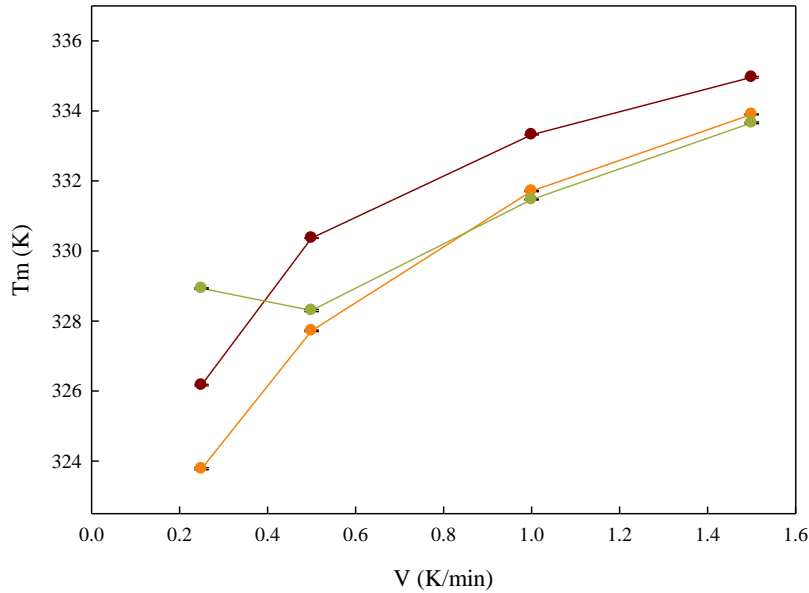


Figura 3.30: Dependencia de T_{m1} con la velocidad de barrido: α -Amy sola (●), α -Amy/PAA 240.000 (●) y α -Amy/PAA 100.000 (●). Medio buffer Pi 50 mM, pH 6,00.

El corrimiento de T_{m1} con V fue significativo, contrario a T_{m2} (datos no mostrados), lo cual era de esperar dado el mayor carácter irreversible de la primera transición respecto de la segunda, según lo observado en los barridos consecutivos (figuras 3.29 A, B y C). Todo esto sugiere que la desnaturalización térmica de la α -Amy, tanto en presencia como en ausencia de PAA, es *parcialmente reversible*.

En la tabla 3.6 se muestran las energías de activación promedio (E_A) para la primera transición, calculadas de acuerdo al modelo de dos estados irreversibles según los cuatro métodos de validación (Sección 4.1.6. Introducción) y las T^* promedio:

TABLA 3.6: Parámetros cinéticos de la primera transición en el proceso de desnaturalización térmica de la α -Amy, en presencia y ausencia de PAA

	E_A (cal/mol)	T^* (K)
α -Amy	$53.10^3 \pm 1.10^3$	$339,6 \pm 0,6$
α -Amy/PAA 240.000	$57.10^3 \pm 3.10^3$	338 ± 1
α -Amy/PAA 100.000	$51.10^3 \pm 3.10^3$	338 ± 1

La E_A , es decir, la barrera energética que deben superar los reactivos para pasar del estado nativo al desnaturalizado, no se vio afectada ante la presencia de PAA, respecto de su ausencia, como tampoco se modificó T^* . Es decir, la presencia de los polielectrolitos no influyó en la cinética del proceso de desnaturalización térmica de la enzima.

Cabe destacar que estos parámetros cinéticos fueron calculados para la mayor velocidad de barrido experimentada (1,5 K/min), dada la dispersión en los valores obtenida con velocidades menores (datos no mostrados). Esto podría deberse al carácter parcialmente irreversible asociado a la desnaturalización térmica de la α -Amy, lo que hace que a mayores velocidades de barrido los procesos reversibles se vean disminuidos y permitan un adecuado ajuste al modelo cinético de no equilibrio que involucra dos estados asociados a un proceso irreversible.

5.3.4. Influencia de la concentración de α -Amy en los termogramas de DSC

En algunos casos, la desnaturalización térmica de una proteína puede ir acompañada de disociación o asociación de subunidades, lo cual se evidencia a través de cambios en la posición de T_m a medida que varía la concentración proteica (Michnik y col., 2.005).

En la figura 3.31 se muestra la dependencia de T_m con la concentración de enzima:

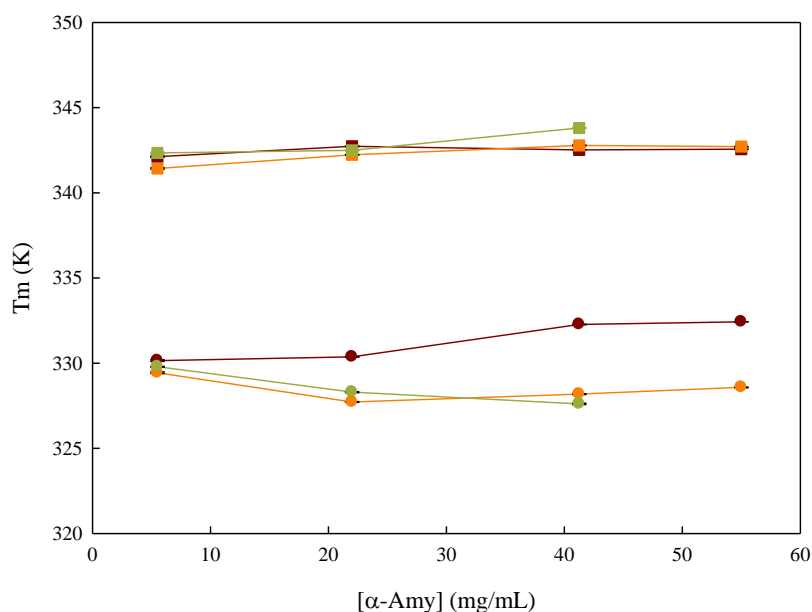


Figura 3.31: Dependencia de T_m con la concentración de α -Amy. Primera transición: α -Amy sola (\bullet), α -Amy/PAA 240.000 (\circ) y α -Amy/PAA 100.000 (\bullet). Segunda transición: α -Amy sola (\blacksquare), α -Amy/PAA 240.000 (\blacksquare) y α -Amy/PAA 100.000 (\blacksquare). Medio buffer Pi 50 mM, pH 6,00. Velocidad de barrido 0,5 K/min.

En ninguno de los casos T_m varió significativamente con la concentración de α -Amy. Esto significa que la desnaturalización térmica de la α -Amy no estaría acompañada de modificaciones en el estado de oligomerización de la enzima. Duy y col. concluyeron lo mismo al analizar la cinética de desnaturalización térmica y de agregación de varias alfa-amilasas provenientes de diversos orígenes a través de técnicas de espectroscopía de fluorescencia, dispersión de la luz y dicroísmo circular (Duy y Fitter, 2.005). Estos autores propusieron que la alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* se desnaturaliza de manera irreversible y posiblemente su forma desnaturalizada forma agregados proteicos, aunque mucho más pequeños comparados con otras alfa-amilasas.

Esta constancia en los valores de T_m también puede deberse a dos procesos que se compensan: disociación (que disminuye la T_m) seguida de agregación y precipitación de la cadena polipeptídica desnaturalizada (que aumenta la T_m), efectos que modifican la T_m en sentidos opuestos contrarrestándose uno con otro.

6. Diseño del método de precipitación

6.1. Precipitación de alfa-amilasa con PAA

Luego de determinar las condiciones óptimas de interacción entre la proteína y los PEs se diseñó un modelo de concentración y purificación de α -Amy por formación de complejos insolubles. Éstos pueden separarse del resto del medio por decantación y redisolverse en un nuevo medio, propicio para la conservación y estabilidad de la enzima. Las figuras 3.32 A y B muestran la actividad α -Amy en el control, PP y SN al precipitar la enzima con PAA 240.000 y 100.000, respectivamente.

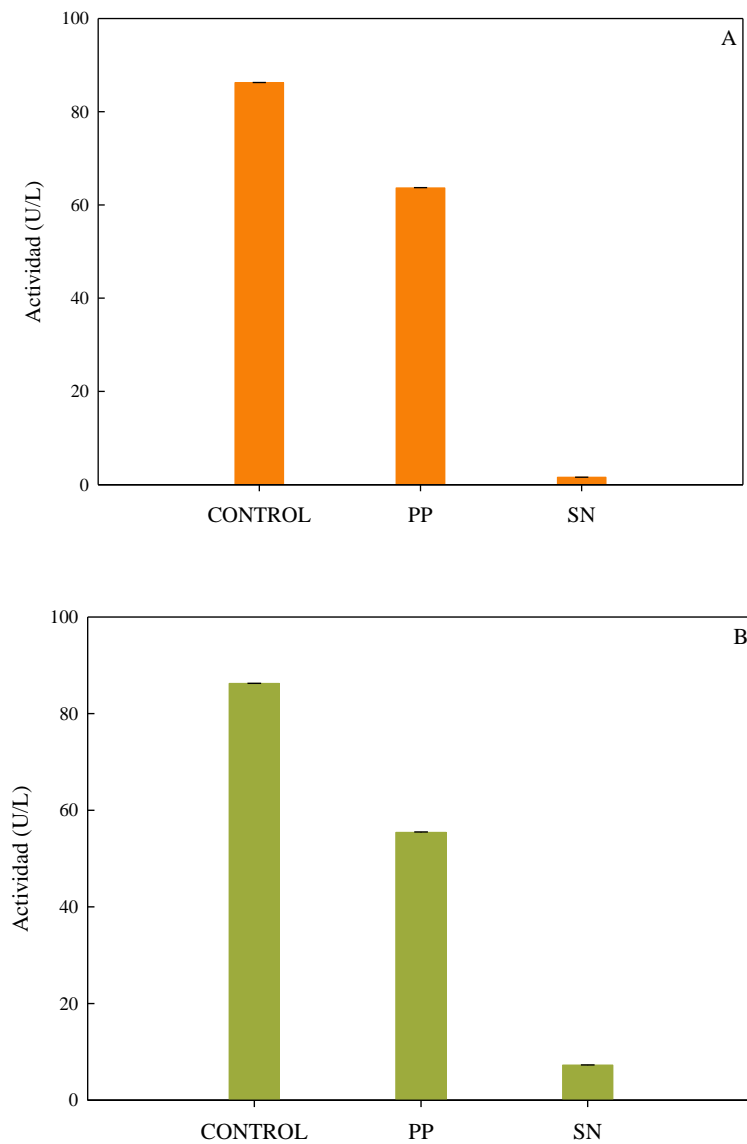


Figura 3.32: Precipitación de α -Amy con PAA 240.000 (A) y 100.000 (B). Buffer Pi 50 mM, pH 6,00. Temperatura 20°C.

Los valores de actividad medidos en cada caso se muestran en la tabla 3.7 junto con los porcentajes de la misma en cada fase:

TABLA 3.7: Precipitación de α -Amy con PAA 240.000 y PAA 100.000. Actividad α -Amy en el PP, SN y control. Porcentaje de actividad en cada fase respecto al control

	PAA 240.000	PAA 100.000
Actividad α-Amy CONTROL (U/L)	86,05 \pm 0,08	86,05 \pm 0,08
Actividad α-Amy PP (U/L)	63,49 \pm 0,08	55,27 \pm 0,08
Actividad α-Amy SN (U/L)	1,56 \pm 0,02	7,22 \pm 0,06
% Actividad α-Amy en PP	73,79	64,26
% Actividad α-Amy en SN	1,81	8,37

Cabe destacar que las relaciones molares de precipitación empleadas son las que arrojaron mejores rendimientos de precipitación. Las mismas son superiores a la “e” para cada sistema, es decir con exceso de polímero respecto a la relación estequiométrica de los complejos, siendo un agregado aun mayor de polielectrolito contraproducente a efectos del rendimiento total (resultados no mostrados).

En ambos casos, la actividad α -Amy fue significativamente superior en el PP en comparación al SN, es decir, la enzima se concentró en la primera fracción. Los porcentajes de actividad calculados reflejan una marcada tendencia de la α -Amy a precipitar en las condiciones diseñadas. Esto nos permite inferir que, en principio, esta técnica podría resultar adecuada para concentrar y purificar la enzima α -Amy al encontrarse en un medio más complejo.

Cabe destacar que las medidas absolutas de actividad en cada una de las fases no son comparables entre sí dado que éstas poseen composiciones diferentes. De allí la falta de exactitud en los balances de masa. Sin embargo, un valor significativamente mayor en el PP respecto del SN es indicio de la eficacia del método para precipitar la enzima de interés.

Por otro lado, al comparar los resultados arrojados por ambos polielectrolitos entre sí, el PAA 240.000 mostró un mayor poder precipitante, tal como se observó previamente según los valores de turbidez alcanzados en las curvas de titulación (Sección I 2.1. R y D).

6.2. Estabilidad catalítica de los complejos α -Amy/PAA precipitados

Luego de aplicar el modelo de concentración de α -Amy por precipitación de complejos insolubles, resulta de interés analizar la estabilidad de los precipitados obtenidos y optimizar el tiempo en el cual el mismo se debe resuspender.

La figura 3.33 A muestra la actividad α -Amy determinada para cada tiempo de incubación del control y de los precipitados y la figura 3.33 B los gráficos semilogarítmicos que permitieron el análisis cinético de la inactivación:

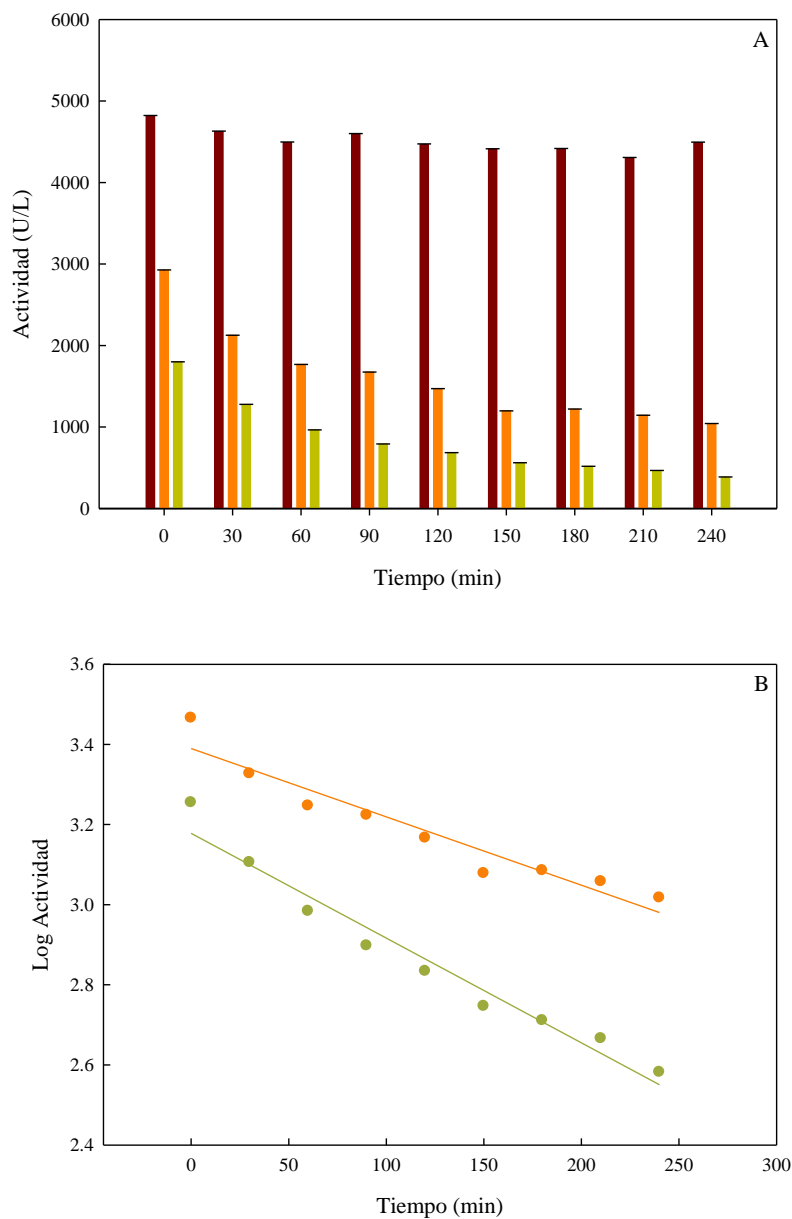


Figura 3.33: Estabilidad de los precipitados α -Amy/PAA: **A-** Actividad (U/L) vs. Tiempo (min) en el control (—), precipitado con PAA 240.000 (—) y 100.000 (—). **B-** Cinética de inactivación de primer orden: log Act. vs. Tiempo (min) con PAA 240.000 (●) y 100.000 (●).

Nuevamente, se encontró una alta estabilidad de la α -Amy en el control a pH 6,00 (Sección I 5.1.1. R y D) y el mismo patrón de inactivación de los precipitados, tal como la enzima a pH 3,00 (Sección I 5.1.2. R y D), con un decaimiento exponencial en la actividad α -Amy a lo largo del tiempo. Los gráficos semilogarítmicos mostraron que esta inactivación siguió una cinética de primer orden, con las constantes de velocidad (obtenidas de las pendientes de las regresiones lineales en la figura 3.33 B) que se detallan en la tabla a continuación:

TABLA 3.8: Constantes cinéticas de inactivación de orden uno (k) de la α -Amy en los precipitados y a pH 3,00

	k (min^{-1})
α -Amy (pH 3,00)	$2,2 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$
Precipitado α -Amy/PAA 100.000	$2,6 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$
Precipitado α -Amy/PAA 240.000	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$

Por un lado, estos valores de k fueron de menor magnitud que los obtenidos para la α -Amy a pH 3,00 (para facilitar la comparación se volvió a mostrar la constante de inactivación obtenida en dicho caso, en la Sección I 5.1.2. R y D), lo cual sugiere mayor estabilidad de la α -Amy en la forma precipitada respecto de la enzima a pH 3,00 previo a la precipitación. De todas formas, el tiempo de redisolución de los precipitados es un factor importante a tener en cuenta y minimizarlo podría mejorar los rendimientos totales del proceso.

Por otro lado, la k fue menor para el precipitado α -Amy/PAA 240.000 que 100.000, lo que nuevamente verifica mayor grado de estabilización para el polielectrolito de mayor peso molecular.

7. Análisis funcional de la alfa-amilasa luego de la precipitación

Una vez aplicado el modelo experimental de concentración y purificación de la α -Amy por precipitación con PAA, es necesario que la enzima conserve su actividad catalítica y que sea estable en el medio de redisolución.

La estabilidad catalítica de la α -Amy en los precipitados redisolultos se muestra en la figura 3.34:

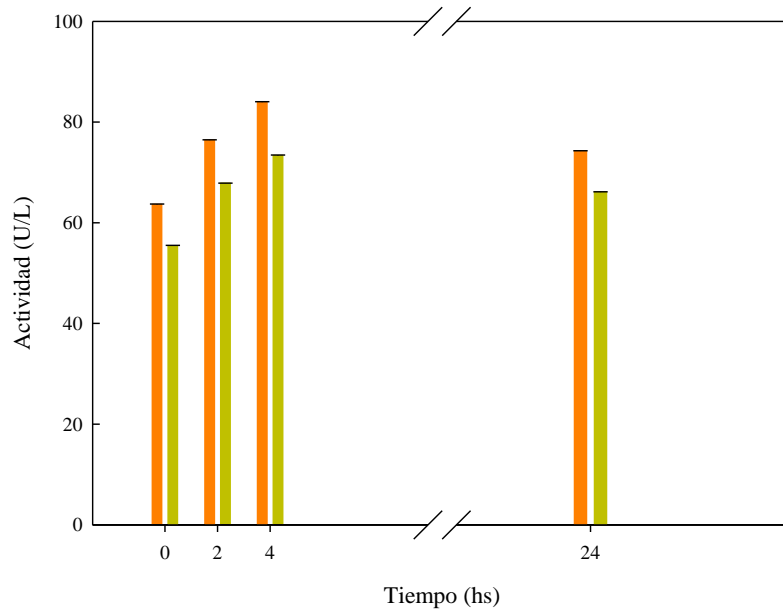


Figura 3.34: Estabilidad de los precipitados redisueltos: Act. (U/L) vs. tiempo (hs) en el precipitado redisuelto PAA 240.000 (—) y 100.000 (—). Medio buffer Pi 50 mM, pH 6,00. Temperatura 20°C.

Para ambos PAA, la actividad enzimática se fue recuperando en el transcurso del tiempo registrándose, al igual que para la enzima en *buffer* a pH 6,00 (figura 3.23) una leve tendencia a decaer a las 24 hs de incubación. Además, como ya se mencionó a partir de dicha figura, la actividad en presencia del PAA 240.000 fue siempre superior a la correspondiente en presencia del PAA de menor peso molecular.

SECCIÓN II: Reparto en SBAs

1. Reparto de la alfa-amilasa en SBAs PEG-fosfato de potasio, pH 7,00

1.1. Efecto de la composición de las fases, temperatura, peso molecular y concentración del PEG en los valores de K_e

La composición de las fases en equilibrio puede verse afectada por cambios en la temperatura. Luego de preparados los sistemas de la tabla 2.3 y de incubar a 8°C o 36°C, se observó que la relación de volúmenes final alcanzada no fue afectada, fue cercana a la unidad tal como habían sido preparados los medios, por lo tanto en este caso podemos decir que la temperatura no modificó la composición de los sistemas.

Los valores de K_e de la α -Amy en cada uno de los SBAs ensayados se muestran en la figura 3.35 A y B, para las dos temperaturas:

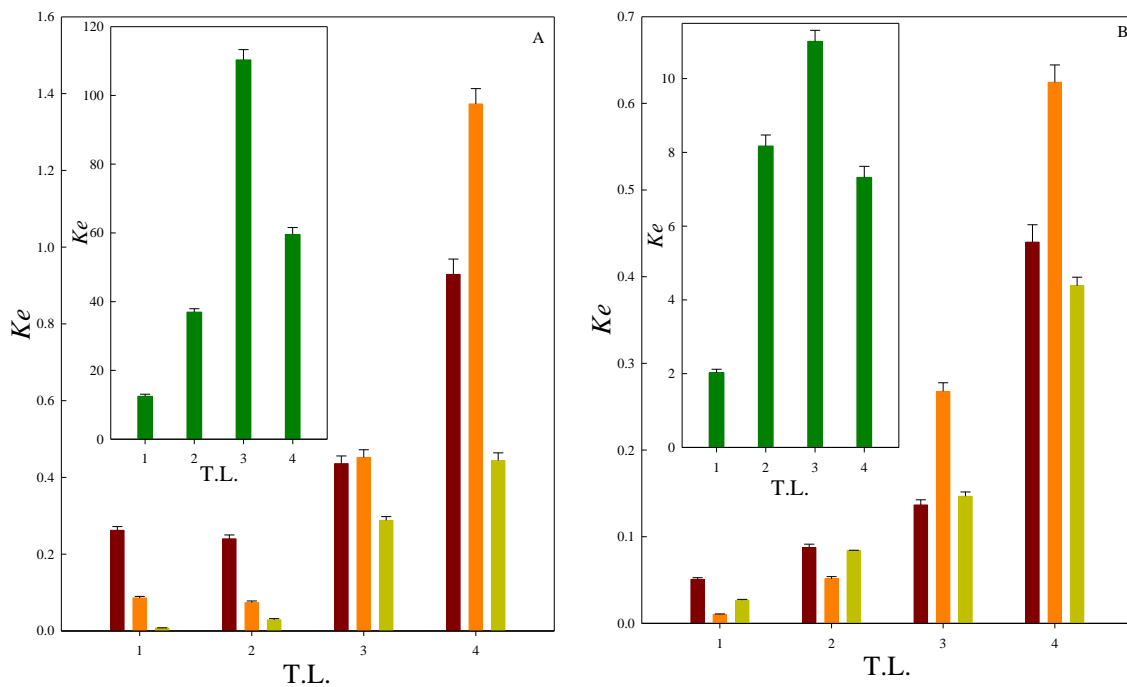


Figura 3.35: K_e vs. T.L. en los SBAs PEG-fosfato de potasio, pH 7,00. PM del PEG: 2.000(—), 3.350 (—), 6.000 (—) y 8.000 (—). Temperatura: 8°C (A) y 36°C (B).

Los valores de K_e resultaron mayores a la unidad para los SBAs formados por PEG 2.000 y (excepto en el sistema PEG 6.000/T.L. 4 a 8°C, donde K_e fue apenas superior a 1) con los otros pesos moleculares resultaron menores a la unidad, para todas las concentraciones de sistema analizadas. Es decir que luego de alcanzado el equilibrio

de reparto la α -Amy se concentró en la fase rica en el polímero en los sistemas PEG 2.000 y en la fase rica en sales en los sistemas PEG 3.350, 6.000 y 8.000.

Para explicar el comportamiento de reparto de una enzima en los SBAs PEG/sal podría pensarse que la proteína se equilibra en la fase polimérica por procesos de interacción específica PEG/proteína o en la fase inferior por cuestiones estéricas, dado que la concentración de polímero es menor y la disponibilidad del solvente es conveniente (teoría del volumen excluido).

Además, al aumentar el peso molecular del polímero generalmente se observa un efecto de exclusión de la proteína hacia la fase donde dicho polímero se encuentra en menor concentración. De hecho, se han reportado casos que verifican dicho efecto de exclusión estérica como factor determinante de la interacción entre el PEG con proteínas, dado que al incrementarse la masa molecular del polímero aumenta el volumen excluido por éste (Arakawa y Timasheff, 1.985; Lee y Lee, 1.981).

Se graficó el logaritmo de K_e en función del logaritmo del peso molecular del PEG ($\log PM$) a ambas temperaturas (figuras 3.36 A y B).

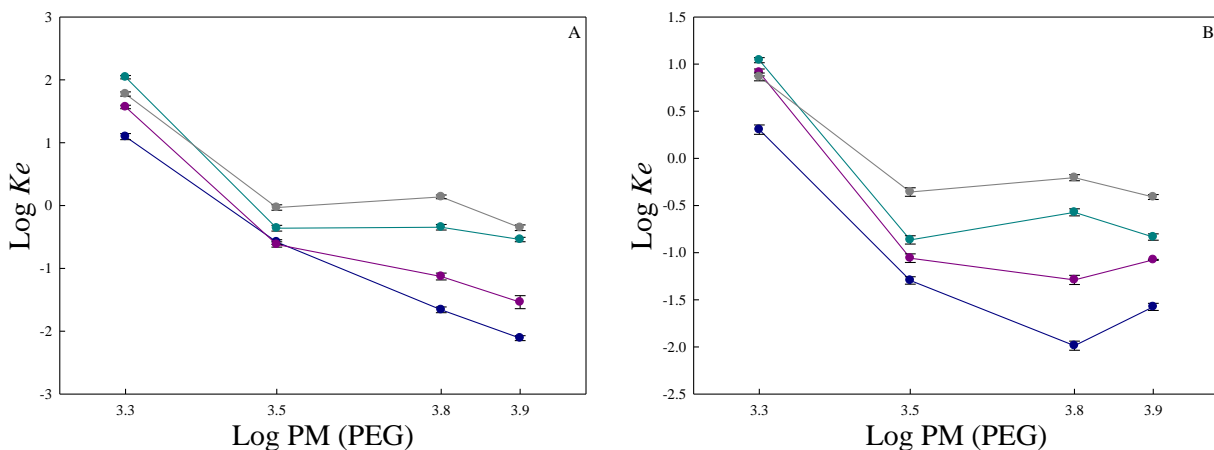


Figura 3.36: Dependencia de K_e con el peso molecular del PEG: $\log K_e$ vs. $\log PM$ (PEG) para las cuatro líneas de unión: T.L. 1 (●), 2 (●), 3 (●) y 4 (●). Temperatura 8°C (A) y 36°C (B).

Al aumentar la masa molar del PEG entre 2.000 y 3.350 los valores de K_e disminuyeron y esta tendencia fue menos importante o casi nula para masas molares de PEG mayores (entre 3.350 y 8.000). Es decir, el aumento en la masa molar del PEG produciría el desplazamiento del equilibrio de reparto hacia la fase inferior, en la cual se

encuentra en menor concentración. Esto último podría indicar que el volumen excluido puede ser un factor influyente en el reparto de la enzima en estos sistemas.

Los elevados valores de Ke en los sistemas PEG 2.000 podrían indicar interacciones específicas entre éste y la α -Amy, lo cual permite el desplazamiento de la misma hacia la fase más hidrofóbica.

La ecuación de estado de Wyman (3.1) establece que a cualquier concentración de ligando (PEG), la derivada de la constante de equilibrio (K) con respecto a la actividad del ligando (a_3) es igual a la variación del grado de unión del mismo durante el proceso de reparto a presión y temperatura constantes:

$$\frac{\partial \ln K}{\partial \ln a_3} = v_{3,\text{sup}} - v_{3,\text{inf}} \quad (3.1)$$

donde $v_{3,\text{sup}}$ y $v_{3,\text{inf}}$ representan la cantidad de moléculas de PEG unidas a la proteína que se reparte en la fase superior e inferior, respectivamente (Timasheff, 2.002). De acuerdo a esta ecuación, si esta derivada es mayor a cero indica que la cantidad de moléculas de PEG unidas a la proteína en la fase superior es mayor a la cantidad unidas en la fase inferior, mientras que si es menor a cero se daría el caso inverso.

Dada la imposibilidad de medir los valores de actividad del PEG (a_3) se supone que éste es proporcional a la concentración molar del mismo a través del coeficiente de actividad de la solución, considerando que son bajas las concentraciones molares del polímero. Se procedió a graficar $\log Ke$ vs. $\log [\text{PEG}]$ (M). Estas gráficas se realizaron para todos los pesos moleculares y a ambas temperaturas, como se ilustra en la figura 3.37:

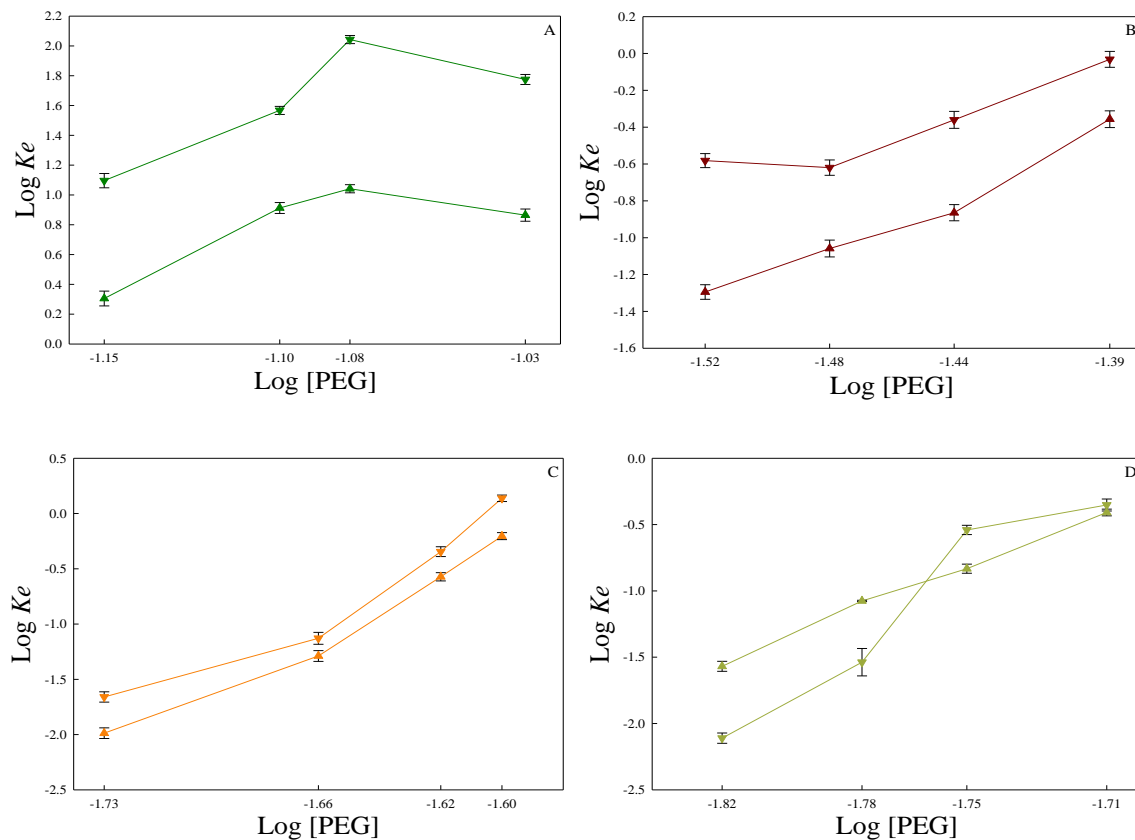


Figura 3.37: Dependencia de K_e con la concentración molar de PEG: $\log K_e$ vs. $\log [\text{PEG}]$. Peso molecular del PEG: 2.000 (A), 3.350 (B), 6.000 (C) y 8.000 (D). Temperatura: 8°C (triángulo descendente) y 36°C (triángulo ascendente).

En general, la derivada del $\log K_e$ vs. $\log [\text{PEG}]$ (M) fue positiva, con lo cual, según la ecuación de estado de Wyman (3.1), el número de moléculas de PEG unidas por mol de proteína es mayor en la fase superior respecto de la inferior, indicando que existe interacción entre la proteína y el polímero en todos los casos analizados, a pesar que la proteína se reparta mayoritariamente hacia la fase inferior en sistemas de PEGs de ciertas masas molares. Por lo tanto, el reparto de la enzima estaría también condicionado por efectos de interacción PEG/ α -Amy aunque el efecto del volumen excluido juegue un rol fundamental y determinante en el mismo.

1.2. Funciones termodinámicas del proceso de reparto

Las funciones termodinámicas pueden dar información sobre el tipo de fuerzas involucradas en el pasaje de la enzima desde la fase rica en sal a la fase rica en PEG. Considerando al ΔH° constante en el rango de temperatura de trabajo (Arakawa y Timasheff, 1.985; Spelzini y col, 2.005), se obtuvieron los valores de cambio entálpico

(ΔH°) y entrópico (ΔS°) estándar que se representan en las figuras 3.38 A y B, respectivamente:

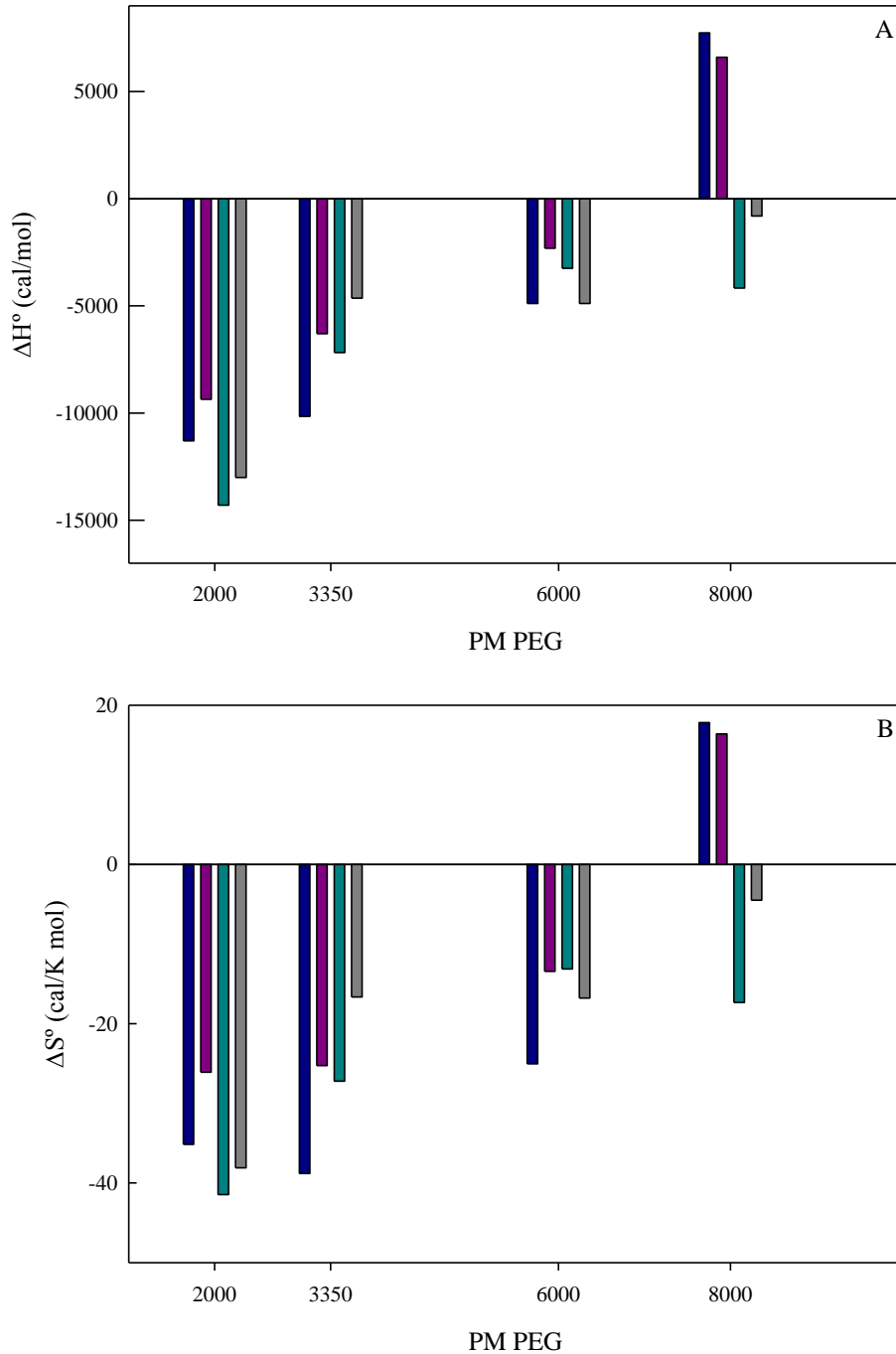


Figura 3.38: Funciones termodinámicas del proceso de reparto de la α -Amy en SBAs PEG-fosfato de potasio: ΔH° (A) y ΔS° (B). Líneas de unión: T.L. 1 (—), 2 (—), 3 (—) y 4 (—).

La transferencia de la α -Amy desde la fase rica en sal a la fase rica en PEG resultó ser un proceso exotérmico, tal como demostraron los valores negativos de ΔH° en la mayoría de los casos. También se obtuvieron cambios entrópicos negativos para los mismos sistemas, lo cual sugiere la formación de un estado final más ordenado con liberación de energía. En base a estos resultados, en principio se podría inferir la existencia de interacciones electrostáticas en el proceso de transferencia de la proteína desde la fase inferior a la superior o un re-arreglo importante de las moléculas de agua con formación de enlaces cuando la proteína se transfiere. El proceso en general está conducido entálpicamente.

A medida que la masa molar del PEG aumenta los cambios entálpicos y entrópicos decrecieron en magnitud llegando a invertirse en algunos casos. En el proceso de transferencia de la α -Amy desde la fase inferior a la superior el significado de los resultados implica liberación de energía y ordenamiento del sistema y a medida que aumenta la masa molecular del PEG disminuyen ambos efectos.

Para cada masa molar de PEG la disminución de la entalpía del proceso se explicaría por la formación de enlaces en el sistema formado por solvente, cosolutos (PEG y sales) y la proteína. Esa formación de enlaces es menor a medida que aumenta la masa molar de PEG. Si tuviésemos en cuenta solamente la interacción PEG-proteína, podría explicarse la menor interacción debido a exclusión del polímero de los dominios proteicos por impedimentos estéricos cuando la masa molar del PEG aumenta. Si la interacción PEG-proteína no fuese el factor preponderante o no fuese exotérmica la interacción habría que pensar que la formación de enlaces del sistema solvente-cosoluto disminuye a medida que la masa molar de PEG crece.

Respecto al ordenamiento del sistema para el proceso de transferencia de la proteína, también disminuye a medida que aumenta la masa molar del PEG, probablemente porque los estados de partida sean más ordenados para los PEG mayores o los estados alcanzados sean más desordenados teniendo en cuenta al sistema solvente-cosoluto-proteína.

La figura 3.39 muestra los valores de ΔH° y ΔS° para el equilibrio de reparto de la α -Amy presentados en un gráfico lineal de compensación.

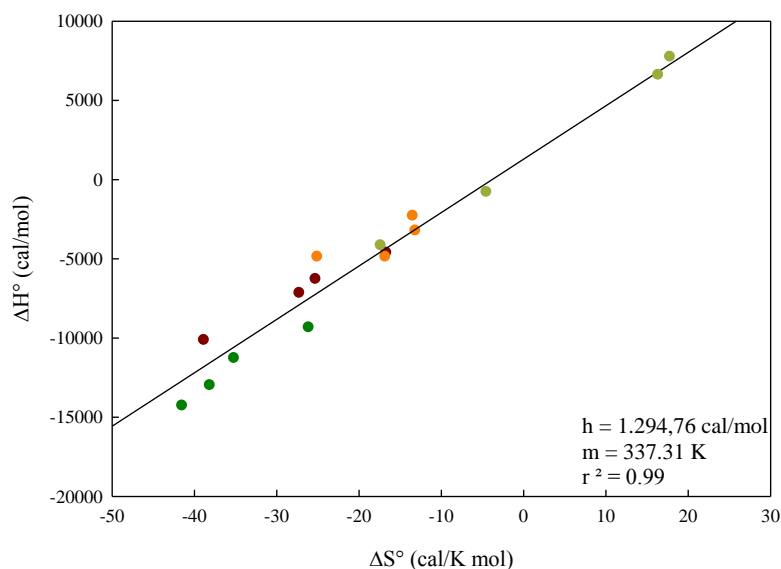


Figura 3.39: Gráfico de compensación entrópico-entálpico asociado al reparto de α -Amy en todos los SBAs empleados: ΔH° (cal/mol) vs. ΔS° (cal/K mol). PM del PEG: 2.000 (●), 3.350 (●), 6.000 (●) y 8.000 (●), para las cuatro T.L. en orden creciente de concentración. Ajuste lineal de los datos experimentales (—) y parámetros de regresión: h (ordenada al origen), m (pendiente) y r^2 (coeficiente de correlación).

La relación lineal existente entre ΔH° y ΔS° indica que estas variables cambian en paralelo y se compensan una con otra para producir un cambio menor en la energía libre del proceso. Este patrón lineal de compensación entrópico-entálpico evidencia la participación de las moléculas de agua en el mecanismo de reparto y es la manifestación termodinámica de los efectos de estructuración y desestructuración (Lumry y Rajender, 1.970).

1.3. Rendimientos porcentuales teóricos de la α -Amy en las fases de los SBAs

La eficiencia de un método de extracción líquido-líquido para purificar una proteína puede evaluarse a través del porcentaje de rendimiento teórico de la misma que se reparte en cada fase.

En la tabla 3.9 se muestran los rendimientos porcentuales teóricos (Y%) del proceso de reparto de la α -Amy en la fase superior (PEG 2.000) e inferior (PEG 3.350, 6.000 y 8.000), calculados en función de los Ke a 8°C y 36°C:

TABLA 3.9: Rendimientos teóricos porcentuales del proceso de reparto de la α -Amy en los sistemas PEG-fosfato de potasio ensayados

T.L.	PEG 2.000 Y% (fase sup.)	PEG 3.350 Y% (fase inf.)	PEG 6.000 Y% (fase inf.)	PEG 8.000 Y% (fase inf.)
Temperatura 8°C				
1	92,58	79,24	97,85	99,23
2	97,37	80,65	93,11	97,18
3	99,11	69,64	68,87	77,64
4	98,35	51,84	42,14	69,25
Temperatura 36°C				
1	66,88	95,15	99,01	97,37
2	89,09	91,99	95,15	92,25
3	91,67	87,95	78,86	87,18
4	87,98	69,44	61,58	71,94

Analizando los rendimientos obtenidos en todos los SBAs ensayados, se han seleccionado aquellos con mayor potencial separativo para continuar con los estudios de interacción y optimización de variables experimentales, con la finalidad de aplicarlos posteriormente a la extracción de la enzima a partir de diversas fuentes naturales.

Los SBAs seleccionados fueron: **PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3** y **PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1**, dado que estos sistemas han arrojado un alto rendimiento a ambas temperaturas.

1.4. Efecto del agregado de NaCl en el proceso de reparto de la α -Amy

En la figura 3.40 se muestran los perfiles de reparto obtenidos para la α -Amy en presencia de concentraciones de NaCl crecientes, en los SBAs seleccionados anteriormente:

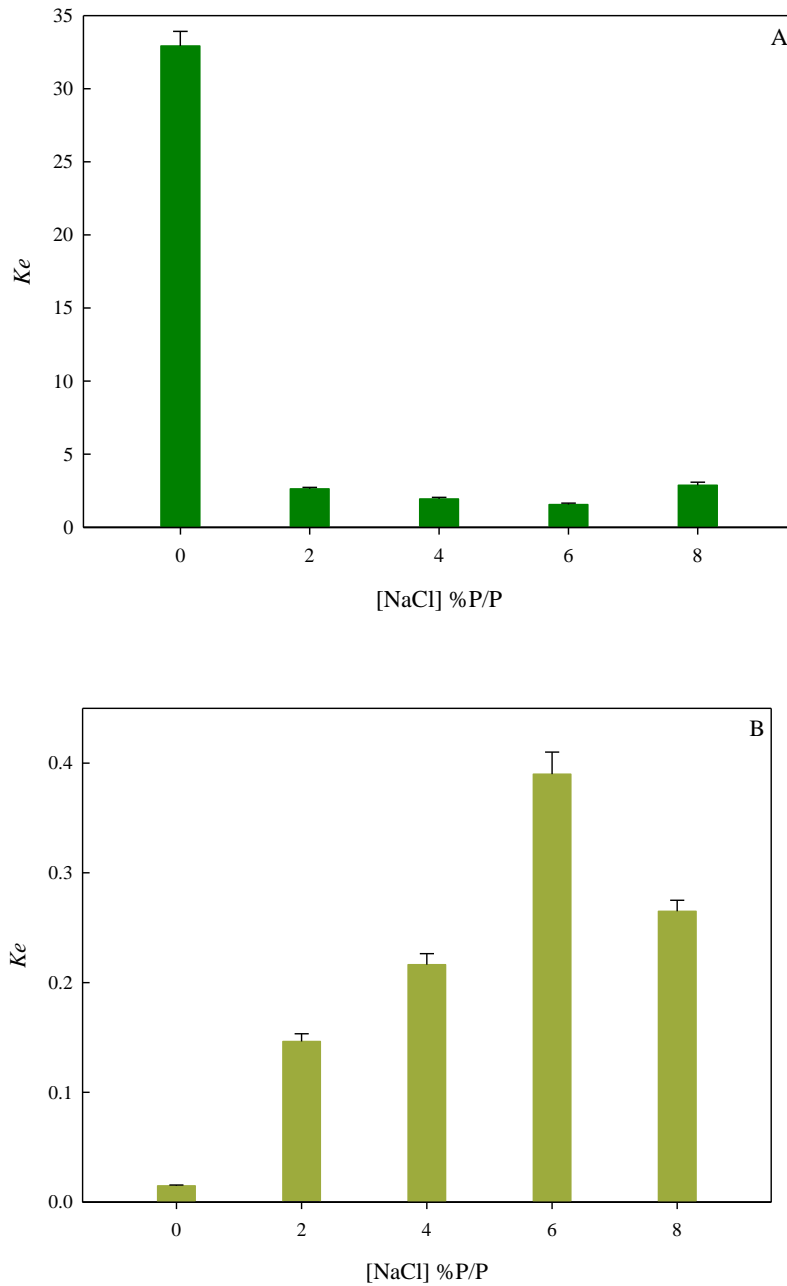


Figura 3.40: Efecto del NaCl en el perfil de reparto de la α -Amy: K_e vs [NaCl] % P/P. Sistema PEG2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 (A) y PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 (B). Temperatura = 8°C.

En ninguno de los casos la presencia de NaCl mejoró el reparto de la α -Amy, dado que para el sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 ($K_e > 1$) el aumento en la concentración salina produjo una disminución en K_e , mientras que en el sistema PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 ($K_e < 1$) la presencia de NaCl tendió a aumentar el valor de K_e . Es decir, en ambos casos el efecto del NaCl fue aproximar los valores de K_e a la

unidad, lo cual no resulta beneficioso para los fines separativos y se corrobora con los rendimientos teóricos porcentuales que se obtuvieron para cada sistema (tabla 3.10):

TABLA 3.10.: Rendimientos teórico porcentuales (Y%) obtenidos en los sistemas PEG 2.000-Pi/T.L. 3 (fase superior) y PEG 8.000-Pi/T.L. 1 (fase inferior), a distintas concentraciones de NaCl. Temperatura 8°C

[NaCl] (%P/P)	PEG 2.000- fosfato de potasio/T.L. 3 Y%(fase sup.)	PEG 8.000- fosfato de potasio/T.L.1 Y%(fase inf.)
0	97,05	98,54
2	72,48	87,23
4	66,05	82,21
6	60,92	71,94
8	74,25	79,05

Cabe destacar que los iones Na^+ y Cl^- poseen coeficientes de reparto similares y no afectan significativamente el potencial eléctrico de la interfase (Zaslavsky, 1.995).

Los resultados obtenidos pueden interpretarse en términos del desordenamiento que produce el NaCl (y otras sales) en las moléculas de agua estructurada que se encuentran alrededor de los grupos hidrofóbicos del PEG o α -Amy expuestos al solvente, lo cual afectaría el factor entrópico de la partición influyendo negativamente en el rendimiento total del reparto en ambos sistemas. Esto también corrobora el importante papel del agua, tal como se observó por los efectos de compensación entrópico-entálpico (Sección II 1.2. R y D). Este desordenamiento también podría facilitar la interacción entre el polímero y la proteína aumentando el valor de Ke . De acuerdo a estos resultados, la pérdida de agua estructurada alrededor de la α -Amy o el PEG favorecería la interacción con el PEG 8.000 pero no con el 2.000.

Teniendo esto en cuenta, en ninguno de los casos es conveniente optar por el agregado de sal para la optimización del diseño bioseparativo.

1.5. Efecto de la variación en la relación de los volúmenes de fase (R) en el proceso de reparto de la α -Amy

Se han ensayado los repartos de α -Amy en los SBAs previamente seleccionados a distintas relaciones de volúmenes. Los valores de Ke obtenidos en cada caso se muestran en la figura 3.41:

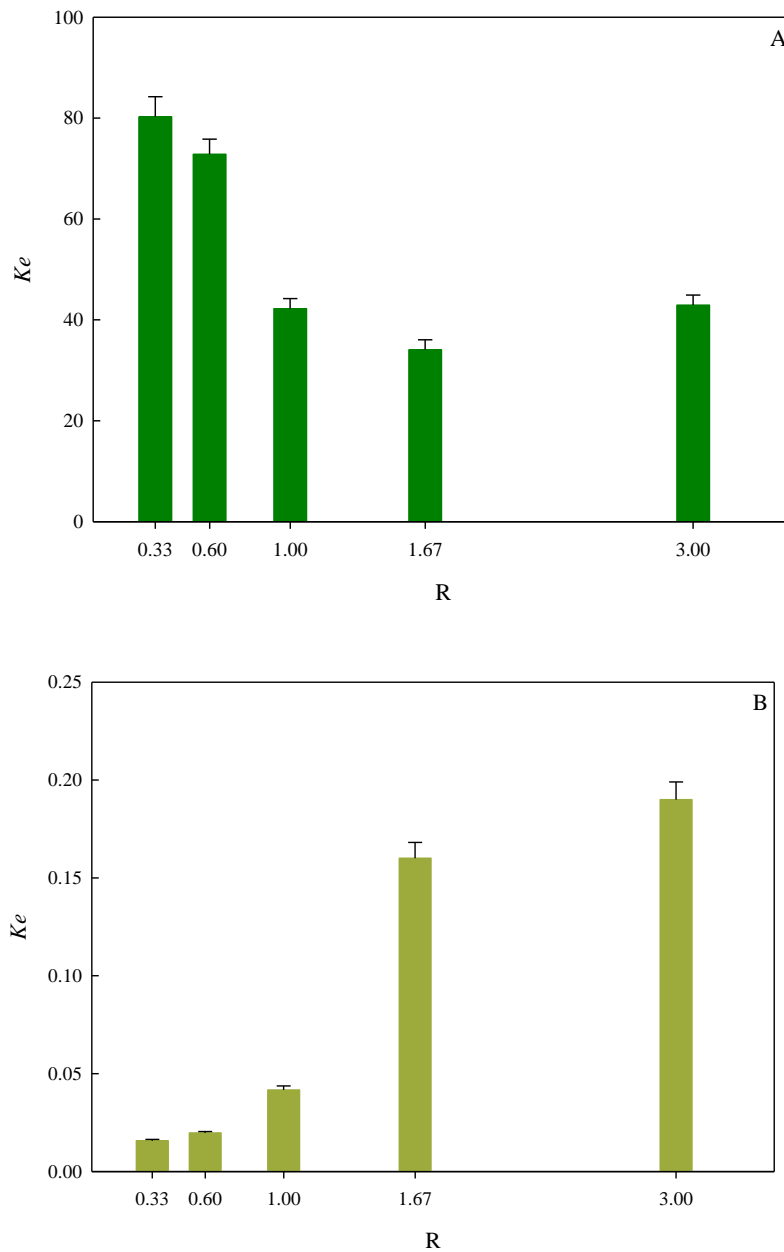


Figura 3.41: Efecto del R en el reparto de la α -Amy: Ke vs R . Sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 (A) y PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 (B). Temperatura 8°C .

Al aumentar el valor de R Ke tendió a disminuir en los sistemas PEG 2.000 y a aumentar en los sistemas PEG 8.000. Sin embargo, los porcentajes de masa de enzima recuperados, que dependen tanto de Ke como de R y se muestran a continuación (tabla 3.11), indican que para el primer caso el rendimiento en fase superior mejora al aumentar R mientras que para el último el rendimiento en fase inferior aumenta al disminuir R :

TABLA 3.11.: Rendimientos teórico porcentuales (Y%) obtenidos en los sistemas PEG 2.000-Pi/T.L. 3 (fase superior) y PEG 8.000-Pi/T.L. 1 (fase inferior) a diferentes relaciones de volúmenes entre fase superior e inferior. Temperatura 8°C

R	PEG 2.000- fosfato de potasio/T.L. 3 <i>Y%(fase sup.)</i>	PEG 8.000- fosfato de potasio/T.L. 1 <i>Y%(fase inf.)</i>
0,33	96,40	99,48
0,60	97,76	98,83
1,00	97,69	96,00
1,67	98,27	78,93
3,00	99,23	63,69

En algunos casos puede ocurrir que la variación en la relación de volúmenes entre las fases de un SBA produzca un cambio en la interacción entre la proteína y el polímero, posiblemente debido a una variación en el volumen excluido por el mismo, modificando el coeficiente de reparto de la proteína en dichos sistemas (Guan y col., 1.993; Kang y col, 1.989).

De esta forma, estos resultados se pueden interpretar en términos del volumen excluido por el PEG: al reducirse el volumen de la fase polimérica disminuye el volumen disponible para la proteína en la misma y el volumen excluido por el PEG se incrementa. Esto favorecería el reparto de la α -Amy hacia la fase salina, siendo esto conveniente en los sistemas donde la enzima se recupera en dicha fase (PEG 8.000).

2. Naturaleza de la interacción PEG/ α -Amy. Calorimetría de titulación isotérmica

En la figura 3.42 A se muestra la isoterma de ITC (a 20°C) obtenida para la titulación α -Amy/PEG 2.000 y en 3.42 B el calor total intercambiado luego de cada agregado del polímero titulante en función de la concentración de ligando total ([PEG]), junto con el ajuste de los datos experimentales al modelo de fijación de sitios equivalentes e independientes, ambas corregidas por efectos de dilución:

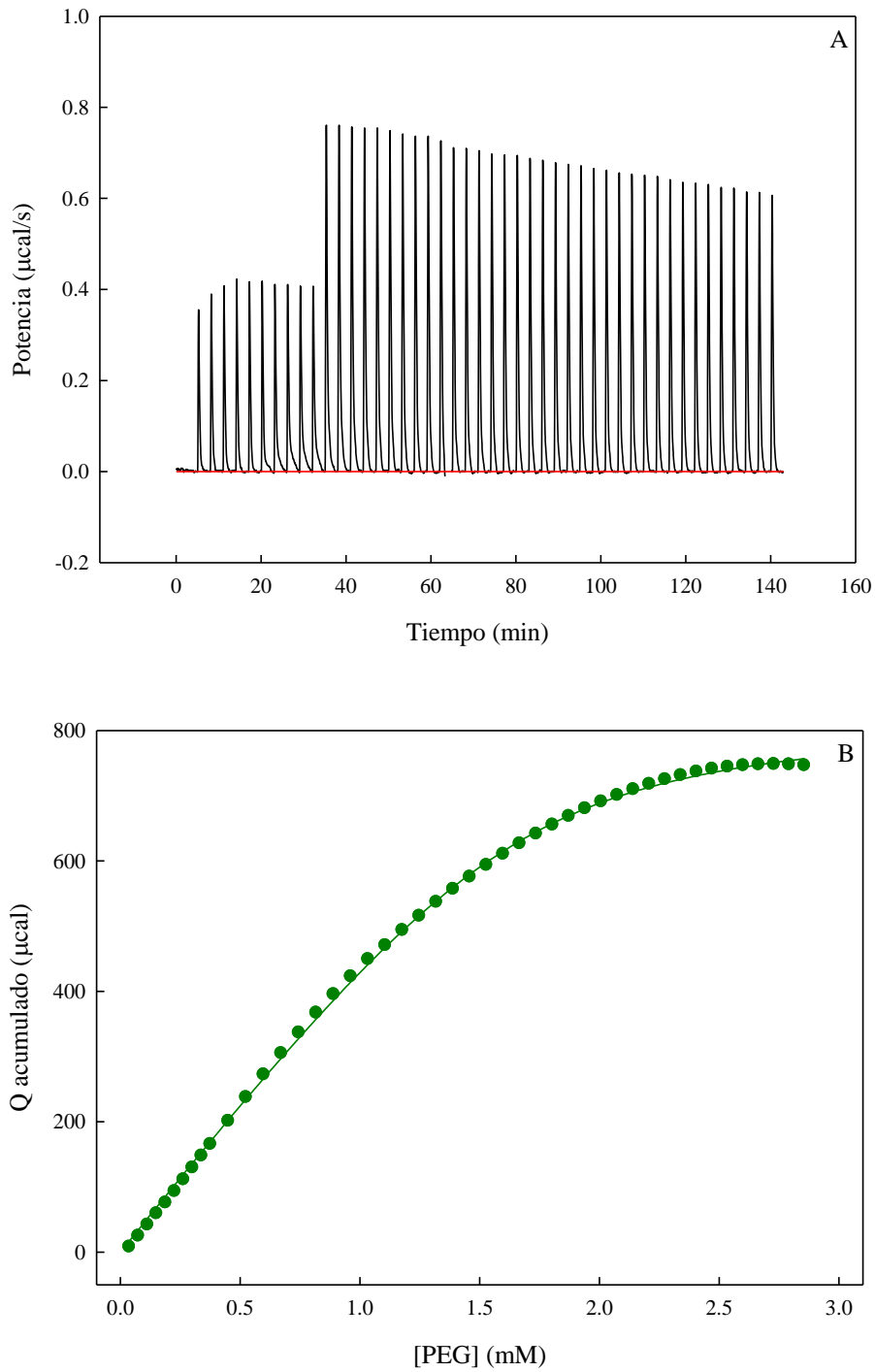


Figura 3.42: ITC α -Amy/PEG 2.000. **A-** Potencia ($\mu\text{cal/s}$) vs. Tiempo (min).
B- $Q_{\text{acumulado}}$ (μcal) vs. [PEG](mM). Ajuste matemático (—).
 Medio buffer Pi 50 mM, pH 7,00, Temperatura 20°C.

En la tabla 3.12 se muestran los parámetros que caracterizan a esta interacción, obtenidos a través del ajuste matemático de los datos al modelo de *binding* de sitios independientes y equivalentes:

TABLA 3.12: Funciones termodinámicas y parámetros de la fijación α -Amy/PEG 2.000

ΔH° (cal/mol)	$K (M^{-1})$	n	ΔG° (cal/mol)	ΔS° (cal/Kmol)
575 ± 9	$8,3 \pm 0,9$	$1,68 \pm 0,02$	-1240 ± 60	$6,2 \pm 0,2$

La interacción resultó ser predominantemente endotérmica, con deflexiones positivas respecto de la línea de base y calores acumulados positivos, alcanzando saturación a una dada concentración de PEG.

La magnitud del ΔH° indica que la interacción es débil, como también el pequeño valor en la constante de afinidad K , en comparación con otras interacciones reportadas para el PEG (Pellegrini Malpiedi y col., 2.010). Esto hace que $1,68 \pm 0,02$ moléculas de PEG se unan por molécula de proteína. El cambio entrópico también resultó positivo, es decir, se alcanza un estado final más desordenado.

Estos resultados caracterizan a una interacción de naturaleza principalmente hidrofóbica, entrópicamente conducida. Esto es coherente con un alto grado de desestructuración del agua que se encuentra sobre el esqueleto hidrofóbico del PEG (altamente hidratado en solución acuosa). La interacción con la α -Amy produce que dichas moléculas de agua se desordenen, predominando este efecto sobre el ordenamiento que produce el *binding* propiamente dicho.

3. Análisis conformacional de la alfa-amilasa en los SBAs seleccionados

3.1. Espectros de emisión de fluorescencia de la alfa-amilasa con y sin PEG

En la figura 3.43 se muestran los espectros de emisión de F de la α -Amy en las fases superior e inferior de los sistemas PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 y PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 y en el cuadro interno los λ_{\max} registrados en cada caso:

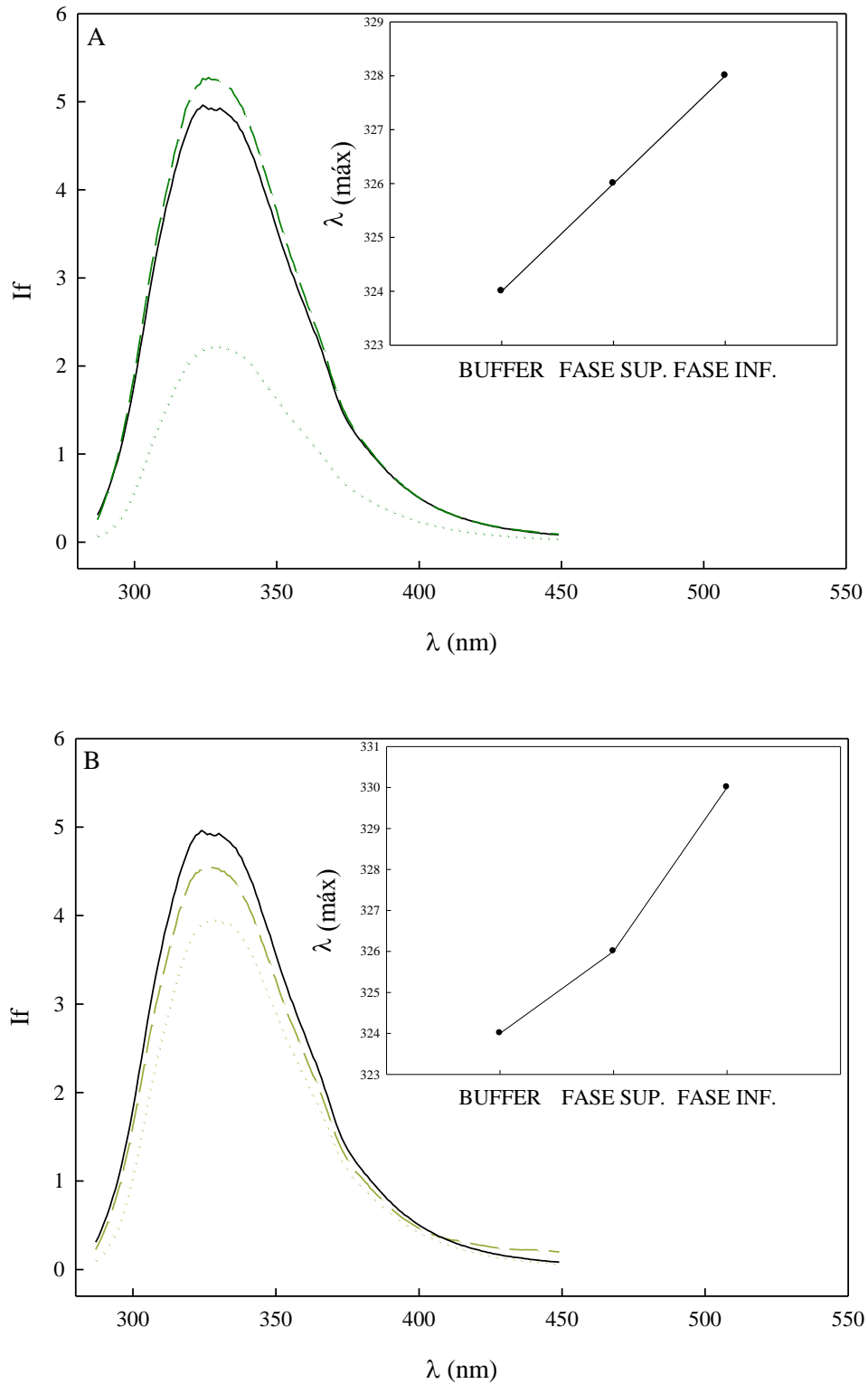


Figura 3.43: Espectros de emisión de F de la α -Amy en las fases de los SBAs seleccionados. **A-** Sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3, control (—), fase superior (— —) y fase inferior (····). **B-** Sistema PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1, control (—), fase superior (— —) y fase inferior (····). Temperatura 20°C. Cuadro interno: λ_{max} alcanzado en cada medio.

Las I_f máximas disminuyeron notablemente en las fases inferiores respecto del control, manteniéndose menos afectadas en las fases superiores. Además, la presencia de las fases indujo un corrimiento en el $\lambda_{(\text{máx})}$ hacia mayores longitudes de onda, más marcado para la fase inferior que para la superior, en ambos sistemas. Este corrimiento de los espectros hacia el rojo refleja un entorno más polar de los triptófanos de la α -Amy de lo que se encontrarían en *buffer*, indicando sobreexposición de los mismos al solvente debido a cierta desestructuración de la enzima, al menos en las regiones próximas al microentorno de estos residuos.

Por otro lado, todos los espectros de emisión de F presentados en esta sección exhibieron $\lambda_{\text{máx}}$ entre 324 y 330 nm, lo cual corresponde a longitudes de onda de residuos de triptófanos que se ubican en un entorno hidrofóbico, en una región interna de la estructura tridimensional proteica, tal como se mencionó previamente en la Sección I 4.2. de R y D (Lakowicz, 1.983; Duy y Fitter, 2006).

3.2. Quenching con acrilamida de la F nativa de la alfa-amilasa. Efecto de las fases de los SBAs

En la figura 3.44 se muestran los gráficos de Stern-Volmer (I_f/I_0 vs. [*quencher*]) de la α -Amy en *buffer* Pi 50 mM, pH 7,00 y en cada una de las fases de los SBAs seleccionados.

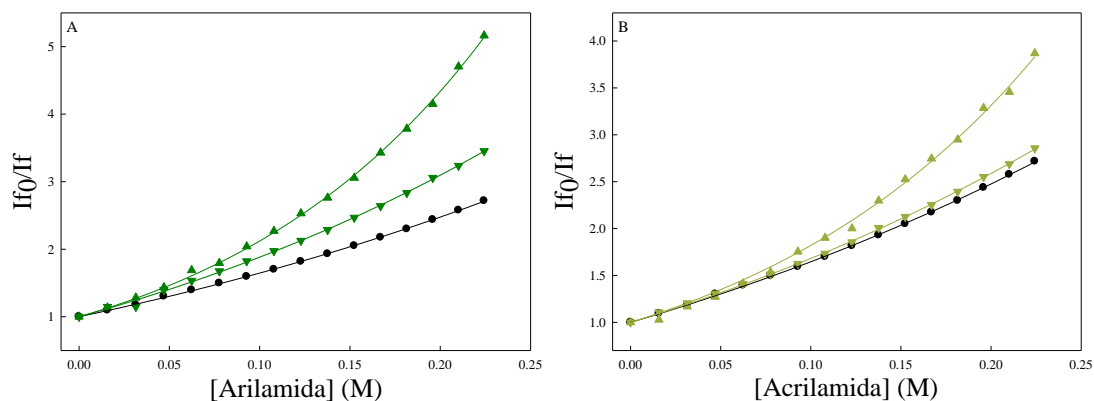


Figura 3.44: Gráficos de Stern-Volmer: I_f/I_0 vs. [Acrilamida] (M). **A-** Sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3, control (●), fase superior (▲), fase inferior (▼) y ajuste al modelo de quenching de esfera de acción (línea continua). **B-** Sistema PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1, control (●), fase superior (▲), fase inferior (▼) y ajuste al modelo de quenching de esfera de acción (línea continua). Temperatura 20°C.

En todos los casos se produjo una desviación positiva de la linealidad en las gráficas de Stern-Volmer y el ajuste no lineal de esta ecuación, modificada para el modelo de esfera de acción, arrojó los parámetros que se indican en la tabla a continuación:

TABLA 3.13: *Parámetros de quenching de la α -Amy con acrilamida, según el modelo de esfera de acción*

	<i>PEG 2.000-fosfato de potasio/ T.L. 3</i>			<i>PEG 8.000-fosfato de potasio/ T.L. 1</i>		
	K_D	v (cm ³)	r (Å)	K_D	v (cm ³)	r (Å)
<i>Buffer</i>	4,17	2,49.10 ⁻²¹	8,41	4,17	2,49.10 ⁻²¹	8,41
<i>Fase sup.</i>	2,33	9,00.10 ⁻²¹	12,91	0,02	9,91.10 ⁻²¹	13,33
<i>Fase inf.</i>	5,51	3,21.10 ⁻²¹	9,16	4,13	2,90.10 ⁻²¹	8,84

Los valores de K_D disminuyeron en las fases superiores de ambos sistemas y aumentaron (PEG 2.000) o se mantuvieron casi invariables (PEG 8.000) en las fases inferiores, en comparación con la enzima en *buffer*. En cuanto a los volúmenes (o radios) de la esfera de acción, estos fueron mayores en fase superior e inferior para ambos sistemas.

La constante de *quenching* de Stern-Volmer, tal como se mencionó en la sección 4.1.4. de Introducción, es el producto del tiempo de vida media del fluoróforo y la constante de *quenching* bimolecular, siendo ésta última dependiente (entre otras cosas) del flujo difusivo del *quencher* y el fluoróforo y de la afinidad entre ellos. Por lo tanto, la disminución en los valores de K_D observados podría indicar menor difusión del *quencher* hacia el fluoróforo cuando la proteína se encuentra en las fases superiores, lo que conduce a una menor frecuencia de colisión y por ende una menor ocurrencia del *quenching*, o bien a una menor afinidad entre ellos.

Por otra parte, los mayores r obtenidos para la α -Amy en las fases indicarían que existe una región de mayor volumen alrededor de los triptófanos donde la probabilidad de *quenching* es uno. Esto significa que una vez que el *quencher* alcanza dicha región produce la extinción de la fluorescencia.

Cuando la α -Amy está en contacto con la fase inferior se observó un efecto más leve en los valores de K_D pero aún así los radios se vieron incrementados.

Se puede asumir que el PEG, el cual está en mayor concentración en la fase superior, disminuye la accesibilidad o afinidad del *quencher* por la enzima,

disminuyendo su capacidad de interactuar con dominios proteicos, probablemente por impedimentos estéricos.

3.3. Espectros de dicroísmo circular de la alfa-amilasa con y sin PEG

La figura 3.45 muestra los espectros de DC de la α -Amy en cada una de las fases de los SBAs seleccionados y en un control de la enzima en *buffer* Pi 50 mM, pH 7,00.

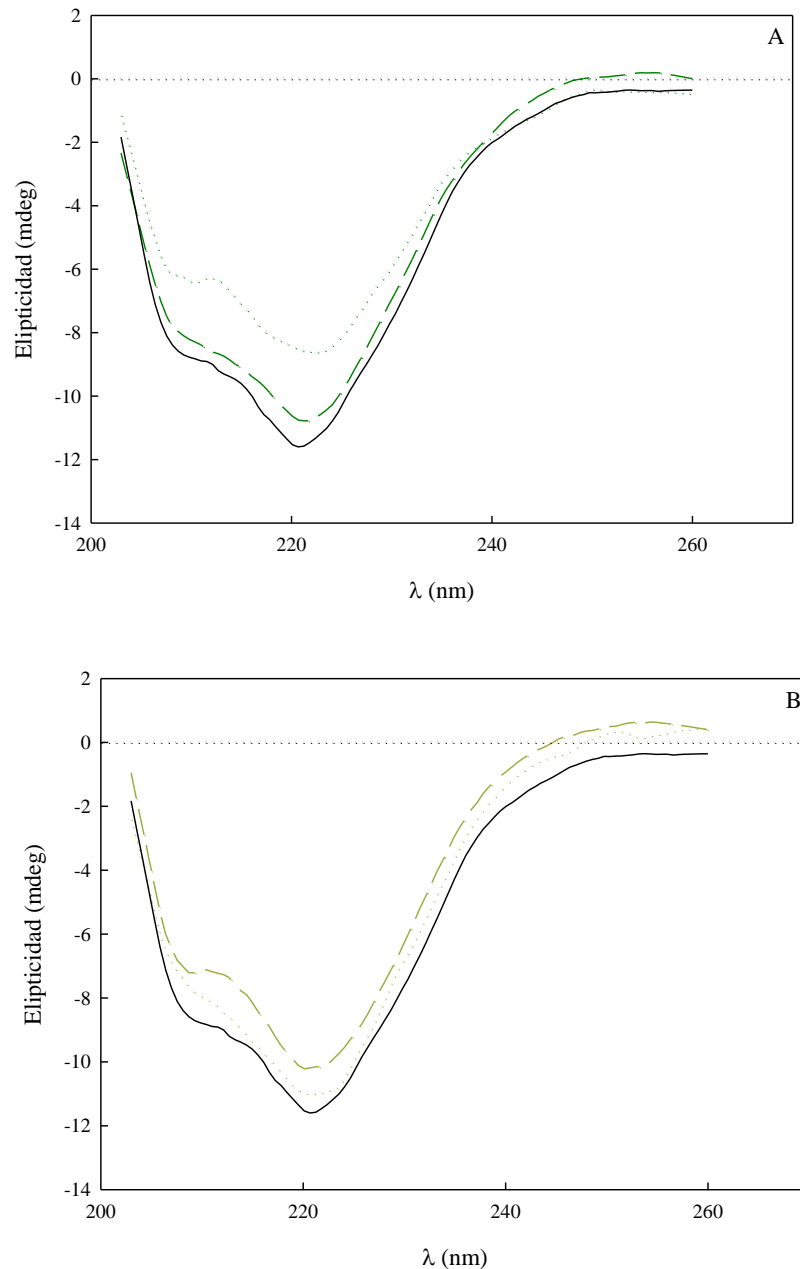


Figura 3.45: Espectros de DC de la α -Amy en las fases de los SBAs seleccionados. **A-** Sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3, control (—), fase superior (— —) y fase inferior (····). **B-** Sistema PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1, control (—), fase superior (— —) y fase inferior (····). Temperatura 20°C.

Se registraron dos mínimos aproximadamente a 222 y 208 nm con intensidades que sugieren la existencia de segmentos alfa-hélice y láminas beta combinados, al igual que a pH 3,00 y 6,00 (Sección I 4.3. y 5.2.1. R y D).

En ninguno de los casos se produjo una modificación sustancial del espectro de la α -Amy en presencia de las fases. La diferencia más notoria se observó en la fase inferior del sistema PEG 2.000, con picos de menor intensidad respecto de los otros medios, lo cual denota cierta pérdida de estructura secundaria en la enzima en estos sistemas.

4. Actividad de la alfa-amilasa en las fases de los SBAs

En la tabla 3.14 se muestran los porcentajes de actividad de la α -Amy en cada una de las fases superior e inferior de los SBAs, respecto de un control de la enzima en *buffer* Pi 50 mM a pH 7,00:

TABLA 3.14: Porcentajes remanentes de actividad α -Amy en las fases de los SBAs

<i>PEG</i>	% Actividad Fase superior				% Actividad Fase inferior			
	<i>2.000</i>	<i>3.350</i>	<i>6.000</i>	<i>8.000</i>	<i>2.000</i>	<i>3.350</i>	<i>6.000</i>	<i>8.000</i>
<i>T.L. 1</i>	67,12	65,64	67,58	54,27	57,39	58,21	54,58	55,20
<i>T.L. 2</i>	69,55	70,06	72,45	68,47	82,18	61,52	61,09	56,04
<i>T.L. 3</i>	74,94	73,85	76,68	74,15	92,48	62,00	64,65	56,65
<i>T.L. 4</i>	77,60	74,70	82,00	79,16	101,88	62,61	71,77	62,48

En la mayoría de los casos se produjo un efecto negativo de la presencia de las fases sobre la actividad enzimática, el cual no mostró correlación alguna con el peso molecular del PEG, pero si con la concentración de los componentes en las fases, recuperándose al concentrarse las mismas.

Además, en líneas generales, la actividad α -Amy se vio algo más afectada en las fases inferiores respecto de las superiores.

5. Calorimetría diferencial de barrido

5.1. Efecto del PEG en la desnaturalización térmica de la alfa-amilasa

En la figura 3.46 se muestran los termogramas obtenidos para la α -Amy sola y en presencia de PEG 2.000 y 8.000, a pH 7,00 y en la tabla a continuación (tabla 3.15) los parámetros del proceso de desnaturalización térmica:

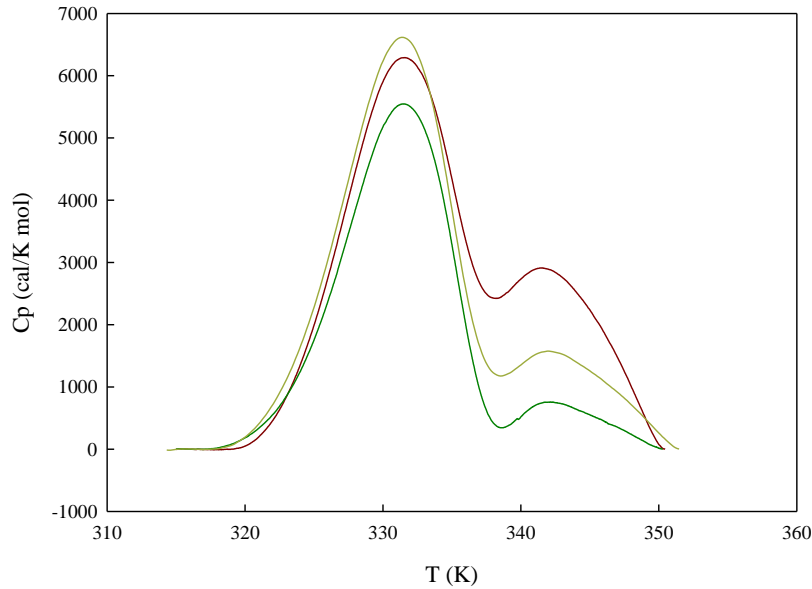


Figura 3.46: DSC de la α -Amy en ausencia de PEG (—) y en presencia de PEG 2.000 (—) y PEG 8.000 (—). Medio buffer Pi 50 mM, pH 7,00.

TABLA 3.15: Parámetros de la transición nativo-desnaturalizado de la α -Amy en presencia y ausencia de PEG, en medio buffer Pi 50 mM, pH 7,00

	T_m (K)		ΔH°_{cal} (cal/mol)	
	I^{ra} transición	2^{da} transición	I^{ra} transición	2^{da} transición
α -Amy	$331,35 \pm 0,01$	$342,99 \pm 0,02$	$6,63 \cdot 10^4 \pm 100$	$2,26 \cdot 10^4 \pm 100$
α -Amy/PEG 2.000	$331,05 \pm 0,01$	$344,17 \pm 0,08$	$5,38 \cdot 10^4 \pm 200$	$3,32 \cdot 10^3 \pm 100$
α -Amy/PEG 8.000	$330,99 \pm 0,03$	$344,1 \pm 0,1$	$6,71 \cdot 10^4 \pm 400$	$1,04 \cdot 10^4 \pm 400$

En todos los casos se obtuvieron dos transiciones correspondientes a dominios estructurales independientes de la α -Amy, ambos con T_m características y la primera con un ΔH°_{cal} superior respecto de la segunda. Esto permite suponer la existencia de intermediarios estables en el proceso de desnaturalización térmica de la enzima, tal como se evidenciaron en otras condiciones estudiadas (Sección I 5.3.1. R y D).

En ningún caso la presencia de PEG afectó los valores de T_m para la primera transición, aumentando en aproximadamente 1K para la segunda, respecto de la enzima sola.

En cuanto a las entalpías calorimétricas, la presencia de PEG afectó de manera más significativa al segundo dominio, requiriéndose el suministro de menos calor durante la desnaturalización. Esto sugiere que el PEG modificó la estructura del segundo dominio, haciendo a la enzima más sensible a la desnaturalización térmica. Es decir, se parte de una estructura con menos interacciones.

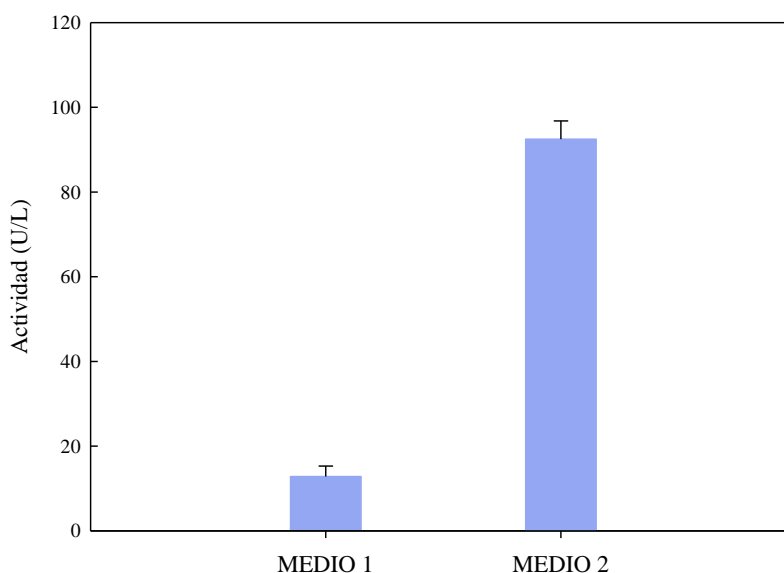
SECCIÓN III: Aplicación a fuentes naturales

1. Cultivo en lote de *Aspergillus oryzae*

1.1. Optimización de variables experimentales de cultivo

1.1.1. Composición del medio

En la figura 3.47 se muestra la actividad alfa-amilasa (U/L) en los filtrados de los cultivos cuyas composiciones corresponden a los medios 1 y 2 (tabla 2.5):



*Figura 3.47: Actividad alfa-amilasa (U/L) en los cultivos de *Aspergillus oryzae* en medios mínimos: MEDIO 1 (BÁSICO) y MEDIO 2 (OPTIMIZADO).*

El medio 2 fue el que arrojó mayor actividad enzimática y corresponde a una composición enriquecida en nutrientes respecto del medio 1.

1.1.2. Concentración de almidón en el medio optimizado

La figura 3.48 muestra la actividad alfa-amilasa recuperada en los cultivos con la composición del medio optimizado (medio 2) pero con concentraciones crecientes de almidón.

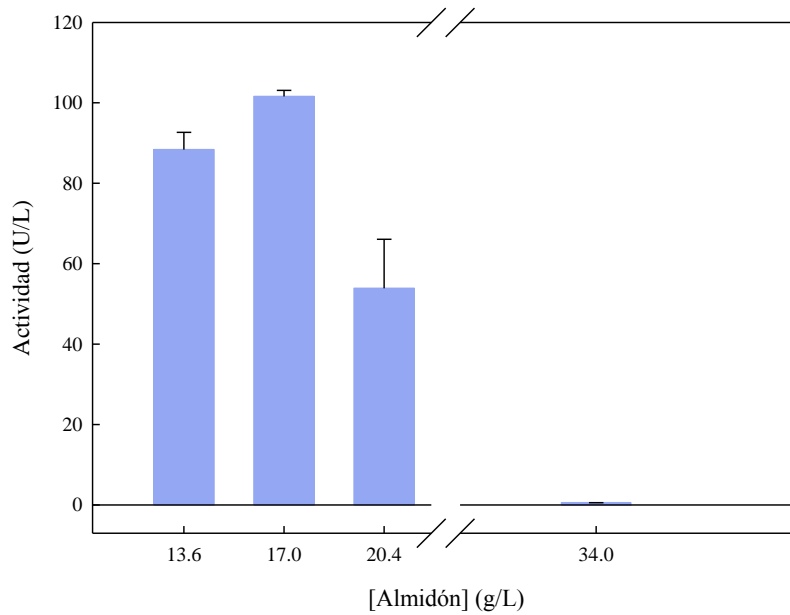


Figura 3.48: Actividad alfa-amilasa (U/L) vs. concentración de almidón (g/L) en los cultivos de *Aspergillus oryzae* en el medio 2.

La concentración óptima de almidón en el medio mínimo resultó ser 17 g/L. Concentraciones mayores de este polisacárido indujeron pérdida sustancial en la actividad alfa-amilasa, posiblemente debido a algún mecanismo de inhibición en la síntesis de esta enzima o regulación de la actividad enzimática por parte del microorganismo.

1.1.3. Productividad en el medio mínimo optimizado

En todo proceso, tanto a escala de laboratorio o industrial, el tiempo es una variable importante a tener en cuenta para diseñar un modelo óptimo de trabajo, siendo la productividad ($P_{\text{máx}}/\text{tiempo}$) uno de los parámetros más importantes para caracterizar el tiempo de obtención de un producto deseado ($P_{\text{máx}}$: cantidad máxima del producto de interés).

El perfil de productividad de alfa-amilasa ($\text{UL}^{-1}\text{días}^{-1}$) en el tiempo (días) obtenido en los cultivos de *Aspergillus oryzae* se representa en la figura 3.49:

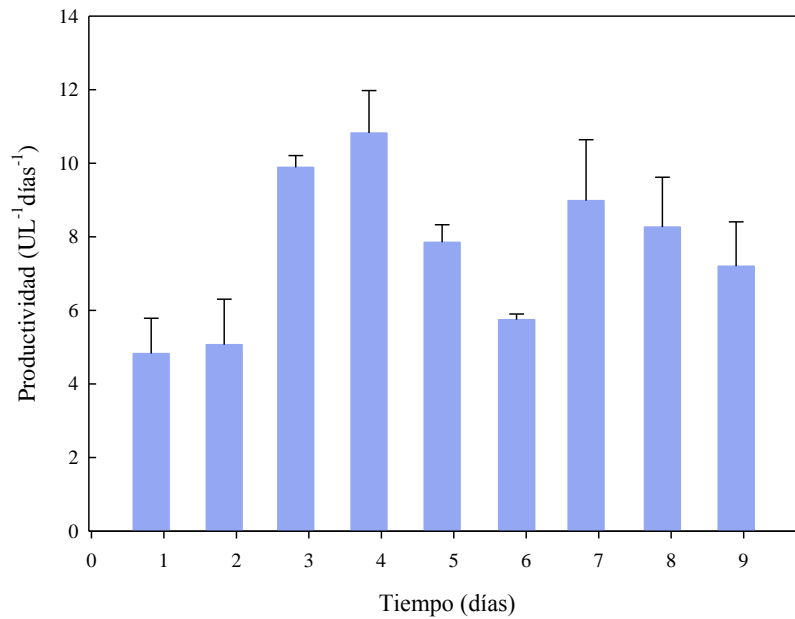


Figura 3.49: Productividad (UL⁻¹ días⁻¹) vs. tiempo (días). Composición del medio 2, concentración de almidón 17 g/L.

Se observaron dos estadios en el máximo de producción de alfa-amilasa: en el cuarto y el séptimo día de incubación. Se ha seleccionado el primero como punto final de incubación teniendo en cuenta, además de los beneficios prácticos, que evitar el envejecimiento del cultivo favorece la integridad de la enzima.

1.2. Empleo de fuentes alternativas de almidón en el medio mínimo optimizado

Uno de los desafíos en este trabajo de Tesis es el uso de desechos provenientes de diversas actividades productivas como fuente o material de partida para la obtención de alfa-amilasa.

Debido a nuestra ubicación geográfica, resultan accesibles los productos provenientes de la actividad agrícola (una de las actividades más explotadas en esta zona). Es por esto que se propuso emplear como fuente de almidón los productos de desecho recogidos en la cosecha del trigo.

En la figura 3.50 se muestra la actividad alfa-amilasa en los filtrados de los cultivos de *Aspergillus oryzae* preparados en base a desechos del trigo y con las composiciones de la tabla 2.6.

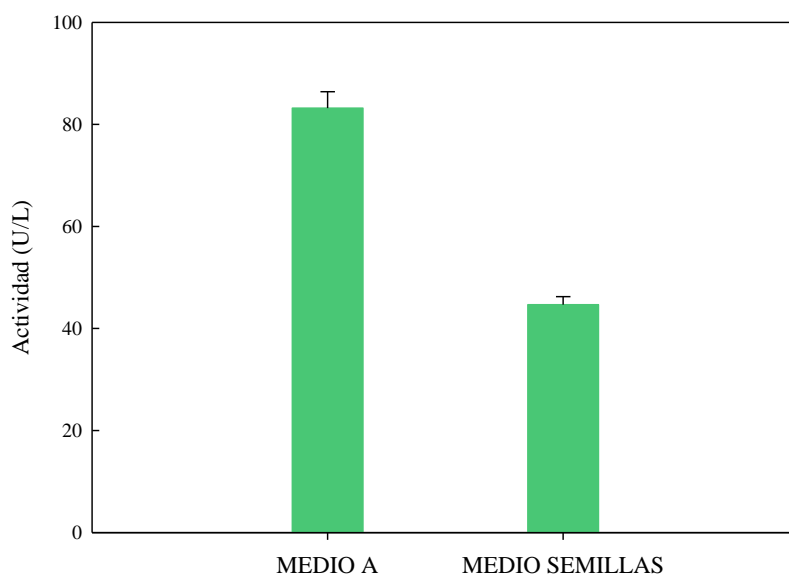
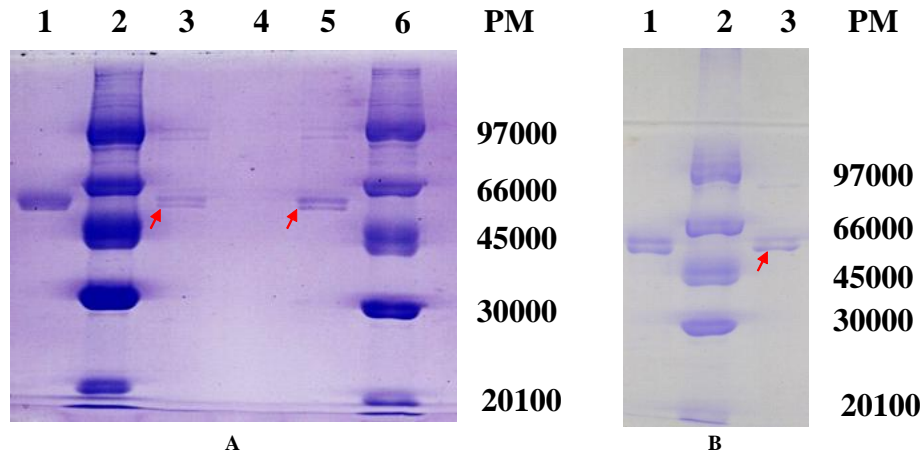


Figura 3.50: Actividad alfa-amilasa (U/L) en los cultivos de *Aspergillus oryzae*, composiciones de los medios A y SEMILLAS.

Tanto el medio A como SEMILLAS arrojaron una actividad enzimática significativa, casi comparables con el medio constituido con almidón en el primero de los casos. Esto demuestra la posibilidad de emplear fuentes alternativas de almidón para la obtención de alfa-amilasa a partir de cultivos sumergidos en lote de *Aspergillus oryzae*.

1.3. Análisis de pureza de la alfa-amilasa fúngica por SDS-PAGE

En la figura 3.51 se muestra la SDS-PAGE realizada para los filtrados de los diferentes medios de cultivo con almidón (GEL B) o fuentes alternativas de sustrato (GEL A).



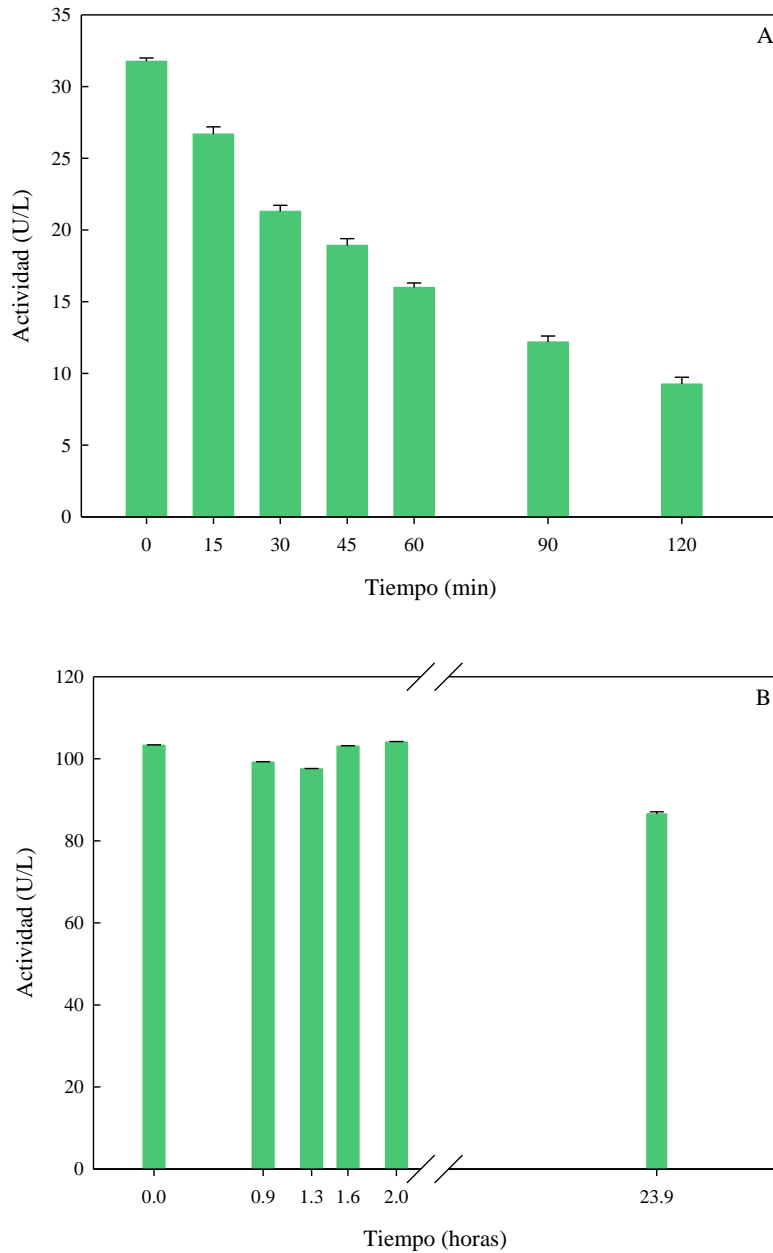
*Figura 3.51: SDS-PAGE de los cultivos de *Aspergillus oryzae*:*
GEL A: 1- Liofilizado comercial de α -Amy 2- Marcadores de PM 3- Filtrado medio semillas 5- Filtrado medio A 6- Marcadores de PM
GEL B: 1- Liofilizado comercial de α -Amy 2- Marcadores de PM 3- Filtrado medio 2

En todos los medios se detectó una banda principal de igual PM a la α -Amy comercial (50 kDa), lo cual corrobora la presencia de alfa-amilasa en los filtrados, tanto al emplear almidón o desechos del trigo como sustrato.

Por otro lado, dichos medios resultaron suficientemente libres de proteínas contaminantes, detectándose en todos los casos una banda tenue de mayor peso molecular que acompaña a la principal (99 kDa).

1.4. Análisis de la estabilidad catalítica de la alfa-amilasa fúngica

Se llevó a cabo un análisis de la estabilidad catalítica de la alfa-amilasa fúngica al pH final de los cultivos (7,00) y a pH ácido (3,00). Las medidas de actividad en el tiempo para ambos casos se muestran en la figura 3.52:



*Figura 3.52: Estabilidad de la alfa-amilasa en el cultivo de *Aspergillus oryzae* (medio semillas): Actividad (U/L) vs Tiempo. pH de incubación: 3,00 (A) y 7,00 (B). Temperatura 20°C.*

Estas gráficas nuevamente verifican la estabilidad de la alfa-amilasa a pH neutro, donde la actividad fue suficientemente constante durante todo el período de incubación y mantuvo el 85 %, aproximadamente, de la actividad inicial a las 24 hs.

Por el contrario, una pérdida gradual de actividad enzimática se detectó a pH ácido. Estos datos se ajustaron a una cinética de primer orden (figura 3.53) y de los parámetros de dicha regresión se obtuvo la constante cinética del proceso, k .

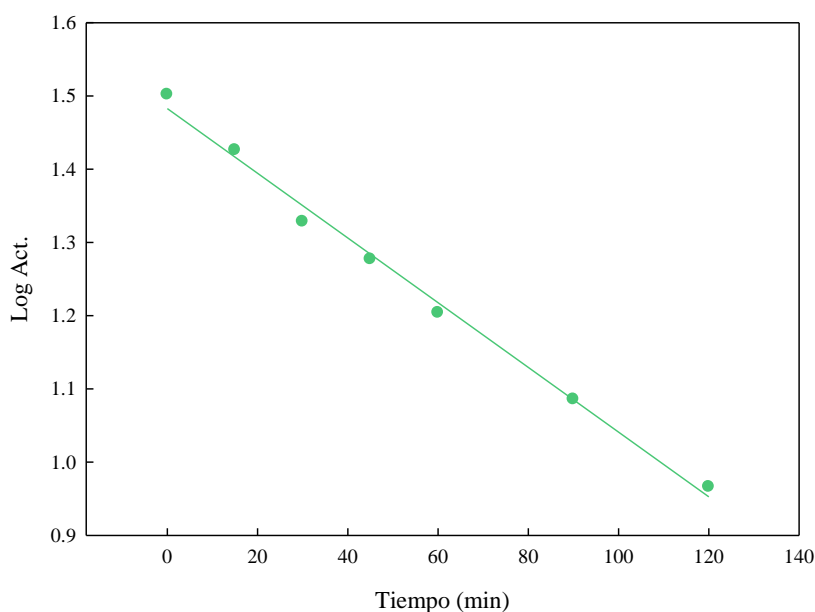


Figura 3.53: Cinética de inactivación de primer orden de la alfa-amilasa fúngica: Log actividad vs tiempo (min). pH 3,0. Temperatura 20°C.

El ajuste lineal de los datos experimentales arrojó una k igual a $4,4 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, algo menor que para la α -Amy comercial pero con el mismo patrón de inactivación (Sección I 5.1.2. R y D).

2. Precipitación con PAA de la alfa-amilasa de distintas fuentes naturales

2.1. Precipitación con PAA de la alfa-amilasa pancreática bovina

Siguiendo el mismo procedimiento que para la α -Amy comercial, se procedió a precipitar la alfa-amilasa del HPB con PAA 240.000.

A continuación se muestra la tabla de purificación (tabla 3.16) que describe dicho proceso:

TABLA 3.16: Tabla de purificación de la alfa-amilasa pancreática bovina en la precipitación con PAA 240.000: actividad, concentración de proteínas totales y actividad específica en cada fracción. Factor de purificación y rendimiento porcentual del proceso

	CONTROL	PP	SN
Actividad (U/L)	119,8 ± 0,3	105,7 ± 0,1	2,34 ± 0,04
[PT] (mg/L)	520 ± 4	310 ± 3	153 ± 2
Act. esp. (U/mg)	0,23	0,34	0,015
FP	1	1,48	0,077
R (%)	100	88,20	1,95

La actividad registrada en el PP superó ampliamente la del SN. Esto indica que en principio la metodología diseñada para la α -Amy comercial sería también aplicable a la enzima pancreática, con una marcada tendencia de la misma a precipitar.

Por otro lado, un FP de ~1,50 demuestra que esta metodología no es eficiente para purificar la alfa-amilasa a partir del HPB. En este caso la precipitación no fue específica para la enzima de interés, precipitando conjuntamente otras proteínas pancreáticas que posiblemente presenten características similares o que tengan un mismo estado de carga que la alfa-amilasa al pH de trabajo, por ejemplo, tripsina (Braia y col., 2.008)).

El R %, en cambio, fue elevado. Esto demuestra el potencial de esta metodología para recuperar y concentrar alfa-amilasa a partir del HPB.

2.2. Precipitación con PAA de la alfa-amilasa fúngica (*Aspergillus oryzae*)

Para llevar a cabo esta metodología se seleccionaron los filtrados de los medios 2 (sustrato: almidón) y A (sustrato: muestra A), ya que este último fue el que arrojó mayor producción de alfa-amilasa al emplear fuentes alternativas de almidón.

A continuación, la tabla de purificación correspondiente al proceso de precipitación:

TABLA 3.17: Tabla de purificación de la alfa-amilasa fúngica en la precipitación con PAA 240.000 y 100.000: actividad, concentración de proteínas totales y actividad específica en los precipitados redisueltos y controles. Factor de purificación y rendimiento porcentual del proceso

<i>Medio</i>	<i>Vol. PAA (μL)</i>	<i>[PAA] % P/P</i>	<i>Act. (U/L)</i>	<i>[PT] mg/L</i>	<i>Act. esp. (U/mg)</i>	<i>FP</i>	<i>R %</i>
PP PAA 240.000							
<i>A</i>	20	2,50	34,2 ± 0,2	753 ± 3	0,05	2,07	70,83
<i>2</i>	30	2,50	45,5 ± 0,1	710 ± 10	0,06	3,22	84,26
PP PAA 100.000							
<i>A</i>	10	3,50	35,3 ± 0,2	790 ± 14	0,05	2,03	73,01
<i>2</i>	50	0,35	33,99 ± 0,09	700 ± 40	0,05	2,46	62,94
	10	3,50	36,72 ± 0,07	880 ± 3	0,04	2,10	68,00
	30	3,50	34,19 ± 0,07	690 ± 20	0,05	2,51	63,31
CONTROLES							
<i>A</i>			48,3 ± 0,3	2.200 ± 55	0,02	1	100
<i>2</i>			54 ± 6	2.690 ± 20	0,02	1	100

Se alcanzaron rendimientos entre aproximadamente 60 - 85%, con factores de purificación entre 2 y 3. Es decir, poca pérdida enzimática, lo cual es deseable para un proceso extractivo inicial de concentración, y una purificación que es coherente con los bajos niveles de contaminantes que se hallaron en la muestra de partida.

En el último caso (precipitación con PAA 100.000, medio 2) se han mostrado varios resultados que evidencian la posibilidad de obtener una mejor purificación a expensas del rendimiento total del proceso y viceversa. La elección de un sistema u otro dependerá de los intereses de acuerdo a la utilidad ulterior del producto final.

3. Reparto en SBAs de la alfa-amilasa de distintas fuentes naturales

3.1. Reparto en SBAs de la alfa-amilasa pancreática bovina

Se procedió al reparto del HPB en los SBAs seleccionados con anterioridad, obteniéndose los coeficientes K_e y K_p que se detallan en la siguiente tabla:

TABLA 3.18: Coeficientes de reparto de actividad enzimática y proteínas totales en el HPB

	<i>Ke</i>	<i>Kp</i>
<i>PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3</i>		
<i>R1</i>	79 ± 3	$2,6 \pm 0,1$
<i>R3</i>	126 ± 5	$1,62 \pm 0,07$
<i>PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1</i>		
<i>R1</i>	$11,3 \pm 0,6$	$0,73 \pm 0,02$
<i>R0,33</i>	18 ± 1	$1,28 \pm 0,02$

El reparto de la alfa-amilasa en el HPB siguió la misma tendencia que la α -Amy comercial en el sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3, con *Ke* mayores a la unidad que indican que la alfa-amilasa se concentra en la fase rica en PEG.

En cambio, en el sistema PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 la tendencia se invirtió, dado que los coeficientes *Ke* fueron (aunque no en gran medida) mayores a la unidad, indicando que la alfa-amilasa pancreática se concentra en la fase polimérica, contrario a la enzima comercial que se repartía mayoritariamente hacia la fase salina (Sección II 1.1. R y D).

Por otro lado, los valores de *Kp* describen el reparto de todas las proteínas presentes entre las fases del sistema, incluyendo tanto la alfa-amilasa como aquellas que representan impurezas. En este caso todos fueron cercanos a la unidad, lo cual sugiere que el total de proteínas del HPB no sigue una tendencia definida hacia una de las fases sino que se reparte de manera equitativa entre la superior e inferior.

La tabla 3.19 presenta los valores de actividad específica, FP y R% logrados en cada caso:

TABLA 3.19: Tabla de purificación de la alfa-amilasa pancreática bovina. Actividad específica, factor de purificación y rendimiento

	<i>Act. esp. (U/mg)</i>	<i>FP</i>	<i>R %</i>
<i>Sistema PEG 2.000–fosfato de potasio/T.L. 3/R 1</i>			
<i>Fase superior</i>	0,20	1,41	58,90
<i>Fase inferior</i>	0,001	0,008	0,12
<i>Sistema PEG 2.000–fosfato de potasio/T.L. 3/R 3</i>			
<i>Fase superior</i>	0,19	1,38	78,25
<i>Fase inferior</i>	0,001	0,007	0,09
<i>Sistema PEG 8.000–fosfato de potasio/T.L. 1/R 1</i>			
<i>Fase superior</i>	0,12	0,85	26,55
<i>Fase inferior</i>	0,006	0,04	1,87
<i>Sistema PEG 8.000–fosfato de potasio/T.L. 1/R0,33</i>			
<i>Fase superior</i>	0,08	0,60	12,69
<i>Fase inferior</i>	0,005	0,03	1,70
<i>CONTROL DE HPB</i>			
<i>HPB</i>	0,14	1	100

Los sistemas PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 no han alcanzado las expectativas previstas para el aislamiento de la alfa-amilasa a partir del HPB. En estos sistemas, el reparto de la enzima pancreática no resultó eficiente como el de la enzima comercial reflejando un comportamiento diferente, ya que invirtieron la tendencia a concentrarse en la fase inferior y no fue posible separarla de las proteínas contaminantes ($FP < 1$).

En los sistemas PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3, en cambio, se logró concentrar la alfa-amilasa en la fase superior con un rendimiento suficientemente alto para ambas relaciones de volúmenes, aunque la purificación no resultó óptima.

3.2. Reparto en SBAs de la alfa-amilasa de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*)

Nuevamente se seleccionaron los filtrados de los medios 2 (sustrato: almidón) y A (sustrato: muestra A) para el reparto en los SBAs seleccionados previamente.

Los valores de K_e y K_p obtenidos en los repartos se detallan en la tabla 3.20, junto con los volúmenes de fases registrados luego de alcanzado el equilibrio de partición y su consiguiente **R**. A continuación, la tabla de purificación correspondiente (tabla 3.21):

TABLA 3.20: Volúmenes de fases, relación de volúmenes (**R**), coeficientes de reparto de actividad enzimática y de proteínas totales obtenidos en el reparto de la enzima fúngica

Volumen Fase sup.(mL)	Volumen Fase inf. (mL)	R	Ke	Kp
PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 - MEDIO 2				
3,75	4,75	0,79	175 ± 6	3,02 ± 0,09
PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 - MEDIO A				
4,00	4,50	0,89	230 ± 10	4,62 ± 0,08
PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 - MEDIO 2				
3,50	5,25	0,67	1,00.10 ⁻² ± 3.10 ⁻⁴	1,23 ± 0,04
PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 - MEDIO A				
4,00	5,00	0,80	5,00.10 ⁻² ± 3.10 ⁻⁴	1,34 ± 0,04

TABLA 3.21: Tabla de purificación para el reparto de la enzima fúngica. Actividad específica, factor de purificación y rendimiento

	Act. esp. (U/mg)	FP	R (%)
Sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 - MEDIO 2			
Fase superior	1,11.10 ⁻²	1,14	78,82
Fase inferior	2,56.10 ⁻⁵	0,003	0,08
Sistema PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3 - MEDIO A			
Fase superior	2,38.10 ⁻²	1,36	98,99
Fase inferior	3,19.10 ⁻⁵	0,002	0,04
Sistema PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 - MEDIO 2			
Fase superior	8,85.10 ⁻⁵	0,009	0,40
Fase inferior	6,83.10 ⁻³	0,71	37,94
Sistema PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1 - MEDIO A			
Fase superior	8,76.10 ⁻⁴	0,05	2,27
Fase inferior	9,36.10 ⁻³	0,53	22,66
CONTROLES			
Medio 2	9,68.10 ⁻³	1,00	100
Medio A	1,75.10 ⁻²	1,00	100

En este caso la alfa-amilasa siguió la misma tendencia general de reparto que la enzima comercial (Sección II 1.1. R y D): en los sistemas PEG 2.000 se concentró preferencialmente en la fase polimérica ($Ke > 1$) y en los sistemas PEG 8.000 en la fase salina ($Ke < 1$). Cabe destacar en este punto que tanto la enzima empleada en este caso como la comercial provienen de un origen en común: un cultivo del hongo filamentoso *Aspergillus oryzae*.

En los sistemas formados con PEG 8.000 los coeficientes Kp resultaron cercanos a la unidad, con lo que se deduce un reparto bastante equitativo para la totalidad de

proteínas entre ambas fases. En los sistemas con PEG 2.000, en cambio, fueron algo mayor, lo que sugiere cierto desplazamiento hacia la fase superior para el reparto de las proteínas totales.

La tabla de purificación 3.21 muestra que los sistemas PEG 8.000 no resultaron eficaces tanto en la purificación (con valores de FP menores a uno) como en el rendimiento (en ninguno de los casos superó el 40%). En cambio, los sistemas PEG 2.000 arrojaron rendimientos suficientemente elevados y factores de purificación bajos.

Cabe destacar que los filtrados de los cultivos fúngicos son muestras muy limpias, como evidencian las electroforesis (figura 3.51) y con menor contenido en contaminantes que el HPB, con lo cual no son esperables FP elevados; es decir un valor de aproximadamente de 1,4 (como se obtuvo en el medio A) puede resultar aceptable.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES



CAPÍTULO 4: Conclusiones

En la actualidad, el desarrollo de tecnologías compatibles con la protección del medio ambiente demanda una mayor producción de catalizadores biológicos para ser empleados en numerosos procesos a nivel industrial. Las enzimas juegan un rol fundamental en la determinación de la eficiencia y rapidez de las reacciones donde participan. Además, por ser biodegradables, su empleo tiene un menor impacto sobre el medio ambiente. Esto ha impulsado la búsqueda y el desarrollo de nuevas técnicas para la obtención de estas macromoléculas a gran escala.

En el presente trabajo se desarrollaron dos metodologías de concentración y purificación de la enzima **alfa-amilasa**: por **formación de complejos insolubles con poliacrilatos de sodio** y por **reparto en sistemas bifásicos acuosos PEG-fosfato de potasio**. Ambas emplean polímeros de cadena flexible, la primera con carga eléctrica neta o polielectrolitos y la segunda sin carga. Estas metodologías serán adecuadas si la enzima conserva su actividad catalítica y es estable en el medio y bajo las condiciones a las cuales es sometida. En principio, estas técnicas se estudiaron empleando una enzima comercial de origen fúngico, para luego aplicarlas sobre extractos naturales donde la enzima se encuentra impura y/o en bajas concentraciones.

Una de las fuentes enzimáticas empleada fue un homogeneizado de páncreas bovino, el cual también es fuente de otras enzimas digestivas, además de alfa-amilasa. El mismo se trata de un extracto de composición compleja, donde la enzima está en presencia de gran cantidad de impurezas y contaminantes. Además, se empleó un cultivo en lote de *Aspergillus oryzae*, productor natural de alfa-amilasa extracelular, promoviéndose la producción de alfa-amilasa bajo condiciones específicas del medio y sustratos, empleando, además, residuos agrícolas como fuente de polisacáridos para tal fin.

Como punto de partida, se evaluó la composición (por SDS-PAGE) de la enzima fúngica comercial. Los resultados indicaron que la muestra posee un elevado grado de pureza en la α -Amy, lo cual la hace adecuada para los ensayos ulteriores.

En primer lugar nos focalizamos en la metodología de precipitación con PEs. En particular, estos polímeros cargados poseen grupos laterales ionizables y un esqueleto hidrocarbonado. La hidrofobicidad de éste induce una atracción entre los monómeros la cual compite con las fuerzas coulómbicas de repulsión electrostática entre cargas del mismo signo. Los complejos resultantes de la interacción entre PEs y proteínas (que

también combinan porciones hidrofóbicas con grupos cargados) exhiben una conducta compleja que podría provocar la separación de fases, cambios conformacionales, estabilización o desestabilización de la estructura terciaria de la proteína y, en algunos casos, su agregación. A pesar de las consideraciones teóricas para comprender los mecanismos moleculares que condicionan la formación y la conducta de estos complejos en solución, muchas cuestiones quedan sin respuesta. Esto le confiere a estos sistemas un análisis con un carácter fuertemente empírico y basado en resultados experimentales.

Para abordar el estudio de los complejos α -Amy/PAA, en primer lugar se evaluaron las condiciones bajo las cuales estos precipitan y se redisuelven y la influencia de variables experimentales sobre los diagramas de fase de los mismos. Se ensayaron tres PAA de diferentes pesos moleculares: 5.000, 100.000 y 240.000 Da.

Las curvas de titulación turbidimétricas permitieron evaluar la capacidad precipitante de estos polímeros y obtener la estequiometría de cada uno de los complejos. Independientemente del PM del PAA, sólo a pH 3,00 se observó la formación de complejos insolubles. Esto estaría relacionado con el estado de carga de la proteína a dicho pH: dado que presenta un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,20, la enzima presentaría exceso de carga positiva e interaccionaría con el PAA el cual es fuertemente aniónico. Excepto para el PAA 5.000 (donde se observó un mecanismo de saturación hiperbólico) las curvas con PAA 100.000 y 240.000 alcanzaron saturación a través de un comportamiento sigmoideo. Esto significa que es necesario que se alcance una relación molar crítica para luego favorecer la interacción entre partículas de complejo soluble y formarse agregados macroscópicos de mayor tamaño. Por otro lado, a medida que disminuye el PM del PAA se observó una menor turbidez en las curvas, lo cual estaría indicando un menor tamaño o número de complejos formados. En este sentido, se descartó al PAA de menor PM (5.000) como posible precipitante de la α -Amy, dado la baja turbidez alcanzada y porque la estequiometría del complejo resultó inversa a la esperada para un agente precipitante: varios moles de PAA por mol de α -Amy (6:1).

El PAA 240.000, en cambio, dio lugar a complejos con mayor número de moles de enzima unidos por mol de polímero, tanto por técnicas turbidimétricas (1:154) como calorimétricas (1:476), respecto al PAA 100.000 (1:52) por turbidez y 1:137 por calorimetría). Al calcular la estequiometría por mol de monómero de acrilato se observó

que las diferencias no son muy significativas entre los PAA de diferentes pesos moleculares: según las titulaciones turbidimétricas 0,046 o bien 0,037 n α -Amy/n monómero, para PAA 240.000 y 100.000, respectivamente. Según ITC 0,1408 o 0,097 n α -Amy/n monómero, para PAA 240.000 y 100.000, respectivamente. Estos resultados indicarían que el mayor poder precipitante del PAA 240.000 está relacionado con el mayor número de subunidades monoméricas. Cabe destacar que las diferencias encontradas en las “*e*” por turbidez e ITC tienen que ver con la diferente naturaleza de estas técnicas, presentando la última mayor sensibilidad, dado que mide directamente el calor a presión constante absorbido o liberado durante la interacción.

Los diagramas de fase permitieron determinar el rango de pH en el cual estos complejos son solubles o insolubles, verificándose, en todos los casos, la independencia de este rango con la concentración de polímero. Los complejos fueron insolubles a pHs ácidos y alcanzaron un máximo de turbidez nuevamente alrededor de 3,00. Por encima de 4,00 (PAA 240.000) o 5,50 (PAA 100.000) los complejos se redisolieron por completo. Esta información nos permitió seleccionar los pHs óptimos de precipitación (3,00) y redisolución (6,00) de los complejos, a tener en cuenta para las experiencias subsiguientes.

La formación de complejos donde los componentes poseen cargas opuestas presentan una alta interacción coulombica, la cual es muy sensible a la presencia de iones en el medio. Esto hace que sea predecible la disociación completa de los complejos al aumentar la fuerza iónica del medio. Sin embargo, para estos sistemas una fuerza iónica elevada no fue suficiente para disociarlos, modificando sensiblemente el mecanismo de formación de los mismos y advirtiendo una interacción de naturaleza mixta (con características electrostáticas pero con aporte hidrofóbico).

Una herramienta muy útil para evaluar esta interacción es ITC, la cual permite identificar la naturaleza exotérmica o endotérmica de la misma. Estas titulaciones evidenciaron que la reacción de *binding* entre la enzima y el PAA se ajusta a un modelo de sitios independientes y equivalentes y que la interacción es exotérmica, con liberación de calor durante la reacción. Si bien los ΔH° fueron negativos, los valores positivos de ΔS° sugieren que la interacción es de naturaleza mixta. Aparentemente, el efecto de desestructuración del agua durante el proceso de formación de los complejos es más importante que el ordenamiento provocado por el propio *binding*. Todo esto indica que este proceso está conducido tanto entálpica como entrópicamente. Por otro

lado, las constantes de afinidad del equilibrio de unión mostraron mayor afinidad de la enzima por el PAA de mayor PM.

Los resultados de ITC obtenidos a elevada fuerza iónica nuevamente demostraron que la misma no es suficiente para la redisolución completa de los complejos insolubles. Las ITC con ambos PAA en NaCl 1 M mostraron que, si bien tanto la relación molar, afinidad y ΔH° se ven afectados por la fuerza iónica, en ningunos de los casos la formación de los complejos se inhibió por completo, permitiendo afirmar una interacción de naturaleza mixta con contribución tanto electrostática como hidrofóbica.

Por otra parte, los ensayos cinéticos mostraron que la formación de estos complejos es rápida, requiriéndose pocos segundos para alcanzar una turbidez máxima.

Con el fin de analizar el efecto de la interacción con PAA sobre la estructura de la α -Amy, se llevó a cabo un estudio espectroscópico de absorción UV-Vis, emisión de fluorescencia y dicroísmo circular de la enzima en ausencia y presencia de distintas cantidades de estos polielectrolitos.

Los espectros de absorción UV-Vis arrojaron pequeños cambios en cuanto a la intensidad y la longitud de onda del máximo de absorción, respecto de la enzima sola. Por un lado, la presencia de PAA disminuyó el máximo de absorción (efecto hipocrómico) y lo desplazó hacia mayores λ (efecto batocrómico). Esto podría vincularse con modificaciones en la polaridad del entorno de los cromóforos proteicos, posiblemente por reestructuraciones inducidas por los polielectrolitos. No obstante, en ninguno de los casos se pueden inferir cambios estructurales sustanciales de la α -Amy a nivel de su conformación tridimensional.

Los espectros de emisión de F exhibieron I_f menores al aumentar la concentración de PAA, sin corrimientos significativos en el $\lambda_{m\acute{a}x}$ en el caso del PAA 240.000 y un leve desplazamiento hacia el rojo del espectro para PAA 100.000. Estos corrimientos hacia mayores λ se relacionan con un entorno más polar de los fluoróforos intrínsecos proteicos, posiblemente por reordenamientos estructurales que originan una sobreexposición de los mismos al solvente. Esto significa que la estructura tridimensional de la enzima en el microentorno de los triptófanos no se halla afectada de manera significativa para el caso del PAA 240.000 y presenta leves sobreexposiciones al solvente en el caso del PAA de menor PM. Por otro lado, la disminución en las $I_{f_{m\acute{a}x}}$ se relacionó con efectos de *quenching* del PAA sobre los fluoróforos intrínsecos de la

α -Amy. Las gráficas lineales de Stern Volmer indicaron la existencia de una única población de triptófanos, todos con igual exposición al solvente. Además, en todos los casos se obtuvieron $\lambda_{\text{máx}}$ que se correlacionan con residuos de Trp internos de la proteína.

Los espectros de DC sugirieron la existencia de estructuras secundarias alfa-hélice y láminas beta combinadas a lo largo de la cadena polipeptídica de la enzima, cuyo contenido se ve reducido ante la presencia de PAA debido a la menor intensidad de los picos. De todas formas, en ninguno de los casos los espectros se vieron distorsionados de manera muy importante, con lo cual podríamos suponer cambios menores en la estructura secundaria de la proteína.

En lo que se refiere a la estabilidad catalítica de la α -Amy, la misma mostró ser estable a pH 6,00 (tanto en presencia como en ausencia de PAA). A su vez, la actividad con PAA 240.000 fue, en todos los tiempos medidos, mayor que la actividad de la enzima sola, lo cual podría relacionarse con cambios estructurales de la enzima en las proximidades del sitio activo que producen exaltación de su actividad biológica. Para PAA 100.000, en cambio, las variaciones en la actividad enzimática fueron menos significativas.

Esto último, junto con los resultados de fluorescencia anteriormente descritos, sugieren que el PAA 240.000 y 100.000 inducen cambios estructurales en la enzima que conciernen a distintas zonas de la misma. El PAA de mayor peso molecular afecta principalmente regiones próximas al sitio activo, mientras que el PAA de menor peso molecular las áreas más próximas a los triptófanos de la proteína.

Al analizar la estabilidad de la enzima a pHs ácidos se observó que la misma se inactiva a pH 3,00 mediante un proceso que tiene una cinética de primer orden. Ambos PAA mostraron un claro efecto protector a pH ácido, más pronunciado para el polielectrolito de mayor peso molecular, atenuando la caída exponencial de actividad catalítica. Esto fue verificado por los valores de las constantes de velocidad obtenidas para dicho proceso de inactivación, las cuales fueron menores en presencia de los polielectrolitos.

La estabilidad a pH neutro, inestabilidad a pH ácido y el efecto estabilizante del PAA sobre la α -Amy recién mencionados, ensayados por medidas de actividad catalítica, también fueron verificados a través de espectroscopía de DC. En este sentido, los espectros de DC de la enzima incubada en *buffer* a pH 6,00 no se vieron alterados,

mientras que a pH 3,00 se observó un proceso gradual de desnaturalización, el cual nuevamente fue atenuado ante la presencia de los polielectrolitos. Más aun, el PAA de mayor peso molecular demostró tener mayor efecto estabilizador. Esto nos permitió relacionar la pérdida de actividad catalítica a pH 3,00 con la desestructuración a nivel secundario de la enzima y vincular el efecto de estabilización del PAA con dicho nivel de estructuración.

Al evaluarse la estabilidad térmica de la α -Amy por DSC se observó que a pH 6,00 la enzima se desnaturaliza a través de un proceso que involucra dos transiciones, posiblemente debido a dos dominios de desnaturalización, sugiriendo la existencia de intermediarios estables. A pH 3,00, en cambio, los termogramas mostraron un efecto térmico muy diferente, casi sin distinguirse las transiciones recién mencionadas. Esto sugiere que la enzima en un medio de elevada acidez parte desde un estado parcial o casi totalmente desnaturalizado, invalidando el análisis de los parámetros de desnaturalización térmica a pHs ácidos.

La presencia de PAA en los termogramas de DSC no alteró el patrón de desnaturalización térmica de la enzima, observándose dos transiciones al igual que para la α -Amy sola. Además, estos polielectrolitos redujeron en sólo 2K, aproximadamente, la T_m de la primera transición, no afectando a la segunda. Los ΔH°_{cal} de ambas transiciones, en cambio, aumentaron ante la presencia de los polielectrolitos, reflejando una estructura más compacta de la α -Amy o mayor número de interacciones ante la presencia de los PAA.

Al analizar la reversibilidad de este proceso de desnaturalización térmica, se observó que la segunda transición es reversible en un porcentaje elevado, mientras que la primera transición tiene un fuerte carácter irreversible. Esto indica que durante la desnaturalización inducida por T están involucrados procesos irreversibles. Esto mismo se verificó por las variaciones observadas en T_m con la velocidad de calentamiento, las cuales fueron mucho más significativas para la primera transición que para la segunda. Todo esto sugiere que el proceso global es parcialmente reversible y está controlado cinéticamente, no admitiendo un análisis termodinámico. El ajuste de la primera transición al modelo de desnaturalización de dos estados irreversibles se logró a velocidades de barrido elevadas, donde los procesos reversibles se ven disminuidos, permitiendo obtener la energía de activación y la T^* asociadas al proceso. Estos

parámetros no se modificaron ante la presencia de PAA, es decir, los polielectrolitos no alteran la cinética de las transiciones.

Por otro lado, al analizar el efecto de la concentración de α -Amy en las transiciones mencionadas, se observó que las T_m no variaron de manera relevante. Esto da lugar a suponer que los procesos irreversibles involucrados no están asociados con cambios en el estado de oligomerización de la enzima, o bien el proceso de desnaturalización térmica va acompañado de disociación seguida de agregación y precipitación, procesos que compensan T_m dado que derivan en cambios opuestos en su valor.

Una vez conocidas las condiciones de precipitación y redisolución de los complejos α -Amy/PAA, los factores influyentes en la formación de los mismos, el estado estructural, funcionalidad y estabilidad de la enzima al interactuar con los polielectrolitos, se procedió a diseñar un modelo de precipitación de α -Amy con PAA, el cual consistió en los siguientes pasos:

1. Adición de PAA sobre una solución de α -Amy en *buffer* Pi 50 mM, pH 3,00, hasta alcanzar relaciones molares superiores a la “e”.
2. Incubación a 8°C durante 30 min.
3. Centrifugación 5 min a 1.373xg.
4. Separación de precipitado y sobrenadante.
5. Redisolución del precipitado en *buffer* Pi 50mM, pH 6,00.
6. Determinación de proteínas y actividad alfa-amilasa en el PP y SN.

Cabe destacar que se han seleccionado las relaciones molares de precipitación que arrojaron los resultados más satisfactorios en cuanto a porcentaje de enzima recuperada. Por otro lado, la incubación en frío resultó favorable para estos sistemas dada la naturaleza exotérmica de la interacción, además de favorecer la precipitación de los complejos. Por último, la redisolución en ausencia de sal agregada se fundamenta en la poca efectividad del NaCl para perturbar la interacción y redissolver los complejos insolubles, verificado tanto por ITC como a través de las curvas de titulación turbidimétricas.

Los resultados indicaron una fuerte tendencia de la α -Amy a precipitar, con un rendimiento del 73,79 % y 64,26 % para PAA 240.000 y 100.000, respectivamente. Esto indica que ambos polielectrolitos son potenciales precipitantes de esta enzima y

podrían emplearse para la concentración y purificación de α -Amy a partir de extractos naturales.

Dado que la enzima es sometida a pHs ácidos durante este diseño experimental, se decidió seguir la cinética de inactivación a pH 3,00 de los complejos α -Amy/PAA en la forma precipitada, es decir, luego de aplicar la metodología de precipitación hasta el ítem 4. Los resultados nuevamente se ajustaron a una cinética de inactivación de primer orden, con constantes de velocidad de inactivación menores que para el caso de la enzima sola a pH 3,00, lo cual indica que la enzima es más estable en la forma precipitada con PAA que en ausencia de los polielectrolitos o en presencia de los PEs pero sin precipitar. Por otro lado, el PAA 240.000 nuevamente arrojó menores constantes de inactivación, es decir, estabiliza aún más a la enzima respecto del PAA 100.000. Estos resultados se deben tener en cuenta a la hora de resuspender los precipitados, dado que minimizar ese tiempo mejora los rendimientos totales del proceso.

Por último se analizó el estado funcional de la enzima en el precipitado redisolto, luego de ser sometida a la metodología diseñada. Esto se llevó a cabo a través de mediciones de actividad catalítica a distintos períodos de incubación luego de la redisolución de los complejos y permitió observar que la actividad enzimática se va recuperando en el tiempo.

Hasta este momento podemos concluir que esta metodología bioseparativa por formación de complejos insolubles α -Amy/PAA ha arrojado resultados promisorios en cuanto a la estabilidad y rendimiento de la enzima, usando como punto de partida una muestra que posee la proteína casi pura (enzima comercial).

En la siguiente etapa del proyecto se empleó una metodología, que también involucra el uso de PCF, para lograr concentrar y purificar alfa-amilasa a través de SBAs formados por PEG-fosfato de potasio. Estos sistemas son el resultado de mezclar el polímero y la sal por encima de cierta composición crítica, dando lugar a dos fases inmiscibles. La separación de dos o más solutos a través de esta metodología dependerá de sus diferencias en el comportamiento de reparto entre ambas fases: cuanto más difieran mejor resultará la separación. Existen esencialmente dos posibilidades para mejorarla: (a) modificando las propiedades de las fases; y (b) modificando las propiedades de los solutos a separar. De todas formas, existe un elevado carácter empírico en el desarrollo de los procedimientos de extracción utilizando SBAs, por lo

tanto el diseño de un método eficiente para la obtención de un soluto en particular dependerá de nuestra capacidad para manipular el comportamiento de reparto del analito de interés y de aquellos otros que representen impurezas.

El primer objetivo en esta etapa del trabajo fue evaluar la influencia del PM del PEG, temperatura y composición de las fases sobre el proceso de reparto de la α -Amy.

Los coeficientes de reparto de actividad enzimática, K_e , mostraron la siguiente tendencia general: en los sistemas formados con PEG 2.000 la enzima se concentra mayoritariamente en la fase rica en PEG (fase superior), mientras que para los otros PM en la fase salina (fase inferior). Además, este comportamiento se repitió para las dos T ensayadas.

El comportamiento de reparto de un soluto en SBAs podría estar gobernado por procesos de interacción entre el soluto y el polímero o bien por efectos del volumen excluido por este último. Ambos darían lugar a comportamientos opuestos: mientras que el primero favorece la concentración del soluto en la fase polimérica, el segundo impulsa su expulsión hacia la fase salina por impedimentos estéricos. Al aumentar el PM molecular del PEG en los sistemas ensayados se observó que los valores de K_e disminuyeron (principalmente entre PEG 2.000 y 3.350). Esto permite suponer que el efecto del volumen excluido sería un factor determinante en el reparto de la α -Amy a medida que la masa molecular del PEG se incrementa y por lo tanto la enzima dispone de menos solvente para estabilizarse en la fase superior. Para el PEG 2.000, en cambio, la enzima se estabilizaría en la fase polimérica por efectos de interacción que predominarían sobre la exclusión provocada por el PEG.

Las funciones termodinámicas del reparto indicaron que este es un proceso exotérmico (ΔH° negativos) que cursa con ordenamiento del sistema (ΔS° negativos), en la mayoría de los casos ensayados, lo cual sugiere que el proceso en general está conducido entálpicamente. Esto podría deberse a interacciones electrostáticas específicas entre el PEG y la α -Amy o a un ordenamiento de las moléculas de agua con formación de enlaces. Sin embargo, los ensayos de ITC entre la enzima y el PEG 2.000 indicaron que esta interacción es predominantemente endotérmica con características hidrofóbicas, lo cual sugiere que la segunda de las opciones sería la más factible para estos sistemas. Además, se obtuvo un patrón lineal de compensación entrópico-entálpico, lo cual evidencia la importante participación del solvente en el mecanismo de transferencia de la enzima. Por otro lado, al aumentar el PM del PEG tanto el aporte

entálpico como entrópico tendieron a disminuir, llegando a invertir su signo en algunos casos. Esto podría deberse a que el estado de ordenamiento de los sistemas de PEG de diferentes masas molares es diferente y la transferencia de la enzima desde la fase inferior a la superior se produce con menor ordenamiento.

Al evaluar la eficiencia del reparto a través de los Y % se obtuvieron resultados muy satisfactorios para muchos de los sistemas ensayados. Algunos de ellos fueron seleccionados para continuar con los estudios de optimización de variables experimentales: **PEG 2.000-fosfato de potasio/T.L. 3** y **PEG 8.000-fosfato de potasio/T.L. 1**. A pesar que otros sistemas también dieron rendimientos porcentuales en el orden del 98 - 99 %, estos dos se eligieron, además, por ser PM y T.L. extremos, donde se observaron comportamientos de reparto opuestos.

Para optimizar el reparto de la α -Amy se realizaron ensayos complementarios modificando otros factores que pueden afectarlo: agregado de una sal inerte (NaCl) y variación en la relación de volúmenes (**R**) entre las fases.

El incremento en la concentración salina no resultó favorable en ninguno de los sistemas. Esto podría deberse al desorden que produce las sales en las moléculas de agua estructurada que se hayan alrededor de las regiones hidrofóbicas del PEG y de la enzima, afectando el aporte entrópico del reparto, que en sí ya era desfavorable.

Al variar **R** se observó que a menor volumen de la fase polimérica, es decir, al disminuir la relación de volúmenes entre las fases, los rendimientos porcentuales mejoran en la fase inferior. Esto significa que se favorece la transferencia de la enzima desde la fase superior a la inferior, lo cual podría deberse a efectos del volumen excluido por el PEG. Esto favorece al reparto de la enzima en los sistemas con PEG 8.000, pero resulta inconveniente para los SBAs con PEG 2.000.

Al analizar la naturaleza de la interacción entre α -Amy y PEG 2.000 por ITC se observó, tal como se mencionó anteriormente, que la interacción es endotérmica y se ajusta a un modelo de fijación de sitios independientes y equivalentes, con un valor de n de $1,68 \pm 0,02$. La magnitud del ΔH° como también el valor de k se relacionan con una interacción débil. El ΔS° también fue positivo, es decir que la reacción de fijación transcurre con un aumento en el desorden del sistema, lo cual implica que el desorden generado en las moléculas de agua predomina sobre el ordenamiento que genera la fijación. Todo esto sugiere que la interacción α -Amy/PEG 2.000 es de naturaleza principalmente hidrofóbica.

El análisis estructural de la α -Amy en las fases se llevó a cabo a través de espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular.

Los espectros de emisión de F nativa de la enzima resultaron más afectados ante la presencia de las fases inferiores en comparación con las superiores, evidenciado por una mayor disminución en la $I_{f_{\text{máx}}}$ y un mayor corrimiento del máximo hacia longitudes de onda superiores, respecto de la enzima en *buffer*. Estos resultados indican leves cambios estructurales de la proteína (al menos en el entorno de los triptófanos) cuando se encuentra disuelta en las fases de los SBAs. Estos corrimientos hacia el rojo de los $\lambda_{\text{máx}}$ indican un entorno más polar de los Trp por cambios estructurales que producen una mayor exposición de dichos aminoácidos al solvente. De todas formas, aunque la estructura proteica podría estar más desplegada, el rango de longitudes de onda del máximo de emisión indicó que los triptófanos se encuentran en el interior de la proteína y no expuestos en su superficie.

La extinción de F con acrilamida se ajustó a un modelo de *quenching* de “esfera de acción”. Los valores de K_D arrojados por este ajuste demostraron que la difusión del *quencher* hacia el fluoróforo o bien la afinidad entre ellos es menor en las fases superiores respecto de la enzima en *buffer*, situación que no se observa en las fases inferiores. Los volúmenes de la esfera de acción indicaron que existe una mayor región alrededor de los Trp con probabilidad de *quenching* unitaria para la enzima disuelta en ambas fases en relación a la enzima en *buffer*. Esto último estaría relacionado con una estructura más desplegada de la enzima (en la proximidad de los Trp), lo cual coincide con los corrimientos del $\lambda_{\text{máx}}$ hacia el rojo en los espectros de F nativa, anteriormente analizados.

Por su parte, los espectros de DC no mostraron modificaciones significativas en las fases comparativamente con la enzima en *buffer*, conservándose en gran medida la estructura secundaria de la proteína. Se pudo notar que la fase inferior del sistema PEG 2.000 altera de manera algo más notoria el contenido de alfa-hélices y láminas beta.

El análisis funcional de la enzima mostró que la actividad de α -Amy se ve reducida en las fases de los SBAs respecto de la misma en *buffer*, además, algo más afectada en las fases inferiores que en las superiores. También se observó cierta recuperación catalítica al concentrarse las fases.

Esto último podría relacionarse con lo observado a partir de los espectros de emisión de fluorescencia nativa, donde se concluyó que existe cierta perturbación

estructural más significativa en las fases inferiores. Esto podría explicar la menor actividad enzimática por modificación de la estructura terciaria que se daría, al menos con seguridad, en el entorno de los triptófanos, pero también podría afectar las proximidades del sitio activo de la enzima. No obstante, esta pérdida de actividad catalítica no se relacionaría con desestructuración a nivel secundario, dado que los espectros de DC no se ven afectados de manera relevante y el más afectado fue en la fase inferior del PEG 2.000/T.L. 3, medio que no induce ningún decaimiento en particular en la funcionalidad de la α -Amy.

Los ensayos de DSC permitieron evaluar el efecto del PEG en la estabilidad térmica de la α -Amy. Nuevamente se observó la presencia de un intermediario estable durante el proceso de desnaturalización. Las T_m fueron muy similares en ausencia y presencia de PEG, aumentando sólo 1K, aproximadamente, en la segunda transición con PEG. Además, la presencia de los polímeros disminuyó los ΔH°_{cal} de la segunda transición sin modificar a la primera, dando lugar a una estructura más sensible a la desnaturalización térmica.

Hasta aquí podemos notar que los elevados Y % alcanzados en algunos de los SBAs ensayados sugieren que esta metodología de reparto podría emplearse sobre extractos naturales, debiendo evaluar el comportamiento de reparto del resto de las proteínas presentes como impurezas para así considerarla una estrategia eficiente de purificación.

Habiendo caracterizado ambas metodologías, analizado el tipo de interacciones involucradas y los efectos sobre la estructura, funcionalidad y estabilidad enzimática, nos encontramos en condiciones de aplicarlas sobre fuentes naturales de α -Amy. La finalidad de esto fue verificar, empleando un diseño optimizado, la versatilidad de estas metodologías a la hora de aplicarlas a enzimas de diferentes orígenes, además de emplear materias primas económicas y aportar al uso y reciclado de materiales de desecho.

De esta forma, se partió de materias primas con características muy variadas como lo son el páncreas bovino y el hongo filamentoso *Aspergillus oryzae*. Ambas fueron procesadas de manera de obtener un producto que contenga a la α -Amy en las condiciones de mayor estabilidad y que permitan la implementación directa de las metodologías bioseparativas. Así se obtuvieron un homogeneizado clarificado de páncreas bovino y filtrados de cultivos fúngicos.

En cuanto a la obtención de alfa-amilasa a partir de cultivos de *Aspergillus oryzae*, en primer lugar se analizó la composición del medio, concentración de almidón y tiempo de incubación necesarios para obtener una máxima producción enzimática.

Se observó que la síntesis de esta enzima se ve favorecida al emplear un medio con composición optimizada en cuanto al tipo y concentración de minerales y otros componentes. Este medio fue llamado “medio 2 u optimizado”. La concentración de almidón también es un factor determinante, dado que un exceso de este polisacárido reduce la actividad de alfa-amilasa, posiblemente por efectos sobre el mecanismo de síntesis o de regulación de actividad enzimática por parte del microorganismo. El tiempo de incubación del cultivo también es un factor importante, dado que se vio que existen distintos estadios donde se alcanzan productividad máxima. En este sentido, se seleccionó el primero de ellos (día 4) para detener la incubación, dado que minimizar los tiempos tiene beneficios no solo para la estabilidad de la enzima sino también económicos, si se deseara proyectar esta metodología a nivel de la industria.

Con el fin de hacer uso de desechos provenientes de diversas actividades industriales, se propuso emplear fuentes alternativas de almidón, como lo son los residuos provenientes del procesamiento del trigo. Así se prepararon medios de cultivo optimizados reemplazando el almidón por distintas muestras elaboradas con tales desechos. Estas muestras se llamaron “A” y “semillas”. La primera de ellas se obtuvo por procesado y esterilización directo del material de desecho, mientras que la segunda, como el nombre lo indica, se preparó seleccionando las semillas de trigo. Los resultados indicaron que ambas muestras son eficientes como fuentes de almidón, dado que los cultivos dieron lugar a una producción significativa de alfa-amilasa.

Estos resultados se corroboraron por electroforesis en SDS-PAGE, donde en todos los casos estuvo presente la banda electroforética correspondiente a alfa-amilasa. Además se observó que estos filtrados fúngicos son muestras bastante limpias, es decir, con pocas proteínas contaminantes.

Al analizar la estabilidad de la alfa-amilasa en estos medios, nuevamente se verificó que la enzima es estable a pH neutro e inestable a pH 3,00, tal como se había observado para la enzima comercial. También se ajustó a una cinética de inactivación ácida de primer orden, con una constante de velocidad menor que para la enzima comercial, lo cual es un resultado alentador dado que se inactiva más lentamente.

Al aplicar ambas metodologías sobre las fuentes naturales se obtuvieron diferentes resultados aunque, en términos generales, factores de purificación variables pero rendimientos muy satisfactorios.

Al precipitar con PAA el HPB se alcanzó una escasa purificación (1,48) aunque un rendimiento muy bueno (88,20 %). Esto califica a esta técnica como eficiente para concentrar la enzima de interés.

Al aplicar la precipitación con PAA sobre los filtrados fúngicos se obtuvieron rendimientos elevados, con valores que oscilan entre 63 % y 84 % en el peor y mejor de casos, respectivamente. Nuevamente el PAA 240.000 mostró mayor capacidad precipitante dado que los R % fueron, en general, superiores que para PAA 100.000. Los FP indicaron que la muestra se purificó entre 2 y 3 veces aproximadamente, lo cual es coherente con los pocos contaminantes que se hallaron en las muestras de partida. Esto significa que esta metodología, aplicada sobre esta fuente enzimática, es eficiente tanto en términos de rendimiento como de purificación.

Es de importancia destacar los elevados rendimientos que mostró tener esta metodología de precipitación con PEs, tanto para la enzima pancreática como fúngica. Además, la posibilidad de redissolver los precipitados hasta el volumen deseado la hace aun más eficaz como metodología de concentración. Estos resultados son coherentes con una metodología aplicable en los primeros pasos extractivos de un proceso de aislamiento enzimático adaptándose, además, a enzimas de diferentes orígenes.

Al aplicar los SBAs se observaron resultados variables de acuerdo al origen de la enzima: en el HPB la α -Amy no siguió el comportamiento de reparto esperado (según la enzima comercial) en los SBAs PEG 8.000, cumpliéndose en los PEG 2.000 donde se lograron rendimientos del 59 % y 78 %, aproximadamente, y purificaciones escasas.

Por el contrario, en los filtrados fúngicos la α -Amy siguió la tendencia esperada (según la enzima comercial) enriqueciendo la fase polimérica en los sistemas PEG 2.000 y la fase salina en los PEG 8.000. Sin embargo, estos últimos no alcanzaron las expectativas previstas en cuanto al rendimiento (no superaron el 40 %) y purificación ($FP < 1$) del proceso. En los sistemas PEG 2.000, en cambio, los R % fueron muy alentadores (entre 79 % y 99 %, aproximadamente) y los FP bajos o cercanos a la unidad, pero aceptables dado que la muestra de partida presenta pocos contaminantes.

Estos resultados verifican que existen numerosas variables que afectan el reparto de un soluto en SBAs, incluyendo no sólo las propias del sistema sino también las características del soluto. Por este motivo es que los sistemas PEG 8.000-fosfato de

potasio/T.L. 1, que fueron seleccionados según los resultados obtenidos con la enzima comercial, no se adaptaron al reparto de la alfa-amilasa de origen pancreático.

Todos estos resultados indican que el método de reparto en SBAs no purifica eficientemente a la alfa-amilasa en sus fuentes naturales, pero puede emplearse para concentrarla, dado que reduce sustancialmente el volumen donde está contenida la enzima. Esto sugiere que, para los casos en los que pueden adaptarse hacia enzimas de diferentes orígenes, el reparto en SBAs presenta potencial para la concentración primaria de alfa-amilasa, en un proceso global de extracción y purificación de esta enzima.

Finalizando nuestro análisis, resulta conveniente destacar que la eficacia de los métodos de separación en términos de purificación está condicionada al uso que se le dará al producto de interés, el cual determinará el grado de pureza final deseado y la necesidad o no de incorporar una etapa posterior de purificación.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA



CAPÍTULO 5: Bibliografía

Albertsson P. (1.971). Partition of Cell Particles and Macromolecules, 2° Ed., Wiley, New York.

Amani, M.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Floris, G.; Mura, A.; Kurganov, B. I.; Ahmad, F. y Saboury, A. A. (2.007) Two-state irreversible thermal denaturation of *Euphorbia characias* latex amine oxidase. Biophys. Chem., **125**, 254-259.

Andersson, M. y Hatti-Kaul, R. (2.000) Dynamic and static light scattering and fluorescence studies of the interactions between lactate dehydrogenase and poly (ethyleneimine). J. Phys. Chem. B, **104**, 3.660-3.667.

Arakawa, T. y Timasheff, S. (1.985) Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins. Biochemistry-US, **24**, 6756-6762.

Arvind, L.; Aruna, N.; Roshnie, J. y Devika, T. (2.000) Reversible precipitation of proteins on carboxymethyl cellulose. Process Biochem., **35**, 777-785.

Azuaga, A. I.; Conejero-Lara, F.; Rivas, G.; De Filippis, V.; Fontana, A. y Mateo, P. L. (1.995) The thermodynamics of association and unfolding of the C-terminal fragment of thermolysin. Biochim. Biophys. Acta, **1.252**, 95-102.

Bach, D. y Chapman, D. (1.980) Calorimetric studies of biomembranes and their molecular components. Biological Microcalorimetry, Academic Press, London, 275-309.

Bayramog̃ lu, G.; Yilmaz, M. y Arica, M. Y. (2.004) Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. Food Chem., **84**, 591-599.

Boel, E.; Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, G. G.; Jensen, V.J.; Petersen, S.B.; Swift, H.; Thim, L. y Woldike, H. F. (1.990) Calcium binding in alpha-

amylases: An X-ray diffraction study at 2,1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry-US*, **29**, (26), 6.244-6.249.

Boeris, V.; Micheletto, Y.; Lionzo, M., da Silveira N. P. y Guillermo Picó (2.011) Interaction behavior between chitosan and pepsin. *Carbohydr. Polym.*, **84**, 459-464.

Braia, M.; Porfiri, M. C.; Farruggia, B.; Picó, G. y Romanini, D. (2.008) Complex formation between protein and poly vinyl sulfonate as a strategy of proteins isolation. *J. Chromatogr. B*, **873**, 139-143.

Brooks, W.; Walter, H. y Fisher, D. (1.985) *Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses and applications to biotechnology*, Academic Press, New York, 21-34.

Brown, R.E.; Jarvis, K.L. y Hyland, K.J. (1.989) Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem*, **180**, 136-139.

Camerini-Otero, R.; Day, L. (1.978) The wavelength dependence of the turbidity of solutions of macromolecules. *Biopolymers*, **17**, 2.241-2.249.

Carlsen, M.; Nielsen, J. y Villadsen, J. (1.996) Kinetic studies of acid-inactivation of α -amylase from *Aspergillus oryzae*. *Chem. Eng. Sci.*, **51**, 37-43.

Castellan, G. W. (1.987) *Fisicoquímica*, 2º Ed., Addison-Wesley Iberoamericana S. A., Wilmington, Delaware, Cap. 24, pp 613-658.

Cong, L.; Kaul, R.; Dissing, U. y Mattiasson B. (1.99 5) A model study on Eudragit and polyethyleneimine as soluble carriers of α -amylase for repeated hydrolysis of starch. *J. Biotechnol.*, **42**, 75-84.

Cooper, C.; Dubin P.; Kayitmazer, A. y Turksen S. (2.005) Polyelectrolyte–protein complexes. *Curr. Opin. Colloid In.*, **10**, 52-78.

Djabali, D.; Belhaneche, N.; Nadjemi, B.; Dulong, V. y Picton, L. (2009) Relationship between potato starch isolation methods and kinetic parameters of hydrolysis by free and immobilised α -amylase on alginate (from *Laminaria digitata* algae). *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 563-570.

Doran, P. M. (1998) *Principios de ingeniería de los bioprocesos*, Acribia, Zaragoza.

Duy, C. y Fitter, J. (2006) How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra. *Biophys. J.*, **90**, 3704-3711.

Eisenberg, D. y Crothers, D. (1979) *Physical Chemistry with Applications to the Life Science*. Benjamin Cummings, California.

El Harrous, M. y Parody-Morreale, A. (1999) Measurement of biochemical affinities with a gill titration calorimetry. *Anal. Biochem.*, **254**, 96-108.

Fasman, G. D. (1996) *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Plenum Press, New York and London.

Filimonov, V. V. y Rogov, V. V. (1996) Reversible association of the equilibrium unfolding intermediate of λ Cro repressor. *J. Mol. Biol.*, **255**, 767-777.

Fischer, E.H. y de Montmollin, R. (1951) Proprietes de l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* cristallisee. *Helv. Chim. Acta*, **34**, 1994-1999.

Flory, P.J. (1953) *Principles of polymer Chemistry*, Cornell University Press Bibliografía, Ithaca, New York.

Foreman, T.; Khalil, M.; Meier, P.; Brainard, J. R.; Vanderberg, L. A. y Sauer, N. N. (2001) Effects of charged water-soluble polymers on the stability and activity of yeast alcohol dehydrogenase and subtilisin carlsberg. *Biotechnol. Bioeng.*, **76**, 241-246.

Francis, F.; Sabu, A.; Nampoothiri, K. M.; Ramachandran, S.; Ghosh, S.; Szakacs, G. y Pandey, A. (2003) Use of response surface methodology for optimizing process

parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Eng. J.*, **15**, 107-115.

Freifelder, D. (1.935) *Physical biochemistry*, 2° Ed., W. H. Freeman and Company, New York, Cap. 1, pp 1-37.

Galanakis, C. M. (2.012) Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Tech.*, **26**, 68-87.

Gill, S. J., Murphy, K. P. y Robert, C. H. (1.990) Partition function formalism for analyzing calorimetric experiments. *J. Chem. Educ.*, **67**, (11), 928-931.

Guan, Y.; Lilley, T. y Treffry, T. (1.993) A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous polymer two-phase systems. *Macromolecules*, **26**, 3.971-3.979.

Gupta, V.; Nath, S. y Chand, S. (2.002) Role of water structure on phase separation in polyelectrolyte-polyethylenglycol based aqueous two-phase systems. *Polymer*, **43**, 3.387-3.390.

Harris, J. M. (1.992) *Biomedical and Biotechnical Applications of Polyethylene Glycol Chemistry*, Plenum Press, New York.

Hashima, S. O.; Kaul, R. H.; Andersson, M.; Mulaa, F. J. y Mattiasson, B. (2.005) Differential scanning calorimetric studies of a *Bacillus halodurans* α -amylase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1.723**, 184-191.

Henrissat, B. (1.991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316.

Hilbrig, F. y Freitag, R (2.003) Protein purification by affinity precipitation. *J. Chromatogr. B*, **790**, 79-90.

Ishikawa, K.; Matsui, I.; Honda, K.; Nakatani, H. (1.990) Substrate dependent shift of optimum pH in porcine pancreatic α -amylase-catalyzed reactions. *Biochemistry-US*, **29**, 7.119-7.123.

Jagnow, G. y Dawid, W. (1.991) *Biotechnologies. Eine Einführung mit Modellversuchen*, Verlag, Stuttgart, Alemania, Cap. 3, pp 77-113.

Janecek, S. y Balaz, S. (1.992) α -Amylases and approaches leading to their enhanced stability. *FEBS*, **304**, 1-3.

Jha, N. S. y Kishore, N. K. (2.009) Binding of streptomycin with bovine serum albumin: Energetics and conformational aspects. *Thermochim. Acta*, **482**, 21-29.

Jin, B.; van Leeuwen, H. J.; Patel, B. y Yu, Q. (1.998) Utilization of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -Amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technol.*, **66**, 201-206.

Kahraman, M. V.; Bayramog̃lu, G.; Kayaman-Apohan, N. y Gu'ngo'r, A. (2.007) α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chem.*, **104**, 1.385-1.392.

Kammoun, R.; Naili, B. y Bejar, S. (2.008) Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technol.*, **99**, 5.602-5.609.

Kang, C. H.; Lee, C. K. y Sandler, S. I. (1.989) Polydispersivity effects on the behavior of aqueous two-phase two-polymer systems. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **28**, 1.537-1.542.

Khrapunov, S. (2.009) CD spectroscopy has intrinsic limitations for protein secondary structure analysis. *Anal. Biochem.*, **389**, (2), 174-176.

Kim, W.; Yamasaki, Y. y Kataoka, K. (2006) Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands. *J. Phys. Chem. B*, **110**, 10.919-10.925.

Kumar, A. y Gupta, M. N. (1998) Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S – 100 for the biocatalysis of macromolecular substrate. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **5**, 289-294.

Kumari, A.; Rosenkranz, T.; Kayastha A. M. y Fitter, J. (2010) The effect of calcium binding on the unfolding barrier: A kinetic study on homologous α -amylases. *Biophys. Chem.*, **151**, 54-60.

Kurganov, B. I.; Lyubarev, A. E.; Sanchez-Ruiz, J. M. y Shnyrov, V. L. (1997) Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. *Biophys. Chem.*, **69**, 125-135.

Kuriki, T. e Imanaka, T. (1999) The concept of the α -Amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, (5), 557-565.

Ladbury, J. y Chowdhry, B. (1998) *Biocalorimetry. Application of calorimetry in the biological sciences*, Wiley & Sons, New York, Cap. 12, pp 155-183.

Lakowicz J. S. (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum press. New York.

Lee, J. C. y Lee, L. (1981) Preferential Solvent Interactions between Proteins and Polyethylene Glycols. *J. Biol. Chem.*, **256** (2), 625-631.

Lei, X.; Diamond, A. D. y Hsu, J. T. (1990). Equilibrium phase behavior of the poly(ethylene glycol)/potassium phosphate/water two-phase system at 4 °C. *J. Chem. Eng. Data*, **35**, 420-423.

López, María Soledad (2009) Desarrollo de una metodología de bioseparación de Lipasa a partir de desperdicios de la industria frigorífica local. Tesina de grado,

Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J. Farr, A. L. y Randall R. J. (1.951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Lumry, R. y Rajender, S. (1.970) Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: a ubiquitous property of water. *Biopolymers*, **9**, 1.125-1.227.

Lyubarev, A. E.; Kurganov, B. I.; Orlov, V. N. y Zhou, H. M. (1.999) Two-state irreversible thermal denaturation of muscle creatine kinase. *Biophys. Chem.*, **79**, 199-204.

Mabrey, S. y Sturtevant, J. M. (1.977) Incorporation of saturated fatty acids into phosphatidylcholine bilayers. *BBA - Lipid. Lipid Met.*, **486**, (3), 444-450.

MacGregor, E.; Janecek, S. y Svensson, B. (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1.546**, 1-20.

Marquardt, D.W. (1.963) An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, **11**, (2), 431-441.

Matsura, Y.; Kusunoki, M. y Harada, W. (1.984) Structure and possible catalytic residues of Taka-Amylase A. *J. Biochem.*, **95**, 697-702.

Michnik, A.; Drzazga, Z.; Kluczevska, A. y Michalik, K. (2.005) Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin. *Biophys. Chem.*, **118**, 93-101.

Moad, G.; Rizzardo, E. y Thang, S. H. (2.008) Radical addition fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer*, **49**, 1.079-1.131.

Montgomery, D.; Jordan, R.; McMacken, R. y Freire, E. (1.993) Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of the *Escherichia coli* molecular chaperone DnaK. J. Mol. Biol., **232**, 680-692.

Murado, M. A.; González, M. P.; Torrado, A. y Pastrana, L. M. (1.997) Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. Process Biochem., **32**, (1), 35-42.

Muralikrishna, G. y Nirmala, M. (2.005) Cereal α -amylases – an overview. Carbohydr. Polym., **60**, 163-173.

Nath, S.; Patrickios, C. y Hatton, A. (1.995) Turbidimetric titration study of the interaction of proteins with acrylic polyampholytes. Biotechnol. Progr., **11**, 99-103.

Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D. y Ehrhardt, W. (1.988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis, **9**, 255-262.

Neuhoff, V.; Stamm, R.; Pardowitz, I.; Arold, N.; Ehrhardt, W. y Taube, D. (1.990) Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. Electrophoresis, **11**, 101-117.

Nigam, P. y Singh, D. (1.995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme Microb. Tech., **17**, 770-778.

Paglini, S. (1.979) Introducción al estudio biofísico de las macromoléculas, Ed. Universitaria, Buenos Aires, Cap. 7, pp 91-158.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P. y Soccol, V. T. (2.000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource Technol., **74**, 69-80.

Patrickios, C.; Sharma, L.; Armes, S. y Billingham, N. (1.999) Precipitation of a water-soluble ABC triblock methacrylic polyampholite: effects of time, pH, polymer concentration, salt type and concentration, and presence of a protein. *Langmuir*, **15**, 1613-1620.

Pellegrini Malpiedi, L.; Picó, G. A.; Loh, W. y Nerli, B. B. (2.010) Role of polymer-protein interaction on partitioning pattern of bovine pancreatic trypsinogen and alpha-chymotrypsinogen in polyethyleneglycol/sodium tartrate aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B*, **878**, 1.831-1.836.

Pessoa, A. Jr. y Kilikian, B. V. (2.005) *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, Ed. Manole Ltda., San Pablo, Brasil.

Privalov, P. L.; Tiktopulo, E. I.; Venyaminov, S. Y.; Griko, Y. V.; Makhatadze, G. I. y Khechinashvili, N. N. (1.989) Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state. *J. Mol. Biol.*, **205**, 737-750.

Privalov, P.L. y Filimonov, V.V. (1.978) Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding. *J. Mol. Biol.*, **122**, 447.

Privalov, P.L. y Khechinashvili, N.N. (1.974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, **86**, 665-684.

Privalov, P.L. y Potekhin, S.A. (1.986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Method. Enzymol.*, **131**, 4-51.

Quesada-Soriano, I.; García-Maroto, F. y García-Fuentes, L. (2.006) Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1.764**, 979-984.

Rahardjo, Y. S. P.; Weber, F. J.; Haemers, S.; Tramper, J. y Rinzema, A. (2.005) Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme Microb. Tech.*, **36**, 900-902.

Raviyan, P.; Tang, J. y Rasco, B. A. (2003) Thermal stability of α -Amylase from *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide gel. J. Agr. Food Chem., **51**, 5.462-5.466.

Romanini, D.; Braia, M.; Giatte Angarten, R.; Loh, W. y Picó, G. (2007) Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers. J.Chromatogr. B, **857**, 25-31.

Sanchez-Ruiz, J. M. (1992) Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. Biophys. J., **61**, 921-935.

Sanchez-Ruiz, J. M.; López-Lacomba, J. L.; Cortijo, M. y Mateo, P. L. (1988) Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. Biochemistry-US, **27**, 1.648-1.652.

Schieber, A.; Stintzing F. C. y Carle R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. Trends Food Sci. Tech., **12**, 401-413.

Scopes, R. (1988) Protein Purification: Principles and Practice, 2° Ed., Springer-Verlag, New York.

Smith, J. (2004) Biotechnology, 4° Ed., Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, Cap. 5, pp 71-87.

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem., **150**, 76-85.

Spelzini, D. (2008) Aislamiento y purificación de proteasas ácidas por extracción líquido-líquido en sistemas bifásicos acuosos. Tesis doctoral, Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 91-92.

Spelzini, D; Farruggia, B. M. y Picó, G. (2.005) Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: Chymosin and pepsin. *Journal of Chromatography B*, **821**, 60-66.

Spohr, A.; Carlsen, M.; Nielsen, J. y Villadsen, J. (1.998) α -Amylase production in recombinant *Aspergillus oryzae* during fed-batch and continuous cultivations. *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, (1), 49-56.

Sreerama, N. y Woody R. (2.000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.*, **287**, 252-260.

Sreerama, N; Venyaminov, S. Y. y Woody, R. W. (2.000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal. Biochem.*, **287**, 243-251.

Swift, H. J.; Brady, L.; Derewenda, Z. S; Dodson, E. J.; Dodson, G. G.; Turkenburg, J. P. y Wilkinson, A. J. (1.991) Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) α -Amylase: an application of the simulated-annealing method. *Acta Crystallogr. B*, **47**, 535-544.

Tanford C. (1.961) *Physical Chemistry of Macromolecules*, Jhon Wyley & Sons, New York.

Thomas, M. (2.008) *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*, 2° Ed., Wiley, New York.

Timasheff, S.N. (2.002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, (15), 9.721-9.726.

Tsetska, R. (2.001) *Physical Chemistry of Polyelectrolytes, Surfactants Science*, CRC Press., **99**, 687-741.

Tsuboi, A.; Izumi, T.; Hirata, M.; Xia, J.; Dublin, P. L. y Kokufuta, E. (1.996) Complexation of proteins with a strong polyanion in an aqueous salt-free system. *Langmuir*, **12**, 6.295-6.303.

Van Holde, K. E. (1.928) *Physical Biochemistry*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs.

Velázquez-Campoy, A. (2.006) Ligand binding to one-dimensional lattice-like macromolecules: Analysis of the McGhee-von Hippel theory implemented in isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.*, **348**, 94-104.

Wang, Y.; Gao, J. y Dubin, P. (1.999) Protein Separation via Polyelectrolyte Coacervation: Selectivity and Efficiency. *Biotechnol. Progr.*, **12**, 356-362.

Warburg, O.; Christian, W. (1.942) Isolation and crystallization of enolase. *Biochemistry-US*, **310**, 384-421.

Wiechelman, K.J.; Braun, R.D. y Fitzpatrick, J.D. (1.988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, **175**, 231-237.

Zakariassen, H. y Sørli, M. (2.007) Heat capacity changes in heme protein–ligand interactions. *Thermochim. Acta*, **464**, 24-28.

Zamorano, L. S.; Pina, D. G.; Gavilanes, F.; Roig, M. G.; Sakharov, Y. Y.; Jadan, A. P.; van Huystee, R. B.; Villar, E. y Shnyrov, V. L. (2.004) Two-state irreversible thermal denaturation of anionic peanut (*Arachis hypogaea L.*) peroxidase. *Thermochim. Acta*, **417**, 67-73.

Zaslavsky, B. Y. (1.995) *Aqueous two-phase partitioning, Physycal Chemistry and Bioanalytical Applications*, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

Zhou, Y. L; Liao, J. M.; Du, F. y Liang, Y. (2.004) Thermodynamics of the interaction of xanthine oxidase with superoxide dismutase studied by isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy. *Thermochim. Acta*, **426**, 173-178.

Žoldák, G.; Sedlák, E.; Valušová, E.; Wolfrum, A.; Marek, J.; Antalík, M. y Sprinzl, M. (2.006) Irreversible thermal denaturation of elongation factor Ts from *Thermus thermophilus* effect of the residual structure and intermonomer disulfide bond. *Biochim. Biophys. Acta*, **1.764**, 1.277-1.285.